

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Leiter: Professor Dr. Florian Lang

**Inhibition des apoptotischen Zelltodes von
Erythrozyten durch NO**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jan Peter Nicolay**

**aus
Lahr**

2009

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Bauer

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Erythrozyten – Charakteristik des Zellsystems	1
1.1.1	Herkunft und Bildung von Erythrozyten	1
1.1.2	Die funktionsbedingte Erythrozytenform	1
1.1.3	Hauptstoffwechselwege des Erythrozyten	2
1.1.4	Physiologische Funktionen des Erythrozyten	3
1.1.5	Alterung und Abbau der Erythrozyten (Senescence)	5
1.2	Apoptose	6
1.2.1	Entdeckung und Geschichte der Apoptose	6
1.2.2	Die Begriffe von Apoptose, Nekrose und programmiertem Zelltod	7
1.2.3	Signalwege, Mechanismen und Messgrößen der Apoptose	9
1.2.4	Bedeutung und Funktion der Apoptose	11
1.3	Erythrozytäre Apoptose/ Eryptose	12
1.3.1	Entdeckung und Charakteristik der Eryptose	12
1.3.2	Mechanismen, Signalwege und Charakteristika der Eryptose	13
1.3.3	Medizinische und biochemische Relevanz der Eryptose	16
1.4	NO – kleines Molekül, große Wirkung	18
1.4.1	Biosynthese von NO	18
1.4.2	Wirkung von NO auf Gefäße und Kreislauf	19
1.4.3	NO und Erythrozyten	21
1.4.4	NO und Apoptose	22
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	24
2	Materialien und Methoden	26
2.1	Erythrozyten und Mäuse	26
2.2	Verwendete Reagenzien	26
2.3	Verwendete Inkubationslösungen	28
2.3.1	Ringer-Lösung	28
2.3.2	Chloridfreie Lösung	29
2.3.3	Glucosefreie Lösung	30
2.3.4	Hyperosmolare Lösung	31
2.3.5	Annexin-Waschpuffer	31
2.4	Durchflusszytometrie	32
2.4.1	Prinzip der Methode	32
2.4.2	Aufarbeitung der Erythrozyten und Probenansatz	33
2.4.3	Annexin-V-Messung	34
2.4.4	Die Messung des Phosphatidylserin-„Scrambling“ an der Membran	36
2.4.4.1	Prinzip der Methode	36
2.4.4.2	Durchführung der Aktivitätsbestimmung	37

2.4.5	Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration	38
2.4.5.1	Prinzip der Methode	38
2.4.5.2	Durchführung der Calciumbestimmung	38
2.5	Detektion S-nitrosylierter Proteine	39
2.5.1	Prinzip der Methode	39
2.5.2	Durchführung der Messung	40
2.6	Bestimmung der Thioredoxin-Aktivität	41
2.6.1	Hintergrund und Prinzip der Messung	41
2.6.2	Durchführung der Messung	41
2.7	Bestimmung der „Clearance“ fluoreszenzmarkierter Erythrozyten	42
2.7.1	Prinzip der Methode	42
2.7.2	Durchführung der Clearance-Bestimmung	42
2.8	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Annexin-V-Messungen mit Nitroprussid	44
3.1.1	Ringerlösung	44
3.1.2	Ionomycin und Ceramid	45
3.1.3	Stresslösungen	48
3.1.3.1	Chloridfreie Lösung	48
3.1.3.2	Glucosefreie Lösung	49
3.1.3.3	Hyperosmolare Lösung	50
3.2	Forward-scatter-Messungen mit Nitroprussid	51
3.2.1	Ionomycin und Ceramid	51
3.2.2	Stresslösungen	54
3.2.2.1	Chloridfreie und hyperosmolare Lösung	54
3.2.2.2	Glucosefreie Lösung	56
3.3	Durchflusszytometrische Messungen mit Papa-NONOate	57
3.4	Durchflusszytometrische Messungen mit dibutyryl-cGMP	58
3.4.1	Annexin-V-Messungen mit Ionomycin und Ceramid	59
3.4.2	Annexin-V-Messungen mit Stresslösungen	60
3.4.3	Forward scatter-Messungen mit Ionomycin und Ceramid	61
3.4.4	Messungen des Forward scatter in Stresslösungen	63
3.5	Calciummessung mit Ionomycin und Nitroprussid	64
3.6	Messung der „Scrambling“-Aktivität der Zellmembran mit NO	65
3.7	Messung des Gehalts an S-nitrosylierten Thiolgruppen	67
3.8	Messung der Thioredoxin-Aktivität	68
3.9	Bestimmung der „Clearance“ fluoreszenzmarkierter Erythrozyten	69

3.9.1	Messung der Clearance unter Stress.....	69
3.9.2	Messung ungestresster Erythrozyten.....	71
3.9.3	Messung der Clearance in der Milz.....	72
3.10	Messungen mit hohen Konzentrationen von NO	73
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
4	Diskussion	78
4.1	Allgemeine Erklärungen zu den Messungen	78
4.2	Eryptose durch Calciumstress	79
4.3	Eryptose durch andere physiologische Stressoren	80
4.4	Experimente zur Aufklärung des Mechanismus.....	82
4.5	In vivo-Experimente	85
4.6	Relevanz der Ergebnisse.....	86
4.7	Ausblick	87
5	Zusammenfassung.....	89
6	Literatur.....	90
7	Anhang.....	103
7.1	Danksagung	103
7.2	Lebenslauf	104
7.3	Publikationen	106

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AE1	anion exchanger Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	atrioventrikulärer Knoten
bcl-2	B-cell lymphoma 2
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaGlu	Calciumgluconat
CD	cluster of differentiation
CFU-GEMM	C olony forming u nit für G ranulozyten, E rythrozyten, M onozyten und M egakaryozyten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EKG	Elektrokardiogramm
EPO	Erythropoietin
FACS	fluorescent assisted cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GSH	Glutathion
GSK-3β	Glycogensynthasekinase-3β
GSSG	Glutathion-Disulfid
H ⁺	Proton
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
Hct	Hämatokrit
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser

IgG	Immunglobulin vom Typ G
KCl	Kaliumchlorid
KGlu	Kaliumgluconat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml/μl	Milliliter/Mikroliter
mM/μM	millimolar/mikromolar
mOsm	milliosmolar
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaGlu	Natriumgluconat
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Austauschpumpe
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia hydrogenii = negativer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
rpm	rounds per minute
SMase	Sphingomyelinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i> -mediated dUTP-biotin nick end labeling

1 Einleitung

1.1 Erythrozyten – Charakteristik des Zellsystems

1.1.1 Herkunft und Bildung von Erythrozyten

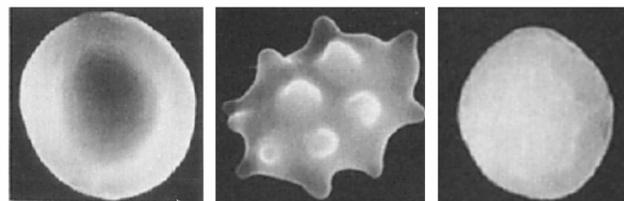
Bei den Zellen des peripheren Blutes wird zwischen sogenannten roten und weißen Blutkörperchen unterschieden. Die Erythrozyten bilden dabei als rote Blutzellen mit einem Anteil von >99% am Gesamtvolumen des Blutes die größte Fraktion korpuskulärer Elemente im Blut. In ihrer Entwicklung stammen sie von der myeloischen Stammzelle (CFU-GEMM) des roten Knochenmarks ab. Den hierbei bedeutsamsten Proliferations- und Differenzierungsfaktor stellt das Glykoproteinormon Erythropoietin dar, das in der fetalen Leber und der adulten Niere gebildet wird, wenn in den peripheren Geweben Sauerstoffmangel herrscht. Der Einfluss dieses Hormons auf die CFU-GEMM-Zelle bewirkt die endgültige Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Erythrozyten. Diese Differenzierung beinhaltet mehrere Stufen von Vorläuferstadien, in denen die Zellen die notwendigen Proteine synthetisieren, um ihre Funktionen aufzunehmen und aufrecht zu erhalten; sie dauert 2-5 Tage und führt letztlich dazu, dass reife Erythrozyten Kern, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum verlieren und so ihre Fähigkeit zur Zellteilung und Proteinsynthese einbüßen. Im Schnitt bildet ein menschlicher Organismus in jeder Sekunde ca. 2,4 Millionen Erythrozyten. Bei Frauen zirkulieren im peripheren Blut zu jedem Zeitpunkt durchschnittlich $4,8 \times 10^{12}/l$, bei Männern $5,3 \times 10^{12}/l$ Erythrozyten.

Morphologisch stellen sich Erythrozyten als scheibenförmige, bikonkave und kernlose Zellen mit einem mittleren Durchmesser von etwa $7,5 \mu m$ und einer maximalen Dicke von $2 \mu m$ am Rand dar. Neben Wasser beinhaltet der Erythrozyt hauptsächlich den roten Blutfarbstoff Hämoglobin, der dem O_2 -Transport dient (siehe 1.1.4).

1.1.2 Die funktionsbedingte Erythrozytenform

Die bikonkave Form der Erythrozyten dient der Oberflächenvergrößerung und damit der effizienten Aufnahme und Abgabe der Atemgase. Die Scheibenform stellt nämlich gegenüber der Kugelform als idealer Zellform eine Vergrößerung der Zelloberfläche dar, wodurch der Netto-Atemgasaustausch, der per Diffusion über die

Zelloberfläche erfolgt, maximiert wird. Um dieser besonderen Zellform Stabilität zu verleihen, verfügt der Erythrozyt über ein zytoskelettales, die ganze Zelle umspannendes Proteinnetz, das die Lipid-Doppelschicht der Membran mit Hilfe des Proteins Ankyrin mit dem Spektrin-Gerüst des Cytoskeletts vernetzt. Den Ansatzpunkt des Ankyrins stellen Transmembranproteinen wie das Protein 4.1 oder der Anionenaustauscher AE1 (auch Bande-3-Protein genannt) dar, der eines der häufigsten und wichtigsten Membranproteine des Erythrozyten ist. Der AE1 übernimmt auch wichtige Funktionen beim erythrozytären CO₂-Transport und der Zellalterung (siehe 1.1.5). Bei der Erythrozytenform muss stets das Gleichgewicht zwischen Verformbarkeit und Formstabilität aufrecht erhalten werden, da die ca. 7,5 µm große Zelle in der Lage sein muss, auch kleinste Kapillaren zum Beispiel in der Lunge zu passieren, deren Lumen kleiner als der Erythrozytendurchmesser ist (bis zu 2 µm). Unter physiologischen Bedingungen wird dieses Gleichgewicht durch das Zytoskelett gewährleistet. In hypotoner Umgebung schwellen die Zellen in der Folge osmotischer Wasseraufnahme bis hin zu einer kugelförmigen Gestalt an. Man bezeichnet sie dann als Sphärozyten, während sie im hypertonen Milieu als Echinozyten bezeichnet werden, da sie Wasser an die Umgebung verlieren und dadurch schrumpfen, was ihnen die charakteristische, durch die Verankerungen des Zytoskeletts bedingte Stechapfelform verleiht. Beide Formen schränken die Verformbarkeit der Zelle wesentlich ein und verkürzen ihre Lebensdauer.



Normozyt

Echinozyt

Sphärozyt

Abbildung 1: *Elektronenmikroskopisches Bild verschiedener Erythrozytenformen*
(modifiziert nach Daleke & Huestis, 1989, S.1378)

1.1.3 Hauptstoffwechselwege des Erythrozyten

Verglichen mit kernhaltigen Zellen verfügen Erythrozyten nur über ein sehr eingeschränktes Maß an Stoffwechselfunktionen. Da sie im reifen Stadium weder Zellkern noch Mitochondrien besitzen, ist ihre Energiegewinnung lediglich auf den Weg der anaeroben Glykolyse beschränkt. Außerdem verfügen sie weder über die

Fähigkeit zur Zellteilung noch zur Proteinsynthese. Deswegen müssen die für den Stoffwechsel notwendigen, in Vorläuferstadien des reifen Erythrozyten gebildeten Proteine vor Schädigung durch Oxidation geschützt werden, was durch Reduktionsäquivalente, hauptsächlich NADPH und reduziertes Glutathion (GSH), geschieht. Diese beiden Stoffe können über den Pentosephosphatweg regeneriert werden. Durch die Glykolyse und den Pentosephosphatweg gebildetes ATP, NADH, NADPH und GSH dienen hauptsächlich der reduktiven Erhaltung der Zellstruktur bzw. -form und dem aktiven transmembranösen Transport mit Hilfe von Transportproteinen, vor allem der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

Eine besondere Stellung nimmt dabei das Glutathion (GSH) ein, das das wichtigste intrazelluläre Antioxidans darstellt. Viele Proteine besitzen Sulfhydrylgruppen als Teil der Aminosäure Cystein, die unter Einwirkung von freien Radikalen oder unter oxidativem Stress Disulfidbrücken ausbilden, wodurch das Protein seine katalytische Aktivität oder andere Funktionen verlieren kann. Das Glutathion selbst verfügt über eine Thiolgruppe mit stark reduzierender Potenz, womit es Disulfidbrücken reduzieren kann. Dadurch werden zwei Moleküle GSH zum Glutathion-Disulfid GSSG oxidiert, das in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die Glutathionreduktase wieder zu 2 GSH reduziert werden kann. Auf diesem Prinzip gründet sich das protektive reduktive Milieu des Zellinneren. Glucosemangel oder Beeinträchtigung des Glucosemetabolismus führt zu einer Verringerung der zellulären NADPH-Konzentration, wodurch GSSG nicht mehr zu GSH reduziert werden kann. Dies schränkt die antioxidative Abwehr der Erythrozyten ein und verringert die Lebensdauer der Zellen signifikant [Bossi and Giardina 1996].

1.1.4 Physiologische Funktionen des Erythrozyten

Die wichtigste Funktion der roten Blutkörperchen besteht im Transport der Atemgase. Hierbei soll eingeatmeter Sauerstoff aus der Lunge in die peripheren Gewebe und Kohlendioxid in umgekehrter Richtung transportiert werden. Dieser zellvermittelte Transport ist deswegen notwendig, weil die physikalische Löslichkeit von O_2 und CO_2 im Blutplasma nicht genügend groß ist, um die peripheren Gewebe gemäß ihrer physiologischen Funktionen mit gelösten Gasen suffizient zu versorgen. Deswegen wird der Sauerstoff zur Steigerung der Transportkapazität chemisch an das im Erythrozyten in hoher Konzentration enthaltene Hämoglobin- (Hb-) Molekül gebunden. Dieses Protein setzt sich im gesunden Erwachsenen im Wesentlichen aus

zwei α - und zwei β -Globin-Ketten (HbA) zusammen, die jeweils eine Häm-Gruppe mit Eisen-(II)-Ion im Zentrum gebunden haben [Pauling and Coryell 1936]. Bei hohem O_2 -Partialdruck der Umgebung kann im Zusammenspiel zwischen Häm-Gruppe und umgebendem Globin-Proteinanteil das gebundene Fe^{2+} -Zentralion jeder Häm-Gruppe ein Sauerstoff-Molekül koordinativ binden, transportieren und bei niedrigerem Sauerstoffpartialdruck in den peripheren Geweben wieder abgeben. Um den O_2 -Transport aufrechtzuerhalten, muss der zweiwertige Zustand des Häm-Eisenions stets gehalten und das Ion nötigenfalls reduziert werden, da die oxidierte Form des Hb, das sog. Methämoglobin mit dreiwertigem Eisen, nicht in der Lage ist, Sauerstoff zu binden und somit zu transportieren.

Das O_2 -Bindungsverhalten des Hb folgt beim Auftragen des Anteils an oxygeniertem Hb gegen den O_2 -Partialdruck einem sigmoidalen Kurvenverlauf, deren genaue Form durch verschiedene Faktoren wie dem pH-Wert, der Temperatur, dem CO_2 -Partialdruck und der Konzentration an 2,3-Diphosphoglycerat, einem Metaboliten eines speziellen Zweigs der Glykolyse, beeinflusst wird [Antonini et al., 1977]. Das Zusammenspiel dieser Faktoren hat zur Folge, dass unter physiologischen Bedingungen die O_2 -Affinität des Hb in der Lunge hoch ist, so dass dort Sauerstoff gebunden wird, in den O_2 -armen peripheren Geweben aber niedrig ist, was in einer O_2 -Abgabe resultiert [Perutz 1969].

Der Kohlendioxidtransport durch die Erythrozyten ist mit dem Säure-Base-Gleichgewicht des Blutes verknüpft [Nakamura and Staub 1964]. CO_2 als Stoffwechselendprodukt der Zellatmung gelangt per Diffusion aus den peripheren Geweben in die Kapillaren, wird dort gelöst und zu Kohlensäure (H_2CO_3) hydratisiert, die anschließend spontan gemäß der folgenden Reaktionsgleichung zu Hydrogenkarbonat (HCO_3^-) und einem Proton (H^+) dissoziiert:



Die Reaktion von CO_2 mit Wasser läuft spontan im Plasma nur langsam und in beide Richtungen ab, im Erythrozyten wird sie dagegen durch das Enzym Carboanhydrase katalysiert und verläuft deswegen mit etwa 10000facher Geschwindigkeit [Carter 1972], weswegen der größte Teil des CO_2 über den Erythrozyten hydratisiert wird. Auf Grund der Impermeabilität der erythrozytären Membran für Ionen muss HCO_3^- über ein spezielles Transportprotein im Austausch gegen ein Chloridion die zelluläre Membran passieren, was als Hamburger-Shift bezeichnet wird. Der hierfür benötigte Ionenaustauscher ist das oben erwähnte AE1-Protein, das den größten Anteil an der

Proteinmasse der erythrozytären Membran ausmacht. Bei der Lungenpassage kann diese Reaktion des Hamburger-Shifts in umgekehrter Richtung ablaufen, so dass das flüchtige CO_2 dort abgegeben werden kann. Dieses offene, durch die Carboanhydrase katalysierte Bikarbonat-Puffersystem ist der wichtigste Faktor für die pH-Homöostase des Blutes.

Neben dem Transport als HCO_3^- kann das CO_2 zu einem kleinen Teil als Carbamat an die terminalen Aminogruppen des Hämoglobins gebunden oder physikalisch im Plasma gelöst werden, was ebenfalls zum CO_2 -Transport beiträgt. Die am Atemgastransport beteiligten Reaktionen sind zusammenfassend nochmals in Abbildung 2 dargestellt (vgl. Schmidt, Thews & Lang, 2000, S. 614).

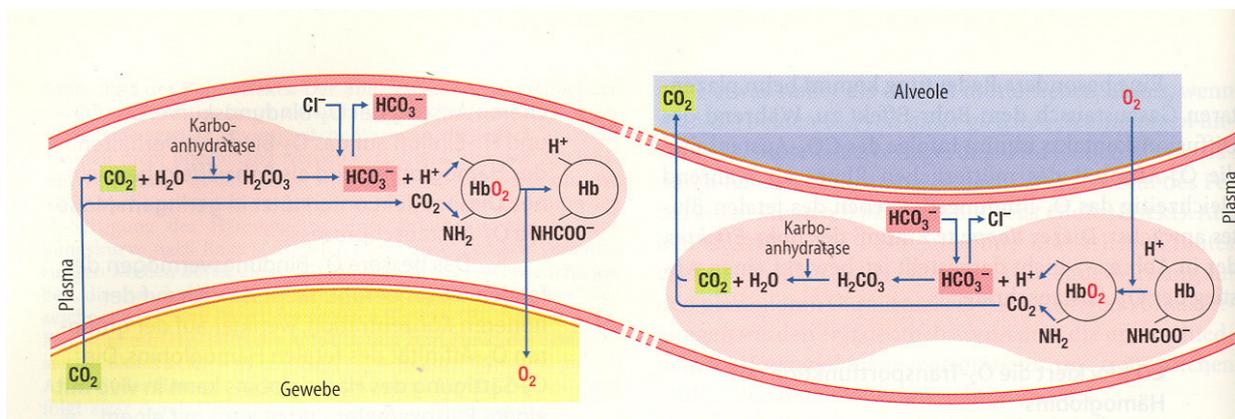


Abbildung 2: Reaktionen des erythrozytär vermittelten Gasaustausches (Näheres siehe Text; Abkürzungen sind ebenfalls dort erläutert)

(nach Schmidt, Thews & Lang, 2000, S. 614)

1.1.5 Alterung und Abbau der Erythrozyten (Senescence)

Die Lebensdauer von Erythrozyten im zirkulierenden Blut beträgt ca. 100-120 Tage, anschließend werden sie abgebaut. Konkret bedeutet das, dass täglich ca. 1 % aller roten Blutkörperchen abgebaut und ersetzt werden muss [Berlin 1964]. Würden diese ausselektierten Zellen durch Hämolyse, das heißt durch Aufplatzen dieser Zellen unter Freisetzung des Zellinneren, das der Nekrose in anderen Zellen entspricht, zugrundegehen, würden die freigesetzten Zellproteine den Organismus und speziell den Kreislauf stark schädigen: die neue Antigenpräsentation der intrazellulären Proteine kann immunologische Reaktionen hervorrufen und die Freisetzung des Hämoglobins kann durch Verstopfen des glomerulären Filtrationsapparates die Nieren in ihrer Funktion bis hin zum akuten Nierenversagen beeinträchtigen, es entsteht das Krankheitsbild der Crush-Niere. Außerdem sollen die Eisenionen und Aminosäuren des freiwerdenden Hämoglobins wieder einer neuen Hb-Synthese

zugänglich sein. Um dies zu gewährleisten, kann freigesetztes, im Blut zirkulierendes Hämoglobin an das Plasmaprotein Haptoglobin gebunden werden; dieser Proteinkomplex kann anschließend von Makrophagen internalisiert werden [Kristiansen et al., 2001; Wassell 2000].

Um aus den oben genannten Gründen eine starke Hämolyse zu vermeiden, können nicht nur freie Hämoglobinmoleküle, sondern sogar ganze Erythrozyten, deren Lebensdauer ausgereizt ist, durch Makrophagen in der Leber (Kupffer-Zellen) und vor allem in der Milz aufgenommen und abgebaut werden [Willekens et al., 2005]. Die in engen Grenzen konstante Lebensspanne der Zellen deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen genau regulierten Prozess handelt, dessen Mechanismus allerdings noch nicht vollständig geklärt ist. Bekannt ist jedoch, dass der Anionenaustauscher AE-1 bei Erythrozyten, die ausselektiert werden sollen, Strukturveränderungen aufweist, die bestimmte Autoantikörper als Antigen erkennen und durch die Bindung an dieses Antigen die Zellen opsonieren, was zu deren Abbau durch Makrophagen führt [Bosman et al., 2005a]. Zusätzlich schnüren Erythrozyten unter Verlust von bis zu 20% ihrer Masse kleine Vesikel ab, die Phosphatidylserin exponieren und so von den Makrophagen erkannt und aufgenommen werden [Willekens et al., 2003]. Die Bedeutung der Phosphatidylserin-Exposition für den Alterungsprozess und die anschließende Phagozytose der Erythrozyten ist nicht vollständig geklärt [Kuypers and de 2004; Lutz 2004]. Der erythrozytäre Alterungsprozess ähnelt in einigen Zügen dem Prozess der Apoptose, der später erklärt werden wird, wobei dennoch zwischen diesen beiden Vorgängen unterschieden wird.

1.2 Apoptose

1.2.1 Entdeckung und Geschichte der Apoptose

Das Konzept einer natürlichen und nicht zwangsläufig pathologischen Form des Zelltodes wurde erstmals von Carl Vogt 1842 an Knorpel- und Notochordzellen von Geburtshelferkröten im Juvenilstadium beschrieben [Vogt 1842]. Seitdem wurde an Hand zahlreicher anderer Beispiele über natürlich auftretenden Zelltod berichtet, allerdings wurde dieses Phänomen als eher untergeordnet betrachtet [Clarke and Clarke 1996; Curtin and Cotter 2003]. 1965 beschrieb John F. Kerr diesen Prozess [Kerr 1965] und prägte 1972 erstmals den Begriff der Apoptose, der sich vom griechischen Wort für „herabfallen“ herleitet [Kerr et al., 1972]. Mit der Metapher des

Abfallens der Blätter von einem Baum wollte er dabei hervorheben, dass es sich bei der Apoptose funktionell um einen kontrollierten Zelltod handelt. Erst nach 1972 fand die Apoptose mehr Beachtung in der wissenschaftlichen Welt, und in den letzten Jahrzehnten wurde dann endlich ihre Bedeutung für das Gleichgewicht von Zellwachstum und -entwicklung erkannt [Kerr 2002].

Ein wichtiger Meilenstein in der Apoptoseforschung war die Beschreibung des genetischen Programms der Apoptose am Modellorganismus des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, dessen Ontogenese stets in einer konstanten Zellzahl mündet, ein Phänomen, das Eutelie genannt wird [Brenner 1974]. Mit Mutantenstudien konnte dabei gezeigt werden, dass Apoptose einer genetischen Determination unterliegt und somit eine Form des kontrollierten, programmierten Zelltodes darstellt [Ellis and Horvitz 1986; Sulston 1976; Sulston and Brenner 1974]. Die bei *C. elegans* gewonnenen Erkenntnisse konnten in vielen Punkten auf Vertebraten ausgeweitet werden, indem man zeigen konnte, dass die Expression eines humanen *bcl-2*-Gens in *C. elegans* die Apoptose inhibieren kann [Vaux et al., 1992].

Beschränkte sich bislang die Charakterisierung der Apoptose auf Phänomene des Zellinneren - bisher waren nur intrazelluläre Apoptosemarker entdeckt - so brachte die Entdeckung des an der Zelloberfläche präsentierten Membranlipids Phosphatidylserin neue Anwendungen und starke Vereinfachungen in der Messtechnik mit sich, da nun der Prozess der Apoptose auch durchflusszytometrisch quantifizierbar war [Fadok et al., 1992a; Fadok et al., 1992b].

Mehr als 2% aller Publikationen in den Biowissenschaften befassen sich mit der Apoptoseforschung [Curtin and Cotter 2003], was sich auf einen Boom dieser rasch expandierenden Disziplin seit Beginn der 90er-Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts zurückführen lässt [Melino et al., 2001].

1.2.2 Die Begriffe von Apoptose, Nekrose und programmiertem Zelltod

Vor der Entdeckung der Apoptose als programmiertem Zelltod wurde jede Form des Zelltodes als pathologisch betrachtet. Heutzutage wird differenziert, wobei die pathologische Manifestation des Zelltodes als Nekrose bezeichnet wird. Nekrose ist die Folge zellulären Stresses durch toxische Stimuli. Hierzu werden ionisierende Strahlung, Ischämie, Hypoxie, Hyperthermie, giftige Metaboliten wie Urämietoxine,

immunologische Prozesse wie der Angriff durch das Komplementsystem oder ein direktes Zelltrauma gezählt [Wyllie et al., 1980].

Die Nekrose zeichnet sich dadurch aus, dass die Zelle unter dem schädigenden Einfluss von außen nicht mehr in der Lage ist, ihr inneres Milieu zu kontrollieren. Eine der Folgen ist, dass der Ionentransport über die Membranen zum Erliegen kommt, was in der Folge osmotisch bedingt zum Anschwellen der Kompartimente führt. Infolgedessen steigt der intrazelluläre Druck so lang an, bis die Plasmamembran unter Zytoplasmafreisetzung reißt, es kommt zur Zellyse. Die dadurch in den Extrazellulärraum gelangenden intrazellulären Komponenten können Entzündungsreaktionen im umgebenden Gewebe auslösen [Kroemer et al., 1998].

Im Gegensatz zu dieser unkontrollierten Zellzerstörung erfüllt die Apoptose eine Funktion, sie führt deswegen auch nicht zu inflammatorischen Prozessen oder zur Gewebeauflösung. Zelluläre Signale wie Mangel an Wachstumsfaktoren [Armato et al., 1986], virale Infektionen [Kabelitz et al., 1991] oder Mutationen im Genom können als Stimuli der Apoptose wirken. Trotz der unterschiedlichen Auslösefaktoren verläuft die Signalkaskade der Apoptose immer in einer genau definierten Sequenz morphologischer Charakteristika. Zuerst kondensieren hierbei das Chromatin im Zellkern, das Zytoplasma und die Organellen, allerdings unter Aufrechterhaltung der zellulären Kompartimentierung. Danach fragmentiert der Zellkern, ein Phänomen, das als Karyorhexis bezeichnet wird. Außerdem werden einzelne Vesikel [Kerr et al., 1972] und Membranteile, sog. „membrane blebs“, aus dem Zytoplasma abgeschnürt, bis die gesamte Zelle in membranumhüllte „apoptotic bodies“ zerfällt, in denen die geschrumpften Organellen und Kernfragmente enthalten sind [Green and Reed 1998; Saraste and Pulkki 2000]. Diese „apoptotic bodies“ werden anschließend von den Nachbarzellen erkannt, phagozytiert und abgebaut.

Der Begriff der Apoptose wird häufig mit „programmiertem Zelltod“ erklärt, was ihn allerdings nicht vollständig charakterisiert. Durch den Begriff der Apoptose wird allgemein eine morphologische und biochemische Entität des Zelltodes beschrieben, der als „zellulärer Selbstmord“ zum Schutz anderer Zellen betrachtet werden kann [Ameisen 1994]. Dagegen werden durch den Begriff des „programmierten Zelltodes“ lediglich die apoptotischen Prozesse in der ontogenetischen Entwicklung erfasst. Mit wachsendem Kenntnisstand über die molekularen Mechanismen und Triggerfaktoren muss man diese Begriffe schärfer unterscheiden, da Apoptose nicht zwangsläufig genetisch programmiert sein muss, sondern in jeder Lebensphase durch

unterschiedliche exogene und endogene Stimuli, hauptsächlich Stressfaktoren induziert werden kann.

1.2.3 Signalwege, Mechanismen und Messgrößen der Apoptose

Das Phänomen der Apoptose definierte sich ursprünglich über die beobachtbaren morphologischen Veränderungen, die apoptotische Zellen während des Prozesses durchlaufen. Doch mit wachsendem Kenntnisstand der Apoptoseforschung über molekulare Mechanismen und Signalwege hat sich diese Charakterisierung der Apoptose grundlegend gewandelt. Inzwischen definiert sich Apoptose über spezifische biochemische Vorgänge und wird über daran beteiligte Markermoleküle qualitativ und quantitativ nachweis- und messbar.

Den ersten Meilenstein stellte hierbei die Entdeckung der DNA-Fragmentierung dar, die der Chromatinkondensation folgt. Die dabei entstehenden, unterschiedlich langen DNA-Fragmente lassen sich mit der Methode der Agarose-Gelelektrophorese als sogenannte „DNA ladder“ darstellen [Shi et al., 1990]. Mit Hilfe des TUNEL staining kann die DNA-Fragmentierung inzwischen auch durchflusszytometrisch quantifiziert werden [Loo and Rillema 1998].

Als weiteren Marker kann man die Aktivierung von speziellen Proteasen, die im Apoptoseprogramm aktiviert werden, die sogenannten „Caspasen“, zur qualitativen Charakterisierung des Apoptosevorgangs verwenden. Der artifizielle Name „Caspasen“ soll einige Spezifikationen dieser Proteasen beschreiben; es handelt sich um Cysteinproteasen, die ihr Substrat C-terminal bestimmter Aspartat-Reste spalten (\Rightarrow *C-Asp-asen*) [Alnemri et al., 1996; Black et al., 1989; Cerretti et al., 1992]. Bei den Caspasen wird zwischen zwei Klassen unterschieden, die in einer Signalkaskade sequenziell hintereinander geschaltet sind: (1) Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und (2) Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) [Thornberry and Lazebnik 1998]. Die Aktivierung der initial inaktiven Procaspasen erfolgt mittels limitierter Proteolyse oder autoproteolytisch [Cohen 1997] über zwei verschiedene Signalwege: den extrinsischen und den intrinsischen „Pathway“, die in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt sind.

Der extrinsische Signalweg (siehe Abb. 3!) wird durch die Bindung eines extrazellulären sog. (Todes-) Liganden wie dem FAS-Liganden oder TNF- α an einen membranständigen Rezeptor der „death receptor family“ aktiviert, wodurch ein „death inducing signalling complex“ (DISC) gebildet wird [Krammer 2000], der in der Lage

ist, die Initiatorcaspase-8 zu aktivieren [Danial and Korsmeyer 2004]. Diese wiederum aktiviert die Effektorcaspase-3, die sodann den apoptotischen Zelltod einleitet [Samali et al., 1999; Zhivotovsky et al., 1999].

Der intrinsische Apoptose-Pathway (siehe Abb. 3!) wird durch zellulären Stress wie z. B. chemische Noxen oder UV-Strahlung induziert. Hierbei wirken unterschiedliche Stimuli auf die Mitochondrien und lösen hier eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran aus, entweder durch eine Porenbildung mittels Proteinen der Bcl-2-Familie oder durch einen calciumvermittelten, mehrere Ionenkanäle und Transportproteine involvierenden Prozess, durch den zahlreiche proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c oder der „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF) aus dem Intermembranraum freigesetzt werden [Orrenius 2004; Van Gurp et al., 2003]. Cytochrom c aktiviert die Initiatorcaspase-9, die im Verband mit Apaf-1 und ATP/dATP einen heptameren, radförmigen Komplex, das Apoptosom, bildet [Li et al., 1997]. Die dadurch aktivierte Caspase-9 kann konsekutiv die Effektorcaspasen-3 und -7 aktivieren, die dann den Zelltod initiieren.

Die Aktivierung der Caspasen kann als Apoptosemarker verwendet werden. Hierbei kann man die aktivierte Form im Western-Blot vom inaktiven, unprozessierten Proenzym im Western-Blot unterscheiden. Darüber hinaus lässt sich die Caspasenaktivierung schon mit fluoreszierenden, bei Aktivierung der Enzyme bindenden Substraten durchflusszytometrisch quantifizieren.

Neben der DNA-Fragmentierung und der Caspasenaktivierung lässt sich auch das Zusammenbrechen des mitochondrialen Potentials, wie es beim intrinsischen Signalweg durch die permeable Membran zwangsläufig auftritt, als typisches Apoptosekriterium ebenfalls im Durchflusszytometer bestimmen [Darzynkiewicz et al., 2001b; Darzynkiewicz et al., 2001a].

Für die Erythrozytenapoptose stellt die Phosphatidylserin-(PS)-Exposition den wichtigsten Marker dar, da diese bei allen - auch kernlosen - Zellen beobachtet werden kann. Bei der Induktion der Apoptose wird das Membranlipid PS, das im physiologischen Status der Zelle auf dem inneren Blatt der Zytoplasmamembran lokalisiert ist, auf die äußere Membran externalisiert. Dieses Lipid kann von Makrophagen erkannt werden, woraufhin die apoptotische Zelle phagozytiert wird [Fadok et al., 1992b; Fadok et al., 1998]. Die Phosphatidylserin-Exposition kann ebenfalls durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

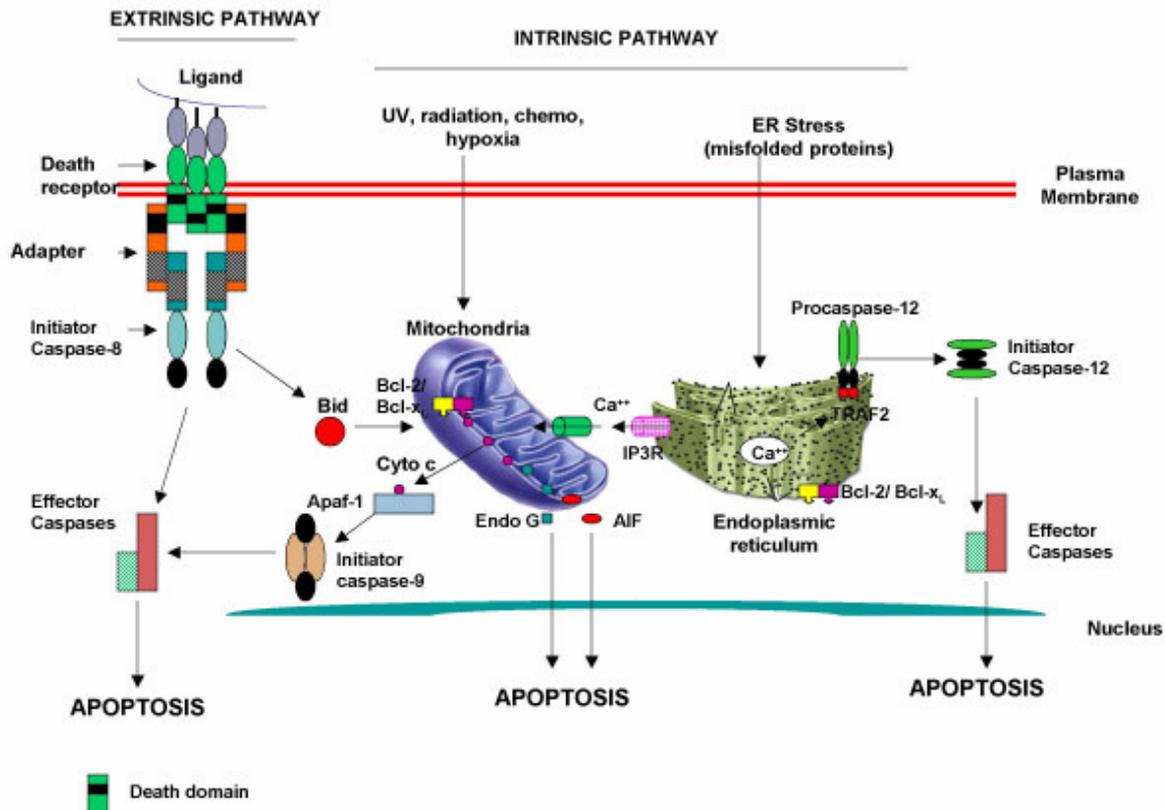


Abbildung 3: *Signalwege der Apoptose (Nähere Erläuterungen siehe Text; Ca⁺⁺ Calcium; alle anderen Abkürzungen bezeichnen an der Apoptose beteiligte Proteine, deren Namen an dieser Stelle nicht relevant sind)*

(nach [Gupta et al., 2006])

1.2.4 Bedeutung und Funktion der Apoptose

Die Annahme bzw. Beobachtung, dass es sich bei der Apoptose um einen exakt regulierten und streng kontrollierten Prozess handelt, erfordert während der ontogenetischen Entwicklung bzw. zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase eine Selektion von durch Apoptose auszusondernden Zellen nach bestimmten, genau definierten Kriterien. Dabei unterscheidet man fünf Kategorien von Kriterien: (1) Zellen, die wahrscheinlich Überreste aus früheren Entwicklungsstufen darstellen und die keine Funktion zu haben scheinen, (2) Zellen, die überschießend proliferieren, (3) Zellen, die sich nicht gemäß ihrer Determination entwickeln, (4) Zellen, die ihre physiologische Funktion schon vollständig erfüllt und ausgereizt haben und (5) Zellen, die dem umgebenden Gewebe schaden [Ellis et al., 1991].

Aus diesen Kriterien zur Induktion des Apoptoseprogramms kann die essentielle Rolle der Apoptose für die Entwicklung und Funktion des Organismus abgeleitet werden. Überflüssige Zellen der Ontogenese werden dabei ebenso beseitigt wie

Zellen, die in der Entwicklung ihre Funktion schon erfüllt haben. Der Prozess der Apoptose ermöglicht mehrzelligen Organismen zu jedem Zeitpunkt, sich überflüssiger oder gar schädlicher Zellen zu entledigen, ohne dabei Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Circa 10^5 Zellen unterschiedlicher Gewebe werden in jeder Sekunde im menschlichen Körper mitotisch gebildet, eine entsprechende Anzahl muss auf der anderen Seite durch Apoptose wieder ausgesiebt werden, um die Zellhomöostase aufrechtzuerhalten [Jacobson et al., 1997]. Eine zentrale Rolle kommt der Apoptose in der Tumorrogression zu, da in neoplastischen Zellen gezielt Apoptose eingeleitet werden kann [Lee and Bernstein 1995]. Gleichmaßen werden bei der Zellmauserung des Immunsystems B- und T-Lymphozyten, die den Qualitätskontrollprozess nicht bestehen und körpereigene Antigene als fremd erkennen und angreifen, mittels Apoptose aus dem Organismus ausgesondert [Jacobson et al., 1997]. Auch beim Abbau virusinfizierter Zellen hat die Apoptose eine essentielle Funktion, die für viele Erkrankungen Relevanz besitzt. Neben diesen protektiven Mechanismen existieren auch einige Erkrankungen, bei denen eine fehlgeleitete Apoptose als Pathogenitätsfaktor vorkommt. Dazu zählen neben Viruserkrankungen wie AIDS [Thompson 1995] viele autoimmun vermittelte und degenerative Erkrankungen [Fadeel and Orrenius 2005; Messmer and Pfeilschiffer 2000]. Einigen Schätzungen zufolge kommt der Apoptose am Pathomechanismus von mindestens 50 % aller Erkrankungen, für die keine suffiziente Therapie existiert, eine zentrale Rolle zu [Reed 2002].

1.3 Erythrozytäre Apoptose/ Eryptose

1.3.1 Entdeckung und Charakteristik der Eryptose

Wie alle anderen Zellen des Blutes sind auch Erythrozyten multiplen Stressfaktoren ausgesetzt, was durch die Zirkulation des Blutes in allen Geweben und Organen bedingt wird; in den großen Gefäßen müssen sie Turbulenzen überwinden, in der Lunge erfahren sie oxidativen Stress, in der Niere passieren sie hyperosmolares Milieu, und in den Kapillaren wirkt mechanischer Stress durch Scherkräfte auf sie – all diese Stressoren sind bekannterweise in der Lage, Apoptose zu induzieren. Da Erythrozyten jedoch weder über einen Zellkern noch über Mitochondrien, zwei Organellen, die substantiell an der Apoptose beteiligt sind, verfügen, stellte sich die Frage, ob in Erythrozyten trotzdem über ein von außen induzierbares Programm eine spezielle Art der Apoptose ausgelöst werden kann.

Die erste wichtige Entdeckung diesbezüglich zeigte, dass rote Blutkörperchen wie kernhaltige Zellen auch Phosphatidylserin auf die äußere Membran externalisieren können, das dann von Makrophagen detektiert wird und zum Abbau dieser Erythrozyten führt [Boas et al., 1998; Kiefer and Snyder 2000], so dass diese Zellen innerhalb einer Stunde vollständig aus dem Blutstrom entfernt werden [Schroit et al., 1985]. In vitro kann man diesen Effekt hervorrufen, indem man Erythrozyten mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin behandelt, was in Phosphatidylserin-Exposition und „membrane blebbing“ resultiert. Dabei stellte sich auch heraus, dass Erythrozyten über die Caspasen 3 und 8 verfügen, für die allerdings bei dieser Form der Apoptose initial auf Grund der fehlenden Mitochondrien keine Relevanz gefunden werden konnte [Berg et al., 2001].

Insgesamt zeigen Erythrozyten eine eigene charakteristische Form der Apoptose, die nur in einigen Faktoren mit der Apoptose kernhaltiger Zellen Kongruenz zeigt [Bratosin et al., 2001] und deswegen mit dem Begriff „Eryptose“ belegt wurde [Lang et al., 2005a]. Die Eryptose ähnelt der oben beschriebenen Senescence in einigen Punkten, muss aber dennoch von ihr abgegrenzt werden [Arese et al., 2005; Barvitenko et al., 2005; Bosman et al., 2005b]. Auch mit der Neozytolyse, einer anderen Form des vorzeitigen Sterbens junger Erythrozyten, ist sie wegen einiger Unterschiede nicht identisch [Rice and Alfrey 2005].

1.3.2 Mechanismen, Signalwege und Charakteristika der Eryptose

Seit ihrer Entdeckung konnten verschiedene, teils ineinander greifende, teils voneinander unabhängige Signalwege der Eryptose identifiziert werden.

Dabei scheinen Caspasen, deren Präsenz und Funktion im Erythrozyten nachgewiesen werden konnten [Berg et al., 2001], doch Effekte auf das Eryptoseverhalten zu zeigen. Allerdings sind diese in ihrer Bedeutung nicht mit der essentiellen Rolle zu vergleichen, die Caspasen in kernhaltigen Zellen spielen. [Mandal et al., 2005; Matarrese et al., 2005]. Als zentraler Faktor der Eryptose fungiert schließlich nicht die Proteindegradation, sondern die Exposition von Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche, die die gemeinsame Endstrecke aller Signalwege der Eryptose bildet und durch das calciumabhängige Enzym oder den Enzymkomplex Scramblase vermittelt wird. Im physiologischen Zustand der Zelle ist das gesamte PS an der inneren Zytoplasmamembranseite lokalisiert, was ATP-abhängig vom Enzym Translokase kontrolliert wird, das PS bei akzidenteller

Exposition wieder internalisiert [Seigneuret and Devaux 1984]. Durch das scrambling, das vom Scramblasekomplex vermittelt wird, kann PS auf das äußere Blatt der Membran gelangen [Zhou et al., 2002], wo es von Makrophagen erkannt werden kann, die derart markierte Erythrozyten abbauen [Fadeel 2004; Messmer and Pfeilschifter 2000].

Wie die Ergebnisse der Ionomycin-Experimente andeuten, wird der erste Eryptose-Weg, der zur Aktivierung des PS-scrambling führt, durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eingeleitet. In vivo werden dabei Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle aktiviert, woraufhin Calciumionen ins Zellinnere einströmen [Lang et al., 2003a; Lang et al., 2003b; Lang et al., 2005c]. Ca^{2+} kann daraufhin Calcium-sensitive Kaliumkanäle, die sogenannten „Gardos-Kanäle“, aktivieren, was in einem Ausstrom von K^+ , Cl^- und Wasser, das osmotisch mitgezogen wird, aus der dadurch schrumpfenden Zelle resultiert [Lang et al., 2003c; Myssina et al., 2004]. Neben den Kaliumkanälen werden auch die für das Scrambling verantwortlichen Enzyme calciumabhängig aktiviert, die die PS-Exposition vermitteln [Dekkers et al., 2002; Woon et al., 1999], während die antagonistischen Translokasen inhibiert werden. Deswegen fungiert die intrazelluläre Calciumkonzentration, die über zwei Mechanismen Eryptose auslöst, als einer der wichtigsten Triggerfaktoren der PS-Exposition und der Zellschrumpfung.

Stressoren wie oxidativer Stress [Duranton et al., 2002], chloridfreie Lösung [Huber et al., 2001] (Chloridionen inhibieren diese Kanäle!), und osmotischer Schock in stark hyperosmolarer (850 mOsm) Lösung [Lang et al., 2005a; Lang et al., 2002] stellen effektive Aktivatoren der Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle dar. Als ein wichtiger physiologischer Inhibitor dieser Kanäle konnte das Glykoproteinormon Erythropoietin (Epo) identifiziert werden [Myssina et al., 2003]. Tatsächlich ist Epo in der Lage, Eryptose zu inhibieren und so das Erythrozytenüberleben zu regulieren [Polenakovic and Sikole 1996].

Neben den oben genannten Effekten kann eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration außerdem die sogenannten „Calpain-Proteasen“ aktivieren, die die Struktur des Zytoskeletts angreifen und auflösen [Pant et al., 1983].

In chloridfreier und hyperosmolarer Lösung wird das Eryptosesignal zusätzlich über die Aktivierung der Cyclooxygenase (COX) und infolgedessen durch die Freisetzung von Prostaglandin E_2 als wichtigem Mediator der Eryptose, weitergeleitet [Kaestner

and Bernhardt 2002; Lang et al., 2005c]. Entsprechend ist die dadurch ausgelöste Eryptose durch COX-Inhibitoren inhibierbar.

Den dritten wichtigen Triggerfaktor für die Induktion der Eryptose neben Calcium und PGE₂ stellt das Lipid Ceramid dar [Lang et al., 2004a; Lang et al., 2005d], das durch sogenannte Sphingomyelinasen, membranständige oder zytosolische Enzyme, gebildet wird, die die Phosphodiesterbindung des Membranlipids Sphingomyelin unter Ceramidbildung spalten. Ceramid bildet auch in kernhaltigen Zellen einen wichtigen Triggerfaktor der Apoptose; dort allerdings entfaltet es seine Wirkung hauptsächlich über die Mitochondrien [Frago et al., 1998; Goldkorn et al., 1998; von Haefen et al., 2002; Woodcock 2006]. In Erythrozyten ist der Wirkmechanismus noch nicht genau aufgeklärt. Dabei wird diskutiert, ob Ceramid eventuell den Scrambling-Apparat für intrazelluläres Calcium sensibilisiert [Lang et al., 2004a]. Die Sphingomyelinasen und somit die erythrozytäre Ceramidbildung werden durch „Platelet activating factor“ (PAF) aktiviert, den Erythrozyten zum Beispiel in hyperosmolarer Lösung ausschütten [Lang et al., 2006b; Lang et al., 2005d], durch Kupfer-(II)-ionen [Lang et al., 2007] und durch das Alzheimer-Amyloid A β ₁₋₄₂ [Nicolay et al., 2007]. Ein effektiver Inhibitor der Sphingomyelinasen konnte im Harnstoff identifiziert werden [Lang et al., 2004b]. Dadurch lässt sich auch erklären, dass trotz des hyperosmolaren Milieus bei der Nierenpassage die Erythrozyten vor der Apoptose geschützt werden, was einerseits durch die Chloridkonzentration, die den Kationenkanal inhibiert, und andererseits durch die hohe Harnstoffkonzentration, die die Ceramidbildung hemmt, vermittelt wird.

Außerdem kann Energiedepletion zur Aktivierung des Eryptose-Signallings führen. Dabei stellt die Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration und des Gehaltes an reduziertem Glutathion (GSH), die über den Glucosemetabolismus aneinander gekoppelt sind, einen essentiellen Faktor dar. Der Energiemangel kann durch eine Reduktion des Glucoseangebots der Zelle ausgelöst werden. Dies führt zur Erhöhung des oxidativen Stresses durch mangelnde Substratkonzentration für den Pentosephosphatweg und somit zu verminderter GSH-Regeneration [Lang et al., 2002; Mavelli et al., 1984]. Das Signal der Glucosedepletion aktiviert zusätzlich die Proteinkinase C (PKC), die ebenfalls einen proeryptotischen Effekt ausübt, wahrscheinlich über einen Calciumeinstrom [Andrews et al., 2002; Klarl et al., 2006], und über den oxidativen Stress, der auch Caspasen aktiviert [Matarrese et al., 2005]. Aber nicht nur ein vermindertes Glucoseangebot, sondern auch die Hemmung von

Glycolyse oder Pentosephosphatweg können zum gleichen Signalling führen, da der resultierende Effekt derselbe ist. Diese Inhibition des Glucosestoffwechsels kann z. B. durch toxische, pathologisch gebildete Glucosemetabolite wie Methylglyoxal vermittelt werden [Nicolay et al., 2006].

Darüber hinaus existieren noch viele Stimuli und Signalwege wie die Aktivierung des PS-scrambling durch Membranrezeptoren, z. B. durch CD 47 oder Glykophorin [Head et al., 2005a; Head et al., 2005b]. Deswegen wird noch einiges Forschungspotential aufgewendet werden müssen, diese Wege genauer zu charakterisieren. In der folgenden Abbildung 4 sind nochmals die wichtigsten Signalwege der Eryptose dargestellt.

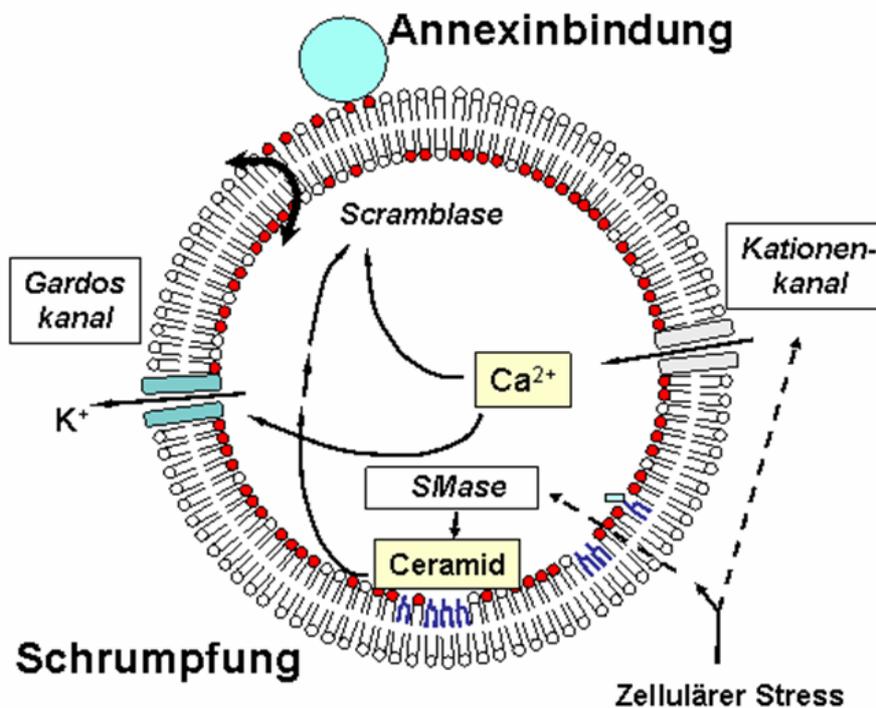


Abbildung 4: Die wichtigsten Signalwege der Eryptose (Näheres siehe Text. SMase= Sphingomyelinase)

(nach [Lang et al., 2006a])

1.3.3 Medizinische und biochemische Relevanz der Eryptose

Die Aufklärung der Mechanismen erythrozytärer Apoptose ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern kann ebenso als Modell für die biochemische Aufklärung von Apoptoseprozessen wie auch zur Erklärung medizinischer Phänomene verwendet werden. Erythrozyten liefern zum einen ein gutes Modell caspasen- und nucleasenunabhängiger Signalwege der Apoptose liefern, da

calcium- und ceramidvermittelte Apoptose auch bei kernhaltigen Zellen auftritt, wobei sie an Erythrozyten auf Grund ihres viel einfacheren Aufbaus und der wenigen zu berücksichtigenden Stoffwechselwege sehr viel einfacher und eindeutiger zu untersuchen ist.

Daneben zeigte sich, dass die Eryptose in vivo die Funktion hat, unter zellulärem Stress kontrolliert und früher als die Hämolyse einzusetzen [Lang et al., 2006c] und diese somit zu verhindern. Dadurch können der Kreislauf und die Nieren vor systemischen Komplikationen der Hämolyse wie dem Auftreten disseminierter intravasaler Koagulation (DIC) oder der Ausbildung von „Crush-Nieren“ bewahrt werden, dennoch manifestiert sich diese gesteigerte Eryptose durch den Zellverlust klinisch in der Ausbildung einer hämolytischen Anämie, die allerdings nicht von klassischer Hämolyse herrührt. Deswegen sind viele Erkrankungen mit hämatologischen oder zirkulatorischen Symptomen mit dem Auftreten erhöhter Eryptoseraten verbunden. Dazu zählen natürlich in erster Linie Krankheiten, deren Pathologie direkte Fehlbildungen der Erythrozyten bedingt wie die Sichelzellanämie, Thalassämien und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel [Lang et al., 2002]. Hierzu zählen ebenfalls Phosphatmangel [Birka et al., 2004] und die Eisenmangelanämie [Kempe et al., 2006b]. Eine deutlich verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten war auch bei einigen Schwermetallvergiftungen, zum Beispiel mit Blei oder Quecksilber [Eisele et al., 2006; Kempe et al., 2005] zu verzeichnen. Zahlreiche hämolytische Anämien, die als Nebenwirkung der Gabe von Medikamenten wie Chlorpromazin, Paclitaxel und Cyclosporin A auftreten, lassen sich auf gesteigerte Eryptoseaktivität zurückführen [Akel et al., 2006; Lang et al., 2006d; Niemoeller et al., 2006].

Schließlich sind noch Erkrankungen zu erwähnen, die zusätzlich zur Anämie auch noch zirkulatorische Störungen mit sich bringen. PS-exponierende Erythrozyten zeigen eine erhöhte Affinität zur endothelialen Membran und bleiben sehr leicht an Endothelzellen haften, was zu richtigen Konglomeraten von eryptotischen Zellen und darauf folgenden Endothelläsionen führen kann [Gallagher et al., 2003]. Deswegen kann in diesem Fall die Eryptose neben vielen anderen Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen und Störungen der Hämostase spielen [Andrews and Low 1999]. Erkrankungen, bei denen das Relevanz zeigt, sind das hämolytisch-urämische Syndrom mit Faktor-H-Mangel [Lang et al., 2006c], der Diabetes mellitus Typ II [Nicolay et al., 2006] und Amyloiderkrankungen wie der M.

Alzheimer [Nicolay et al., 2007]. Auch die Sepsis zählt hierzu [Kempe et al., 2006a]. Dabei zeigt sich die physiologische Funktion der Eryptose, die eigentlich die Erythrozyten vor Hämolyse bewahren und somit den Organismus vor der begleitenden immunologischen Reaktion und Nierenschädigung schützen soll. Allerdings kann sie in überschießendem Maß ebenso wie die Hämolyse eigenen Krankheitswert annehmen, da die Regulationsmechanismen bei Dekompensation der genannten Erkrankungen insuffizient werden, so dass die Eryptose selbst den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen kann.

1.4 NO – kleines Molekül, große Wirkung

1.4.1 Biosynthese von NO

Dem Molekül Stickstoffmonoxid (NO), einem der wenigen gasförmigen Signalmoleküle, kommt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse von Vertebraten zu. In diesen Organismen wird das bioaktive Molekül durch drei verschiedene bekannte Isoformen des Enzyms NO-Synthase (NOS), gebildet [Alderton et al., 2001]: 1. die induzierbare NOS (iNOS), die eine Rolle bei der immunologischen Abwehr spielt [Liew 1995a; Liew 1995b], 2. die endotheliale NOS (eNOS), die fundamental an der Blutdruckregulation, aber auch an anderen Prozessen beteiligt ist [Giraldez et al., 1997], und 3. die neuronale NOS (nNOS), die mit ihrer Funktion an der Langzeitpotenzierung im Hippocampus des zentralen Nervensystems beteiligt ist [Paakkari and Lindsberg 1995]. Das von den verschiedenen Formen der NO-Synthase produzierte NO wird dabei aus der Aminosäure Arginin, NADPH und Sauerstoff unter Bildung von Citrullin, NADP⁺ und NO synthetisiert [Alderton et al., 2001]; dieser Prozess ist bei der eNOS durch Calcium und Calmodulin reguliert. Erythrozyten werden unter physiologischen Bedingungen im gesunden Organismus hauptsächlich von der Wirkung der eNOS betroffen, so dass der Schwerpunkt bei der Erklärung von Rolle und Funktion auf diesem Enzym und dem von ihm gebildeten NO liegen soll. Die Zusammensetzung des Enzyms eNOS aus seinen zwei Untereinheiten, dem Reduktase- und dem Oxygenase-Anteil, seine Cofaktoren FAD, FMN und BH₄, die es zur Übertragung der Reduktionsäquivalente benötigt, und die katalysierte Synthesereaktion bzw. somit Funktion des Enzyms sind in nachfolgender Abbildung 5 dargestellt.

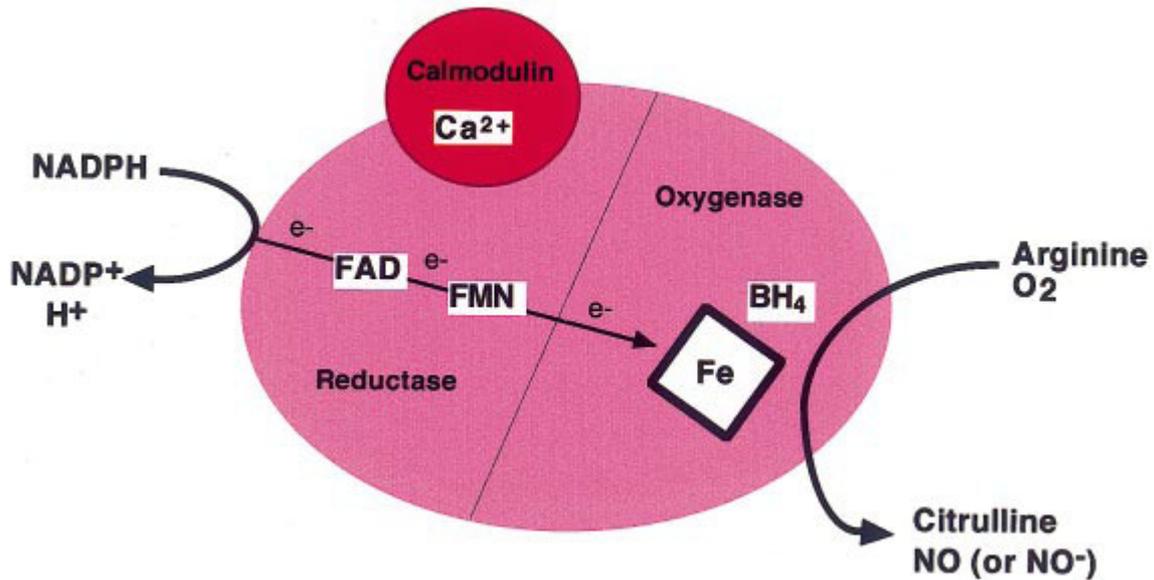


Abbildung 5: *Biologische NO-Synthese durch die endotheliale NOS.* (Näheres siehe Text. FAD=Flavin-Adenin-Dinukleotid; FMN=Flavinmononukleotid; BH₄=Tetrahydrobiopterin)

(nach [Alderton et al., 2001])

1.4.2 Wirkung von NO auf Gefäße und Kreislauf

Das hochdiffundible gasförmige Signalmolekül NO stellt einen sehr effizienten Vasodilatator dar, da es durch die von ihm ausgelöste Signalkette relaxierend auf glatte Muskelzellen wirkt. Schon lange wurde ein vasodilatativ wirksames Agens postuliert, das durch das Endothel selbst gebildet wird und para- bzw. autokrin gefäßerweiternd wirkt, und entsprechend als „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet [Forstermann et al., 1984; Griffith et al., 1984], wobei sich Jahre später herausstellte, dass es sich hierbei um das Molekül NO handelte [Hutchinson et al., 1987; Ignarro et al., 1988; Palmer et al., 1987]. Das NO-Molekül ist durch seinen radikalischen Charakter hochreaktiv, es verfügt lediglich über eine Halbwertszeit von einigen Sekunden [Angus and Cocks 1987]; auf Grund seiner geringen Größe ist es außerdem in der Lage, biologische Membranen frei zu permeieren. Diese Eigenschaften machen NO zu einem idealen Signalmolekül für eine schnelle und gleichzeitig nur transiente Gefäßerweiterung.

Da NO über viele biologische Funktionen verfügt, sind auch die Signalwege all dieser Wirkmechanismen sehr unterschiedlich. Bei der Gefäßrelaxation spielen die eNOS, die hauptsächlich im vaskulären Endothel exprimiert wird, und die lösliche Guanylatcyclase (sGC) eine zentrale Rolle. Das von der e-NOS durch Bindung von einem Calcium-Calmodulin-Komplex (s. Abb. 5) freigesetzte NO-Molekül bindet

hierbei an ein Fe-II-Ion, das in einer Häm-Gruppe des Enzyms gebunden ist. Die dadurch erzeugte Konformationsänderung der sGC aktiviert das Enzym und führt zur Konversion von GTP zu cGMP. cGMP wiederum aktiviert verschiedene Proteinkinasen wie die Proteinkinase G und auch cGMP-abhängige Ionenkanäle, die u. a. über die Aktivierung der Ca²⁺-ATPase eine Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirken, wodurch sich die glatte Muskelzelle relaxiert [Vaandrager and de Jonge 1996].

Klinisch relevant ist NO hauptsächlich insofern, als bei vielen kardiovaskulären Manifestationen und Erkrankungen wie im Falle der essentiellen Hypertonie, der Hypercholesterinämie oder dem Diabetes mellitus eine deutlich reduzierte Konzentration von biologisch verfügbarem NO beobachtet werden kann. Deswegen betrachtet man diese Konzentrationsabnahme als frühes klinisches Korrelat einer atherosklerotischen Gefäßveränderung [Ignarro and Napoli 2004; Napoli et al., 2006]. NO hat hierbei multiple vaso- und endothelprotektive Wirkungen : es inhibiert Kontraktion und Proliferation von glatten Muskelzellen und bewirkt somit ein suffizientes Lumen der Gefäße. Außerdem hemmt es die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten sowie die Adhäsion von Makrophagen. Auch die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel wird gestoppt. Diese Effekte halten ebenfalls das vaskuläre Lumen durch Verhinderung der Atherombildung und die Inaktivierung von Thrombozyten offen und wirken dadurch vasoprotektiv [Massoudy et al., 1999]. Die Reduktion der intravaskulären Konzentration von Stickstoffmonoxid korreliert folglich mit einer Reduktion der protektiven, anti-atherosklerotischen Mechanismen und Faktoren.

Auch die iNOS ist kreislaufrelevant, allerdings nur im pathologischen Zustand. Sie wird hauptsächlich von immunologisch relevanten Zellen wie Makrophagen nach Pathogenkontakt exprimiert und wird calciumunabhängig durch bakterielle Endotoxine und körpereigene Zytokine wie TNF- α oder Interleukin-1 aktiviert. Die hierbei freigesetzte NO-Menge hängt auf Grund der fehlenden Regulation des Enzyms hauptsächlich von der verfügbaren Enzymmenge ab und kann sogar um einen Faktor 10³ höher sein als bei der eNOS. In diesen Konzentrationen wirkt NO zytotoxisch, und es kommt durch die oben beschriebenen Mechanismen zu einer exzessiven Gefäßweiterung mit Kreislaufzentralisierung und Blutdruckabfall, dem gefürchteten septischen Schock [Kilbourn and Griffith 1992].

1.4.3 NO und Erythrozyten

Nachdem die Wirkung von NO auf Endothelzellen eingehend studiert und aufgeklärt war, lag als nächster Schritt nahe, genauer zu erforschen, ob NO auch auf Blutzellen, die den Endothelzellen am nächsten lokalisiert sind, modifizierende Wirkungen ausübt. Ferner stellte sich die Frage, ob diese Zellen eventuell sogar in der Lage wären, selbst NO zu produzieren. Für unsere Experimente und Fragestellungen sind besonders die Erythrozyten von Interesse.

Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass vom Endothel produziertes NO in das Gefäßlumen diffundiert, entweder unmodifiziert, an Lipide oder andere Biomoleküle gebunden oder zum Nitrit oxidiert vom Erythrozyten aufgenommen werden kann. Dort bindet es an desoxygeniertes Hämoglobin [Dejam et al., 2005]. Diese Bindung ist relativ stabil und dennoch reversibel, so dass dieses Nitroso-Hämoglobin-Molekül eine ideale Speicherform für NO darstellt. Bei Bedarf kann es dann sehr schnell und effizient wieder ins Gefäßlumen freigesetzt werden.

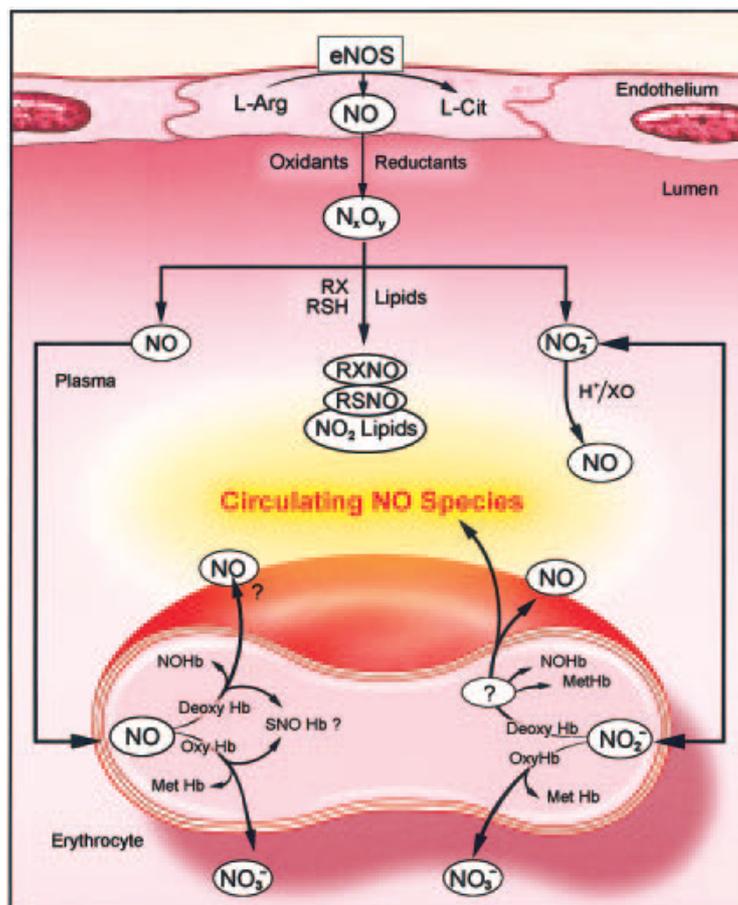


Abbildung 6: Wechselwirkungen von endothelial synthetisiertem NO mit Erythrozyten. Näheres siehe Text. L-Arg = Arginin; L-Cit = Citrullin; NO_2^- = Nitrit; NO_3^- = Nitrat; Hb = Hämoglobin)

(nach [Dejam et al., 2005])

NO kann auch an andere Proteinseitenengruppen reversibel binden. Außerdem wird es intrazellulär zu Nitrit und Nitrat oxidiert und kann bei Bedarf wieder zu NO reduziert werden. Diese Mechanismen sind in Abbildung 6 nochmals dargestellt. Tatsächlich wird postuliert, dass Erythrozyten durch die günstige Eigenschaft der stabilen, doch reversiblen Bindung an Hämoglobin den Hauptspeicherort für NO im Gefäßsystem darstellen, da sie NO in großen Mengen aufnehmen und speichern können, ohne dass es dabei zerfällt oder inaktiviert wird, und bei Bedarf schnell und effizient wieder freisetzen können. Außerdem können Erythrozyten, z. B. unter hypoxischen Bedingungen, die NO-Freisetzung aus dem Endothel und so die Hypoxie-bedingte Vasodilatation beeinflussen [Crawford et al., 2006].

Nachdem nun evident war, dass Erythrozyten für das NO-Signalling eine solch essentielle Rolle spielen, war interessant, ob Erythrozyten selbst NO produzieren können. Hierbei wurde in einigen Studien recht früh eine NOS in roten Blutzellen postuliert [Chen and Mehta 1998], allerdings wurde diese sehr lange als inaktiv angesehen [Kang et al., 2000]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten über eine aktive NOS verfügen, die relevant NO synthetisieren kann, ähnlich funktioniert und ebenfalls u.a. über Calcium reguliert wird wie die eNOS [Kleinbongard et al., 2006].

Wenn Erythrozyten über eine funktionelle NOS verfügen, stellt sich als nächstes natürlich die Frage, ob NO für diese Zellen neben der Nutzung als Speicherort auch direkte regulatorische Signalwirkungen zeigt. Als Effekte von NO auf Erythrozyten sind dabei bisher hauptsächlich die Regulation der zellulären Deformierbarkeit über Wirkungen auf das Zytoskelett und die Inaktivierung von Thrombozyten zu nennen, was den protektiven Effekt auf kardiovaskuläre Erkrankungen miterklärt [Kleinbongard et al., 2006].

1.4.4 NO und Apoptose

Zu den zahlreichen Wirkungen und Wegen, bei denen das Molekül NO an der Signaltransduktion beteiligt ist, gehören auch Effekte auf die Signalkaskaden der Apoptosestimulation bzw. -inhibition, die inzwischen auch Inhalt zahlreicher Studien sind. Hierbei konnten viele Knotenpunkte identifiziert werden, an denen NO das Apoptoseverhalten kernhaltiger Zellen beeinflusst.

Bemerkenswert ist hierbei, dass NO abhängig von seiner Konzentration und dem physiologischen bzw. pathophysiologischen Kontext, in dem es wirkt, sowohl pro- als

auch antiapoptotisch wirken kann [Benhar and Stamler 2005; Dimmeler and Zeiher 1997; Melino et al., 1997]. Diese Beobachtung lässt sich sehr gut mit den Funktionen der verschiedenen Isoformen der NO-Synthase korrelieren.

So schreibt man der eNOS parallel zu ihrer gefäßprotektiven, vasodilatativen Wirkung auch eine antiapoptotische Wirkung zu. Auf die Apoptose von Endothelzellen, aber auch vieler anderer Zellen wirkt NO, das von der eNOS synthetisiert wird, in physiologischen Konzentrationen protektiv [Dimmeler et al., 1997b; Dimmeler et al., 1997a; Dimmeler and Zeiher 1999]. Durch die Vasodilatation soll das Gefäß vor mechanischem Stress durch Druck und Scherkräfte geschützt werden, so dass der antiapoptotische Effekt synergistisch wirkt.

Die iNOS hingegen wird in immunologischem Kontext aktiviert. Ihre Rolle besteht hauptsächlich in der Pathogenabwehr, indem sie in immunkompetenten Zellen wie neutrophilen Granulozyten NO in supraphysiologischen und somit zytotoxischen Konzentrationen produziert [Liew 1995a]. Somit ist nun evident, dass sie durch ihre NO-Synthese sinnvollerweise proapoptotisch wirkt, was sich tatsächlich experimentell bestätigte [Bao et al., 2007; Taylor et al., 2003]. Dieser Effekt begründet sich natürlich teilweise in den hohen Konzentrationen von NO, das auf Grund seines radikalischen Charakters hochreaktiv ist und die Zelle massivem oxidativen Stress aussetzt. Neben dieser rein chemischen Wirkung sind aber auch andere wirkliche Signalmechanismen bekannt, die in diesem Zusammenhang die Apoptose triggern. Der wichtigste hierbei ist die S-Nitrosylierung von Proteinen [Duan and Chen 2007]. S-Nitrosylierung bezeichnet dabei ein wichtiges Regulationsprinzip von Proteinen, die durch Bindung von NO an Thiolgruppen von regulatorischen Cystein-Resten in der Aminosäuresequenz Konformations-änderungen erfahren und dadurch aktiviert oder inaktiviert werden [Lipton et al., 1994]. Diese Apoptose induzierende Wirkung von NO durch Protein-S-Nitrosylierung ist bei der immunologischen Pathogenabwehr beschrieben, bei der proapoptotisch wirksame Proteine des Erregers nitrosyliert werden, wie auch bei der Selektion von T-Lymphozyten, bei deren Mauserung immuninkompatible Zellen durch Nitrosylierung zur Apoptose aktiviert werden [Duan and Chen 2007; Liew 1995b].

Auch die antiapoptotische Wirkung von NO entfaltet sich mit Hilfe mehrerer, voneinander weitgehend unabhängiger Signalwege. Der wichtigste hierbei ist wiederum die S-Nitrosylierung von Protein-Thiolgruppen. Nitrosylierung kann also abhängig von der Zellart bzw. der Proteinausstattung der Zelle und von der NO-

Konzentration Apoptose induzieren oder inhibieren [Benhar and Stamler 2005; Melino et al., 1997]. Zu den antiapoptotisch wirksamen Proteinen, die durch S-Nitrosylierung aktiviert werden, gehört z. B. das Thioredoxin, das auch maßgeblich beteiligt ist bei der Abwehr von oxidativem Stress [Haendeler et al., 2002]. Gleichmaßen können außerdem proapoptotisch wirksame Enzyme wie das Interleukin-1-converting-enzyme (ICE) oder die Cysteine protease protein (CPP)-32-like Proteasen durch S-Nitrosylierung inaktiviert werden [Dimmeler et al., 1997a], was die gleiche protektive Wirkung hat. Umgekehrt können auch proapoptotisch wirksame Faktoren wie oxidiertes low-density Lipoprotein (oxLDL) oder TNF- α die S-Nitrosylierung protektiver Proteine aufheben und somit Apoptose auslösen [Hoffmann et al., 2001].

Ein weiterer Weg der Apoptoseinhibierung durch NO bedient sich des cGMP-Signalwegs. Wie in 1.4.2 beschrieben, aktiviert NO die sGC und somit die cGMP-Synthese. Dieses Second-messenger-Molekül wiederum ist in der Lage, antiapoptotisch wirksame Ionenpumpen wie die Ca²⁺-ATPase und Proteinkinasen wie die Proteinkinase G zu aktivieren [Das et al., 2006; Li and Billiar 1999; Nagai-Kusuhara et al., 2007]. Speziell die calciumvermittelten caspasenunabhängigen Apoptosewege, wie sie sich auch bei Erythrozyten finden, können neben anderen auf diesem Wege effizient inhibiert werden.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Fragestellung, die uns zur Durchführung der vorliegenden Experimente veranlasst hat, lautet, ob das Signalmolekül Stickstoffmonoxid, das im kardiovaskulären System eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion spielt und in zahlreichen kernhaltigen Zellpopulationen konzentrationsabhängig und auf verschiedenste Weise das Apoptoseverhalten beeinflusst, auch in gesunden Erythrozyten Effekte bei der Triggerung der Eryptose zeigt.

Die pro- und die antiapoptotischen Wirkungen, die in verschiedenen Geweben gezeigt werden konnten, beruhten in den meisten Fällen auf der Einflussnahme auf den caspasenabhängigen und mitochondrialen Weg der Apoptose [Benhar and Stamler 2005; Melino et al., 1997]. Unsere Zielsetzung bestand deswegen im Nachweis, ob auch caspasenunabhängige Signalwege an der Eryptose beteiligt sind, für die die Erythrozyten in ihrem Apoptoseverhalten ein gutes Modell darstellen, und ob zusätzlicher Zellstress auch noch die Wirkungen von NO beeinflussen kann.

Neben der Frage, ob Apoptose beeinflusst wird, stand natürlich in der Konsequenz, welche Signalwege evtl. daran beteiligt wären, da im Erythrozyten mehrere Signalwege der Apoptoseauslösung beschrieben sind.

NO-Donatoren werden klinisch für einige kardiovaskuläre Indikationen als Therapeutikum eingesetzt [Katsumi et al., 2007]. Deswegen war als weitere Frage interessant, ob NO durch einen eventuellen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Erythrozyten in der Lage sei, hämolytische Anämien, die durch Erythrozytenapoptose verursacht werden wie im Falle des Morbus Wilson [Lang et al., 2007] oder des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms [Lang et al., 2005b], entweder auszulösen bzw. zu verstärken oder bei gegenteiliger Wirkung positiv zu beeinflussen. In diesem letzteren Fall, also wenn die Eryptose durch NO suffizient supprimiert werden könnte, könnte man als zusätzliche Indikation zur NO-Therapie die Behandlung hämolytischer Anämien oder Symptome erwägen, die auf Eryptose beruhen, wie sie z.B. im Falle des hämolytisch-urämischen Syndroms oder der Sepsis nachgewiesen werden konnten [Kempe et al., 2006a; Lang et al., 2005b].

2 Materialien und Methoden

2.1 Erythrozyten und Mäuse

Da Erythrozyten nicht teilungsfähig sind, lassen sie sich nicht in Kultur halten. Für die vorliegenden Experimente mussten sie deshalb jeweils frisch abgenommen werden. Hierbei wurden für die Experimente mit humanen Erythrozyten nur Zellen von gesunden Spendern verwendet, deren schriftliches Einverständnis durch ihre Unterschrift auf einem Aufklärungs- und Einverständniserklärungsbogen dokumentiert vorlag. Die experimentelle Studie und somit auch die Gewinnung der Erythrozyten wurde von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen genehmigt (Projekt Nummer 184/2003V). Für alle Experimente, für die nicht explizit ein abweichender Hämatokrit angegeben ist, wurden die Erythrozyten mit einem Hämatokrit von 0,3 % immer in der entsprechenden Lösung unter Zugabe der jeweils angegebenen Reagenzien bei 37 °C inkubiert.

Für die Experimente mit Mäuseerythrozyten wurden eNOS^{-/-}-Mäuse und gleichaltrige Kontrolltiere vom Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt [Brandes et al., 2000]. Die Mäuse wurden gemäß den Bestimmungen des "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Institutes of Health publication No. 85-23) aufgezogen und gehalten. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurden jeweils einmal pro Woche 50 -100 µl Blut aus der Schwanzvene abgenommen; anschließend wurde das Blut mit 1000 x g zweimal 5 Minuten lang in Glaskapillaren abzentrifugiert, so dass die Erythrozyten danach als Konzentrat aus der Kapillare abgesaugt werden konnten. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 100 µl Ringerlösung und jeweils anschließenden Zentrifugationsschritten waren die Zellen dann für die Experimentalansätze bereit.

2.2 Verwendete Reagenzien

Die für die einzelnen Experimente verwendeten Reagenzien wurden in den dort jeweils angegebenen Konzentrationen in den entsprechenden dort ebenfalls angegebenen Lösungen eingesetzt. Das in einigen Versuchen als Lösungsmittel für die Reagenzien eingesetzte DMSO erreichte in den Versuchsansätzen maximale Konzentrationen von < 0,1 % und wurde den Kontrollansätzen in gleicher Konzentration beigefügt. Alle im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen

bezeichnen die Endkonzentrationen der jeweils eingesetzten Reagenzien, denen die Erythrozyten im fertigen Experimentalansatz ausgesetzt waren.

Der NO-Donator Natriumnitroprussid ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$) (zur genauen Funktion und Verwendung siehe Einleitung!) wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen, Germany) in der Form des Dihydratsalzes erworben und in Konzentrationen von 1 nM bis 1 mM in den Versuchsansätzen verwendet. Auf Grund der großen Instabilität dieser Verbindung, die lediglich über eine Halbwertszeit von 3-4 Minuten verfügt, wurde zur Aufrechterhaltung der Konzentration in den Ansätzen, deren Inkubationszeit mehrere Stunden betrug, alle 5 Minuten für 1 Stunde lang Nitroprussid zu den Ansätzen hinzupipettiert bei Inkubationszeiten ≤ 24 Stunden; betrug die Inkubationszeit 48 Stunden, wurde Nitroprussid auf die gleiche Weise nochmals am nächsten Tag hinzugegeben. Die bei kernhaltigen Zellen limitierende durch den Zerfall von Nitroprussid Menge an Cyanid-Ionen besitzt für die Erythrozyten deswegen keine Relevanz, da diese Zellen nicht über die Fähigkeit zur ATP-Produktion über oxidative Phosphorylierung verfügen, für die Cyanid toxisch wirkt.

Als weiterer NO-Donator wurde Papa-NONOate (NOC-15) verwendet, dessen NO-Freisetzung auf einem anderen Prinzip beruht als die von Natriumnitroprussid. Die Halbwertszeit dieses Moleküls ist deutlich länger als die des Nitroprussids [Keefer et al., 1996], so dass hier eine einmalige Zugabe einer höheren Konzentration mit anschließender langsamer und gleichmäßigerer Freisetzung von NO den annähernd gleichen Effekt in Bezug auf die NO-Konzentration in der Lösung erzielte wie die für Nitroprussid angewendete Technik. Die verwendete Konzentration von Papa-NONOate, ebenfalls von der Firma Sigma, betrug bei allen durchgeführten Experimenten 100 μM und entsprach damit den für diese Anwendung empfohlenen und in der Literatur eingesetzten Konzentrationen beziehungsweise lag sogar darunter [Zeigler et al., 2003].

Ionomycin wurde als Calcium-Ionophor verwendet, da es durch gradientengetriebenen Transport ionenkanalunabhängig die intrazelluläre Calciumionenkonzentration drastisch erhöhen kann. Es wurde ebenfalls bei der Firma Sigma gekauft und einerseits als potentes Stimulans calciuminduzierten Erythrozytenzelltodes in einer Konzentration von 0,1 μM , andererseits als Positivkontrolle für die Bestimmung des intrazellulären Calciumgehaltes in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt.

Fluo-3/AM als calciumsensitiver Farbstoff eignet sich für die durchflusszytometrische Calcium-Konzentrationsbestimmung wegen seiner Ca^{2+} -konzentrationsabhängigen Fluoreszenzintensität. Der Stoff wurde bei der Firma Calbiochem (Bad Soden, Germany) erworben; die Erythrozyten wurden für die Ca^{2+} -Messung mit einer Konzentration von 8 μM Fluo-3/AM beladen.

C_6 -Ceramid (N-Hexanoyl-D-sphingosine) wurde als Stimulans der ceramidvermittelten Erythrozytenapoptose eingesetzt. Für die entsprechenden Experimente wurde C_6 -Ceramid von der Firma Sigma in einer Konzentration von 3 μM verwendet.

$\text{N}^2,2'$ -O-Dibutyrylguanosin 3',5'-zyklisches Monophosphat (db-cGMP) diente als Analogon zum physiologisch durch NO freigesetzten cGMP und somit zum Überprüfen des Signalweges in unseren Experimenten. Es wurde auch von der Firma Sigma gekauft und auf Grund seiner extrem kurzen Halbwertszeit in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.

Daneben wurden einige weitere Stoffe verwendet, die allerdings nicht primär als Inkubationsreagenzien dienten, sondern für die Durchführung der Mess- und Bestimmungsmethoden erforderlich waren, deswegen sind sie an dieser Stelle nicht aufgeführt; sie werden bei der Beschreibung der jeweiligen Methode genannt und beschrieben.

2.3 Verwendete Inkubationslösungen

2.3.1 Ringer-Lösung

Beim Arbeiten mit Erythrozyten sind keine speziellen Nährmedien als Grundlagenmedium wie im Falle von kernhaltigen Zellen notwendig. Da rote Blutkörperchen selbst nicht über die Fähigkeit zur Proteinsynthese verfügen, muss ihr Medium weder Aminosäuren noch Wachstumsfaktoren jeglicher Art enthalten. Die einzigen Bedingungen, die ein solches Medium zu erfüllen hat, sind, dass die Zellen ihre Ionen- und Wasserhomöostase aufrechterhalten und genügend Energie in Form von Glucose aufnehmen können. Deswegen wurde für die vorliegenden Experimente als Basislösung Ringerlösung verwendet, die über keine Stimulantien für zellulären Stress verfügt. Sie enthält alle für die Erythrozyten notwendigen Ionen in der physiologischen Konzentration (s. Tabelle 1!) und wurde dann mit dem Puffer N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure (HEPES) und Natronlauge (NaOH) auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die fertige Lösung musste, um

keinen osmotischen Stress zu bieten, eine physiologische Osmolarität von 300 mOsm besitzen, was mittels eines VAPRO 5520 Dampfdruck-Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) überprüft wurde.

Ringerlösung diente in unseren Experimenten als stressarmes Medium, das auf Grund dieser Eigenschaft für die Messansätze aller Kontrollen verwendet wurde. Ferner wurde es zum Überprüfen von isolierten Effekten einzelner Substanzen auf die erythrozytäre Apoptose eingesetzt. Hierdurch konnten nämlich Überlagerungen verschiedener pro- bzw. antiapoptotischer Effekte vermieden werden, was solchen Beobachtungen Eindeutigkeit verlieh.

Tabelle 1. *Zusammensetzung der Ringer-Lösung (pH 7,4; 300 mOsm)*

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	125
KCl	5
CaCl ₂	1
MgSO ₄	1,2
HEPES	32,2
Glucose	5

2.3.2 Chloridfreie Lösung

Neben der Basis-Ringer-Lösung wurden andere Ansatzmedien, bei denen es sich im wesentlichen um modifizierte Ringerlösungen handelte, verwendet, die alle zur Induktion von Eryptose befähigt waren, da sie jeweils einen bestimmten zellulären Stressor enthielten. Zunächst konnte hierbei Zellstress mittels Austausch von Chloridionen in der Lösung durch isoosmolaren Ersatz mit Gluconat ausgelöst werden. Durch die Abwesenheit von Cl⁻-Ionen wird ein unselektiver Kationenkanal disinhibiert, wodurch ein Calciumeinstrom in die Zelle mit nachfolgendem Eryptosesignal eingeleitet wird. Die Messung von gesunden ansonsten ungestressten Kontrollerythrozyten in diesem chloridfreien Medium zeigt nach 24 Stunden bereits Apoptoseraten von >30% der Zellen [Huber et al., 2001].

Bis auf den Ersatz der Chlorid- durch Gluconat-Salze ist die Lösung identisch mit der vorher beschriebenen Ringer-Lösung.

Tabelle 2. Zusammensetzung der chloridfreien Lösung bzw. Null-Chlorid-Lösung (pH 7,4; 300 mOsm)

Substanz	Konzentration [mM]
NaGluconat	125
KGluconat	5
½ CaGluconat	1
MgSO ₄	1,2
HEPES	32,2
Glucose	5

2.3.3 Glucosefreie Lösung

Ein weiterer klassischer Weg, durch zellulären Stress Apoptose in Erythrozyten wie auch in kernhaltigen Zellen zu induzieren, ist die Inkubation in glucosefreier Lösung. Da der Erythrozyt für seine beiden wichtigsten Stoffwechselwege, die anaerobe Glykolyse und den Pentosephosphatzyklus, Glucose als Substrat benötigt, kann er in glucosefreier Lösung weder durch die Glykolyse Energie in Form von ATP noch durch den Pentosephosphatweg Reduktionsäquivalente in Form von NADPH gewinnen, so dass er sich massivem oxidativem und energiedeprivativem Stress ausgesetzt sieht [Bilmen et al., 2001; Lang et al., 2006a; Mavelli et al., 1984]. Glucosefreie Lösung ist ebenfalls eine modifizierte Ringerlösung, bei der die Glucose äquimolar durch Natriumchlorid ersetzt ist.

Die Inkubationszeit für Erythrozyten in glucosefreier Lösung betrug immer 48 Stunden, woraufhin zwischen 30 und 70% der Zellen verstärkte Phosphatidylserin-Exposition zeigten.

Tabelle 3. Zusammensetzung der glucosefreien Lösung (pH 7,4; 300 mOsm)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	130
KCl	5
CaCl ₂	1
MgSO ₄	1,2
HEPES	32,2

2.3.4 Hyperosmolare Lösung

Außer durch den Verzicht auf Cl⁻-Ionen oder auf Glucose im Ansatzmedium kann Apoptose induzierender Stress auch durch eine Erhöhung der Osmolarität der Ringerlösung ausgelöst werden, was als osmotischer Stress bezeichnet wird. Jede Zelle ist gemäß den Gesetzen der Diffusion bzw. Osmose bestrebt, einen Konzentrationsausgleich zwischen ihrem Inneren und ihrem Äußeren zu schaffen, deswegen verliert sie in hypertonen Umgebung Wasser an das Medium, wodurch bei tierischen Zellen auf Grund der fehlenden Zellwand ihr Volumen schrumpft. Zur Herstellung dieser hyperosmolaren Lösung wurde zu Ringerlösung Saccharose hinzugegeben in einer Konzentration von 550 mOsm, so dass die Endkonzentration gelöster Teilchen in der fertigen Lösung 850 mOsm betrug. Die Exaktheit der Osmolarität wurde auch in dieser Lösung mit Hilfe eines VAPRO 5520 Dampfdruck-Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) verifiziert.

Die Inkubation der Erythrozyten in dieser Lösung erfolgte über 6 Stunden, woraufhin bei ca. 30-50% Apoptosezeichen auftraten [Lang et al., 2006b; Lang et al., 2004a].

Tabelle 4. Zusammensetzung der hypertonen Lösung (pH 7,4; 850mOsm)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	125
KCl	5
CaCl ₂	1
MgSO ₄	1,2
HEPES	32,2
Glucose	5
Saccharose	550

2.3.5 Annexin-Waschpuffer

Bevor die Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden können, müssen die inkubierten Proben noch mit einer Pufferlösung behandelt werden, dessen Hauptfunktionen das Waschen und das Verdünnen der Proben und in einem zweiten Schritt das Verdünnen des eingesetzten Fluoreszenz-Farbstoffs Annexin-V-Fluos

war. Hierzu wurde der im Folgenden beschriebene isoosmolare Annexin-Waschpuffer verwendet.

Tabelle 5. Zusammensetzung des Annexin-Wasch-Puffers (pH 7,4; 275 mOsm)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	125
CaCl ₂	5
HEPES	10

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Prinzip der Methode

Die Durchflusszytometrie ist eine Messmethode, mit der das Zählen, Untersuchen und auch Sortieren von Zellen auf der Basis ihrer unterschiedlichen Oberflächenparameter in einem Flüssigkeitsstrom mit Hilfe eines Lasers genau definierter Wellenlänge möglich wird. Dazu wird dieser Strom, bevor er das optische System passiert, zunächst durch eine dünne Kapillare gesaugt. Das kleine Lumen dieser Kapillare ermöglicht, dass immer nur eine einzelne Zelle in die Zählkammer eintritt und den Laserstrahl passiert. Beim Durchtritt durch diesen Strahl absorbieren die Zellen zunächst seine Lichtenergie und emittieren anschließend Streulicht und bei entsprechender Fluoreszenzmarkierung auch Fluoreszenzimpulse, die dann von Detektoren in verschiedenen Ebenen erfasst werden können.

Der Anteil des Streulichts, der parallel zur Strahlrichtung gemessen wird und durch das Phänomen der Lichtbeugung entsteht, wird als „forward scatter“ bezeichnet und wird als Maß für die Zellgröße betrachtet, während der seitlich gestreute Lichtanteil, ein Brechungsphänomen, als „side scatter“ einen Parameter für die Zellgranulierung darstellt.

Neben diesen den Zellen ohnehin inhärenten Streulichteigenschaften kann man zusätzlich Oberflächenmarker der Zelle durchflusszytometrisch bestimmen, indem man fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Bindeproteine an diese koppelt und im Durchflusszytometer das nach Anregung durch den Laser emittierte Fluoreszenzlicht anschließend detektiert.

In unseren Experimenten stellten der forward scatter und die Fluoreszenzdetektion die relevanten Messgrößen dar, da die Zellgranulierung für die Messung von Apoptose in Erythrozyten keine Relevanz besitzt.

2.4.2 Aufarbeitung der Erythrozyten und Probenansatz

Für die Experimente mit humanen Erythrozyten, die mit einem Hämatokrit von 0,3 % durchgeführt wurden, wurden uns von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen fertig aufgearbeitete Erythrozytenkonzentratproben zur Verfügung gestellt. Diese Proben hatten ein Volumen von 300 µl und wurden bei 4 °C in verschweißten Polyethylenschläuchen bis zu drei Tage lang gelagert und spätestens dann verwendet.

Mit diesen Proben isolierter Erythrozyten wurden nun alle Experimentalansätze wie nachfolgend beschrieben unter einer Sterilbank der Firma Nunc (Wiesbaden), die weitgehende Keimfreiheit in den Proben gewährleisten sollte, durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3 µl Erythrozytenkonzentrat in 1 ml der jeweiligen Lösungen, die zusätzlich das für das Experiment relevante Reagenz in der entsprechenden Konzentration enthalten konnten, pipettiert und jeweils während der in Tabelle 6 angegebenen Zeitdauer inkubiert:

Tabelle 6. Inkubationszeiten für verschiedene Lösungen

Lösung	Inkubationszeit
Ringerlösung	4 h / 24 h
Chloridfreie Lösung	24 h
Glucosefreie Lösung	48 h
Hyperosmolare Lösung	6 h

Bei den entsprechenden Experimenten in Stresslösungen wurden immer auch korrespondierende Kontrollproben in Ringerlösung angesetzt und über die entsprechende Zeit mitinkubiert.

Die Ansätze für die Durchflusszytometrie wurden in sterilen 5ml-Tubes Polystyrene Round-bottom der Firma Becton-Dickinson FalconTM, (Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt.

Alle Proben wurden, sofern bei den Ergebnissen nicht anders angegeben, zweimal identisch zur Doppelbestimmung mit den gleichen Erythrozyten angesetzt. Alle durchflusszytometrischen Versuche wurden mit $n = 4$ unterschiedlichen Erythrozytenproben verschiedener Blutgruppen durchgeführt, um gegebenenfalls unterschiedliche Reaktionen durch die Blutgruppe oder den Rhesusfaktor aufspüren zu können. Die dazu verwendeten Blutproben sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

Tabelle 7. *Verwendete Blutgruppen für die $n = 4$ Ansätze*

Ansatz	Blutgruppe
1	0 Rh positiv
2	0 Rh negativ
3	A Rh positiv
4	beliebig

Nach dem Zusammenpipettieren des fertigen Ansatzes, der nun die entsprechende Lösung, die relevanten Reagenzien, deren Einfluss auf die Eryptose gemessen werden sollte, und die Erythrozyten enthielt, wurden die Proben auf einem Vortexgerät (MS2 Minishaker der Firma IKA® (Staufen)) resuspendiert und mit einem Deckel, allerdings nicht gasdicht, verschlossen. Dieser sollte die Probe vor Kontamination schützen, aber trotzdem den essentiellen Gasaustausch der Zellen ermöglichen. Die nun fertigen Ansätze wurden anschließend für die angegebenen Zeiten in einem CO₂-Inkubator der Marke Heraeus (Hanau) bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von < 1 % inkubiert. (Eine CO₂-Inkubation war wegen der Pufferung mit HEPES nicht notwendig, da kein Plasma oder kernhaltige Zellen vorhanden sind, die auf das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem angewiesen sind.)

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit mussten die Ansätze für die durchflusszytometrische Annexin-V-Fluos-Messung wie im Folgenden beschrieben vorbereitet werden.

2.4.3 Annexin-V-Messung

Für die Durchführung durchflusszytometrischer Messungen wurde das Protein Annexin-V als Apoptosemarker verwendet. Es eignet sich deswegen so gut dafür, da

es die Fähigkeit besitzt, sehr spezifisch und hochaffin calcium-abhängig das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin zu binden [Andree et al., 1990; Vermes et al., 1995], das nur bei apoptotischen Zellen auf der äußeren Membran präsentiert wird. Für die vorliegenden Experimente wurde das Derivat Annexin-V-Fluos (Roche, Penzberg) eingesetzt, bei dem an das Protein noch der fluoreszierende Molekülrest Fluoresceinisothiocyanat gebunden ist. Dieses modifizierte Protein ist dann in der Lage, als sensitiver Marker apoptotische Zellen, die eine verstärkte Phosphatidylserin-Exposition auf ihrer Oberfläche präsentieren, durch Bindung an das Lipid fluoreszent zu markieren und somit durchflusszytometrisch detektierbar zu machen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit des Ansatzes musste als erster Vorbereitungsschritt für die Annexin-Messung das Waschen der Zellen erfolgen, um sie von Lösungs- und Reagenzbestandteilen zu reinigen. Dazu wurden die Ansätze durch „Vortexen“ resuspendiert. Daraufhin wurden 50 µl aus dem entsprechenden Ansatz in 350 µl Annexin-Wasch-Puffer in ein 1,3 ml-PP-Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt, um dem System Calcium zuzuführen, wodurch die Annexin-Bindung an Phosphatidylserin ermöglicht wird. Zum Waschen und Pelletieren der Erythrozyten wurden diese Röhrchen 5 Minuten lang bei 4 °C mit 3600 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der resultierende Überstand verworfen, das Zellpellet mit 45 µl Annexin-V-Fluos (vorher 1:50 verdünnt mit Annexin-Waschpuffer) versetzt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert, um die fluoreszierenden Eigenschaften nicht zu beeinträchtigen. Nach Ablauf dieser viertelstündigen Inkubationszeit wurden jeweils 200 µl Annexin-Wasch-Puffer zu den Proben hinzupipettiert, um die Reaktion zu stoppen und das nicht gebundene Annexin-V-fluos zur Vermeidung von Messartefakten zu verdünnen. Anschließend wurden die so prozessierten Ansätze sofort im Durchflusszytometer (FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) analysiert.

Dazu wurden die Zellen im forward scatter und im FL-1-Kanal detektiert. Da als Fluoreszenzmarker Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet wurde, wurde eine Exzitationswellenlänge des Lasers von 496 nm gewählt. Diese entspricht dem Absorptionsmaximum von FITC, die anschließend detektierte Emissionswellenlänge lag bei 530 nm. Um eine statistisch signifikante Messung zu erhalten, wurden aus jedem Ansatz 20.000 Zellen gemessen. Als Kriterium für erhöhte Phosphatidylserin-

Exposition wurde dabei verstärkte Fluoreszenz in einem definierten Markerbereich durch vermehrte Annexin-Bindung betrachtet. Der Markerbereich wurde hierbei so gewählt, dass von einer Negativkontroll-Probe an ungestressten Erythrozyten in Ringerlösung nicht mehr als 5% der Zellen in dem gewählten Markerbereich liegen. Alle Messungen wurden anschließend mit der zum Durchflusszytometer gehörigen CellQuest-Software der Firma Becton Dickinson ausgewertet.

2.4.4 Die Messung des Phosphatidylserin-„Scrambling“ an der Membran

2.4.4.1 Prinzip der Methode

Die Aktivität des „Scrambling“ von Phosphatidylserin an der erythrozytären Membran vom inneren auf das äußere Blatt wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt. Die dabei angewandte Methode [Frasch et al., 2000] beruht darauf, dass die Erythrozyten zunächst mit dem fluoreszenzmarkierten Phosphatidylserin-Derivat (1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phospho-L-Serin (C6-NBD-PS) inkubiert werden, wobei davon ausgegangen wird, dass dieses modifizierte Phospholipid gleichermaßen in beide Blätter der erythrozytären Membran inseriert wird. Bei der Verteilung des Lipids auf beide Membranen existieren zwei verschiedene Enzymsysteme, die konkurrierend in entgegengesetzte Richtungen arbeiten, die im folgenden angegeben sind:

Scramblase/Scrambling-Enzyme: C6-NBD-PS_{innen} → C6-NBD-PS_{außen}

Flippase: C6-NBD-PS_{innen} ← C6-NBD-PS_{außen}

Hierbei ist die Flippase im ungestressten Zustand der Zellen aktiver, während die Scramblase durch proapoptotischen Stress aktiviert wird, weswegen sich unter Kontrollbedingungen fast das gesamte C6-NBD-PS auf der inneren Membran befindet. Unter Zellstress wird das Lipid nach außen transportiert. Bei der verwendeten Messmethode wird nach der Inkubation das an der äußeren Membran exponierte C6-NBD-PS durch Rinderserumalbumin (BSA) gebunden und extrahiert, so dass anschließend nur noch das auf der Innenseite befindliche Lipid nachzuweisen ist. Anschließend kann die Fluoreszenz, die proportional zur Lipidmenge ist, durchflusszytometrisch gemessen werden. Dabei ist zu erwähnen, dass die Scramblase-Aktivität umso größer ist, je geringer die gemessene Fluoreszenz ist, da nicht das exponierte, sondern das verbleibende Lipid der inneren Membranseite quantifiziert wird. Messungen mit Standardreihen lassen dann die

genaue Quantifizierung des Lipids und in Verbindung mit kinetischen Messungen eine Aussage zur Aktivität des Enzymsystems zu, das am „Scrambling“ beteiligt ist.

2.4.4.2 Durchführung der Aktivitätsbestimmung

Zuerst mussten die Erythrozyten mit dem fluoreszierenden Phospholipid-Derivat C6-NBD-PS beladen werden. Dazu wurde eine Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 0,6 %, also der doppelten Konzentration des sonst verwendeten Hct, eingesetzt. Diese wurde bei Raumtemperatur für 4 Minuten mit C6-NBD-PS in einer Konzentration von 700 nM inkubiert. Hierfür wurde eine Stammlösung von C6-NBD-PS in Chloroform verwendet. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen 5 Minuten lang mit 400 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Ringerlösung resuspendiert und für eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert, damit sich ein Gleichgewicht von C6-NBD-PS an der inneren und äußeren Membran einstellen konnte. Jeweils gleiche Volumina des resuspendierten Zellpellets wurden danach in die entsprechenden Ansatzlösungen gegeben, so dass ein ungefährender Hämatokrit von 0,3 % resultierte. Diese Ansatzlösungen bestanden entweder aus reiner Ringerlösung mit DMSO als Negativkontrolle oder aus Ringerlösung, die entweder mit Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 1 µM, mit Ionomycin mit einer Konzentration von 0,1 µM oder mit beiden Substanzen in den zuvor erwähnten Konzentrationen vorbehandelt war. Um auch hier ein „steady state“ zu erreichen, wurde wie zuvor erwähnt Natrium-Nitroprussid wegen seiner kurzen Halbwertszeit alle 5 Minuten über eine Stunde hinweg zupipettiert. Nach 4 Stunden Inkubationszeit wurden aus jedem Ansatz Aliquots von 800 µl in 1,5-ml-Eppendorf®-Cups überführt und 5 Minuten lang bei 4 °C und 400 x g zentrifugiert.

Anschließend wurden 800 µl einer eiskalten 1 %igen Lösung von BSA in Ringer hinzupipettiert und 8 Minuten kokubiert. Mit diesem Extraktionsschritt sollten die markierten C6-NBD-PS-Moleküle aus der äußeren Membran entfernt werden.

Die Zellen mit dem innen verbleibenden Lipid wurden daraufhin nochmals zweimal mit Ringerlösung gewaschen, abzentrifugiert und in Ringerlösung resuspendiert.

Die verbliebene Menge an fluoreszierendem Lipid, die sich innen befand und nicht mit BSA extrahiert wurde, wurde dann durchflusszytometrisch mit einem FACS-Calibur-Durchflusszytometer, methodisch parallel zur Messung der Annexin-V-Bindung (siehe 2.4.3), bestimmt.

2.4.5 Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

2.4.5.1 Prinzip der Methode

Analog zu den beiden zuvor beschriebenen Assays lässt sich auch die Konzentration der intrazellulären Calcium-Ionen durchflusszytometrisch bestimmen [Andrews et al., 2002], die deswegen bei der vorliegenden Studie relevant war, da durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration Eryptose induziert werden kann und NO eventuell über diesen Mechanismus wirken konnte. Für diese Bestimmung wurde der calciumsensitive und -selektive Farbstoff Fluo-3-AM verwendet, eine Modifikation des Farbstoffs Fluo-3, an den über eine Esterbindung eine Acetoxymethyl-Gruppe gebunden ist. Dieses Fluo-3-AM-Molekül kann selbst kein Calcium binden, aber es ist in der Lage, die Zellmembran zu permeieren. Im Zellinneren werden die Acetoxymethyl-Reste durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, so dass die koordinativen Bindungsstellen, die Fluo-3 zur Ausbildung des Chelatkomplexes mit Calcium-Ionen benötigt, freigegeben werden. Anschließend bindet das Farbstoffmolekül Calcium-Ionen. Durch diese AM-Modifikation des Fluo-3-Farbstoffs wird gewährleistet, dass im Durchflusszytometer tatsächlich nur intrazelluläres Calcium detektiert wird und nicht freies Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung. Durch Bindung von Calcium-Ionen verändert sich konzentrationsabhängig das Absorptionsverhalten von Fluo-3, so dass der Chelatkomplex eine andere Fluoreszenz als das freie Farbstoffmolekül aufweist, was im Durchflusszytometer messbar ist [Minta et al., 1989].

2.4.5.2 Durchführung der Calciumbestimmung

Zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenaktivität mussten die Erythrozyten, bevor der eigentliche Testansatz bereitet wurde, zuerst mit dem Farbstoff Fluo-3-AM (Calbiochem Bad Soden, Germany) beladen werden. Dazu wurden zunächst 2 μl einer Fluo-3-AM-Stammlösung, die eine Konzentration von 2 mM im Lösungsmittel Dimethylsulfoxid aufwies, zu 1 ml einer Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 0,3 % hinzupipettiert. Danach wurde dieser Ansatz bei 37°C 15 Minuten lang unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden erneut 2 μl der Fluo-3-AM-Stammlösung hinzugefügt, so dass hiernach die Konzentration des Farbstoffs in der Suspension 8 μM betrug. Daraufhin musste ein weiterer Inkubationsschritt der so beladenen Zellen für 25 Minuten bei 37°C unter

Lichtausschluss erfolgen, um eine möglichst hohe Farbstoffbeladung im Zellinneren zu gewährleisten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Erythrozyten bei 1000 x g 5 Minuten lang bei Raumtemperatur abzentrifugiert, woraufhin zwei Waschschriffe mit Ringer-Lösung erfolgten, die 0,5 % Rinderserumalbumin enthielt. Dieses wurde verwendet, um überschüssiges extrazelluläres Fluo-3-AM zu binden, woran sich noch ein weiterer Waschschriff mit reiner Ringer-Lösung anschloss.

Die so beladenen Zellen wurden nun pelletiert, mit einem Hämatokrit von 0,3 % in Ringerlösung resuspendiert und im Ansatz entweder mit Natrium-Nitroprussid (1 μM), Ionomycin (0,1 μM) oder beiden Reagenzien versetzt. Diese Ansätze wurden unter Lichtausschluss für 1 Stunde, 3 Stunden beziehungsweise 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenz im FL-1-Detektor (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 530 nm) parallel zur Annexin-V-Messung (siehe 2.4.3).

Als Positivkontrolle, um die ausreichende Beladung und die Funktion des Farbstoffs zu überprüfen, wurden mit Fluo-3-AM beladene Erythrozyten 5 Minuten lang mit 1 μM des Calciumionophors Ionomycin inkubiert, der die intrazelluläre Calciumkonzentration kanalunabhängig sehr effektiv erhöht, als Negativkontrolle diente Ringerlösung.

2.5 Detektion S-nitrosylierter Proteine

2.5.1 Prinzip der Methode

Für die Bestimmung der S-Nitrosylierung erythrozytärer Proteine wurde das Prinzip des Saville-Griess-Assays mit geringfügigen Modifikationen verwendet [Haendeler et al., 2002].

Hierbei macht man sich zunutze, dass sich die optischen Dichten von Lösungen, die S-nitrosylierte Proteine enthalten, in An- und Abwesenheit von Cu^{2+} - oder Hg^{2+} -Ionen voneinander unterscheiden. Dabei ist für die optische Dichte der Lösung in Abwesenheit der Ionen hauptsächlich freies Nitrit, Nitrat und ungebundenes NO verantwortlich. Cu^{2+} - oder Hg^{2+} -Ionen sind durch ihre hohe S-Affinität in der Lage, NO aus S-NO-Bindungen freizusetzen, so dass sich die optische Dichte in Anwesenheit von Cu^{2+} bzw. Hg^{2+} aus der Gesamtheit von freiem NO, Nitrit, Nitrat und NO, das aus den S-NO-Bindungen freigesetzt wurde, zusammensetzt. Die

Differenz der optischen Dichten korreliert mit der Menge an S-nitrosyliertem Protein, die relativ angegeben wird.

2.5.2 Durchführung der Messung

Für die Bestimmung wurde zunächst ein Ansatz bereitet, der aus einer Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 0,3 % in Ringerlösung als Basis bestand. Die Ansätze enthielten analog zu den vorher beschriebenen Versuchsserien Ringerlösung allein als Negativkontrolle, Ionomycin (0,1 μM) als Stressor oder Ionomycin und einen NO-Donator (Nitroprussid 1 μM bzw. NOC-15 100 μM).

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Erythrozyten mit Hilfe des sogenannten Griess-Puffers lysiert, der die folgende Zusammensetzung hatte:

Tabelle 8. Zusammensetzung des Griess-Puffers

Substanz	Konzentration
Tris-HCl (pH=8,0)	50 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Nonidet-P40	1 %
Phenylmethylsulfonylfluorid	1 mM
Bathocuproindisulfonsäure	1 mM
Diethylentriaminpentaessigsäure	1 mM
N-Ethylmaleimid	10 mM

Anschließend musste das Hämoglobin, dessen Anwesenheit die Messung unmöglich gemacht hätte, entfernt werden. Dazu wurde es mit 70% Ethanol präzipitiert und abzentrifugiert. Danach musste das Proteingemisch aus dem Überstand isoliert werden; 160 μg Protein aus dem Überstand wurden mit 1 % Sulfanilamid und 0,1 % N-(1-Naphthyl)ethylendiamin in Abwesenheit und Anwesenheit von 3,75 mM p-Chloromercuribenzosulfonsäure als Quecksilberionendonator bzw. 10 mM CuCl_2 als Kupferionendonator 20 Minuten lang inkubiert, um durch die Schwermetallionen die S-NO-Bindungen zu brechen. Anschließend wurden die optischen Dichten der Ansätze bei 540 nm bestimmt; aus der Differenz der optischen Dichten ließ sich die

Menge an nitrosylierten Thiolgruppen relativ bestimmen und in Bezug zu einer Negativkontrolle gesunder Erythrozyten in Ringerlösung angeben.

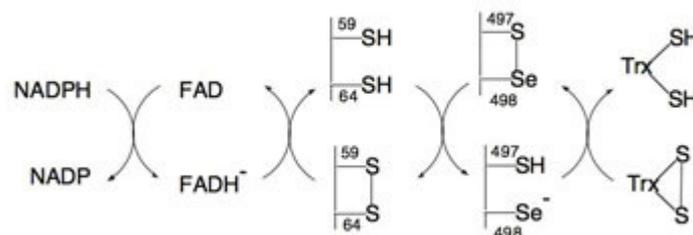
2.6 Bestimmung der Thioredoxin-Aktivität

2.6.1 Hintergrund und Prinzip der Messung

Das Enzym Thioredoxin (Trx) spielt in allen Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress. Sein reduktives Potential zieht das Protein aus zwei XCCX-Motiven, die Cystein-Gruppen sind zum Dithiol-Disulfid-Austausch befähigt. Die oxidierten Enzymmoleküle werden durch das Flavoprotein Thioredoxin-Reduktase unter Verbrauch von NADPH in den reduzierten und somit aktiven Zustand zurückversetzt.

Für Erythrozyten ist dieses Enzymsystem von besonderer Bedeutung, da sie selbst nicht zur Neusynthese von Proteinen befähigt sind und deswegen auf die reduktive Reparatur und Abwehr von oxidativem Stress noch stärker angewiesen sind als andere Zellen, zumal sie durch ihre Rolle beim Sauerstofftransport extremem oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die Aktivität von Trx wird über die Nitrosylierung von spezifischen nicht an der Aktivität beteiligten SH-Gruppen reguliert [Haendeler et al., 2002].

Da die Reaktion das System $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ enthält, lässt sie sich photometrisch durch einen gekoppelten optischen Test verfolgen. Die dabei ablaufende Reaktion ist die folgende:



Der Verbrauch von NADPH lässt sich bei 340 nm verfolgen und korreliert mit der Thioredoxin-Aktivität.

2.6.2 Durchführung der Messung

Die Erythrozyten wurden, wie unter 2.5.2 beschrieben, lysiert. Zur Bestimmung der Trx-Aktivität wurden 70 µl des Zelllysates mit 140 mM Thioredoxin-Reduktase und

450 nM Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat in der redzierten Form (NADPH) versetzt.

Anschließend wurde der Verbrauch an NADPH mit Hilfe eines Fluoreszenz-Photometers alle 30 Sekunden über 2 Minuten gemessen. Die Trx-Aktivität wurde dann berechnet als $(A_2 - A_1) / (T_2 - T_1)$ pro Milligramm Protein, wobei A_1 und A_2 die Absorptionen darstellen, die jeweils entsprechend zu den Zeitpunkten T_1 und T_2 bestimmt wurden.

2.7 Bestimmung der „Clearance“ fluoreszenzmarkierter Erythrozyten

2.7.1 Prinzip der Methode

Diese Methode soll Aufschluss über die Geschwindigkeit geben, mit der Erythrozyten durch das retikuloendotheliale System der Milz aus dem zirkulierenden peripheren Blutstrom entfernt werden. Dazu wird Mäusen Blut entnommen und die gewonnenen Erythrozyten werden mit dem fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE) behandelt, der in der Lage ist, an Erythrozyten zu binden und ihnen somit fluoreszierende Eigenschaften zu verleihen. Diese Erythrozyten werden den Tieren dann reinjiziert.

Nach definierten Zeitpunkten kann nun Blut entnommen werden und durchflusszytometrisch die abnehmende Fluoreszenz der markierten Zellen bezogen auf die Gesamtheit aller Erythrozyten in der Probe bestimmt werden. Diese korreliert mit der „Clearance“ der Erythrozyten aus dem peripheren Blut.

2.7.2 Durchführung der Clearance-Bestimmung

Für diese Bestimmung wurde Blut von Mäusen, die über keine funktionelle eNOS verfügten (eNOS^{-/-}) [Brandes et al., 2000] und zum Vergleich von Wildtyp-Kontrollmäusen (eNOS^{+/+}) aus der Schwanzvene abgenommen und die Erythrozyten aus dem Vollblut wie vorher unter 2.1 beschrieben isoliert.

Anschließend wurden diese Zellen durch Färbung mit CFSE (Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande)) fluoreszenzmarkiert. Die dazu verwendete Markierungslösung wurde aus einer CFSE-Stammlösung (10 mM in Dimethylsulfoxid) bereitet, die in PBS bis zu einer CFSE-Endkonzentration von 5 μ M verdünnt wurde. Danach wurden die Erythrozyten 30 Minuten lang bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2000 rpm 5 Minuten lang pelletiert und zweimal mit PBS, das 1 % fetales Kälberserum (FCS) enthielt, gewaschen, um freies CFSE zu binden. Das entstandene Zellpellet wurde nun in frischer, vorgewärmter Ringerlösung resuspendiert. 100 μ l dieser markierten Erythrozytensuspension wurden dann in die Schwanzvenen von entweder eNOS^{-/-} oder eNOS^{+/+}-Mäusen (männlich, 4 Monate alt) reinjiziert. Dabei wurden Experimente gemacht, bei denen die Zellen in die Spendermaus zurück oder in die genau andere Maus gespritzt wurden, worauf näher im Ergebnisteil eingegangen wird.

Nach definierten, ebenfalls im Ergebnisteil angegebenen Zeitspannen wurde nun den Mäusen Blut entnommen und die CFSE-abhängige Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch im FL-1-Kanal eines FACS-Calibur-Gerätes parallel zu den unter 2.4 beschriebenen Methoden gemessen. CFSE-positive Zellen wurden dabei in Prozent der Gesamterythrozytenzahl berechnet.

In einigen Experimenten mussten die Mäuse getötet werden, um als Kontrolle die markierten Erythrozyten in der Milz messen zu können. Dazu wurden die Tiere zunächst mit Äther betäubt und anschließend mit CO₂ in einer gasdichten Kammer getötet. Die Milz wurde entfernt und vorsichtig durch ein feinmaschiges Netz gepresst. Danach wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, die CFSE-abhängige Fluoreszenz der Erythrozyten in den Milzsuspensionen durchflusszytometrisch gemessen und deren Zahl anteilig an der Gesamtzahl angegeben.

2.8 Statistik

Alle Ergebnisse repräsentieren das arithmetische Mittel \pm Standardfehler dieses Mittelwerts. Die Zahl n stellt die Anzahl der voneinander unabhängig durchgeführten Experimente einer Serie dar. Die statistische Auswertung wurde entweder mit einem ungepaarten t-Test oder ANOVA (Dunnett's post hoc test) vorgenommen. Unterschiede bei den Messungen wurden bei $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Annexin-V-Messungen mit Nitroprussid

3.1.1 Ringerlösung

Vor Beginn der eigentlichen Experimentserien musste zur Prüfung der verwendeten Testerythrozyten auf ihre Eignung für die Versuche die spontane Annexin-Bindung, die als Marker für Eryptose diente, in Ringerlösung, die eine stressarme Umgebung darstellt, bestimmt werden, um ausschließen zu können, dass die Zellen auf irgendeine Weise vorgeschädigt waren, was zu falschen Ergebnisse führen könnte.

Die direkt ohne Inkubationszeit in Ringerlösung gemessene Annexin-V-Bindungsrate lag bei $1,2 \pm 0,3 \%$ ($n = 4$). Die spontanen Eryptoseraten waren also niedrig genug, um anzunehmen, dass vollständig funktionsfähige Erythrozyten ohne Vorschaden vorlagen, die sich ohne Einschränkung für Annexin-V-Messungen eigneten. Nach 24-stündiger Inkubationszeit stieg die Annexin-V-Bindung der verwendeten Testerythrozyten, wie in Abbildung 7 dargestellt, auf $4,4 \pm 0,8 \%$ ($n = 4$), wobei die Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid diese Steigerung auf $2,5 \pm 0,4 \%$ ($n = 4$) abschwächte. Diese Experimentserie zeigte folglich, dass die verwendete Ringerlösung nach 24 Stunden schon einen geringfügigen Stress auf die Zellen ausübte, aber der NO-Donator Nitroprussid allein in den angegebenen Konzentrationen in der Lage war, den eigentlich vernachlässigbaren Stress, der durch Ringerlösung auf die Erythrozyten wirkt, signifikant abzuschwächen, was auf eine antiapoptotische Wirkung von NO auf Erythrozyten hindeutet.

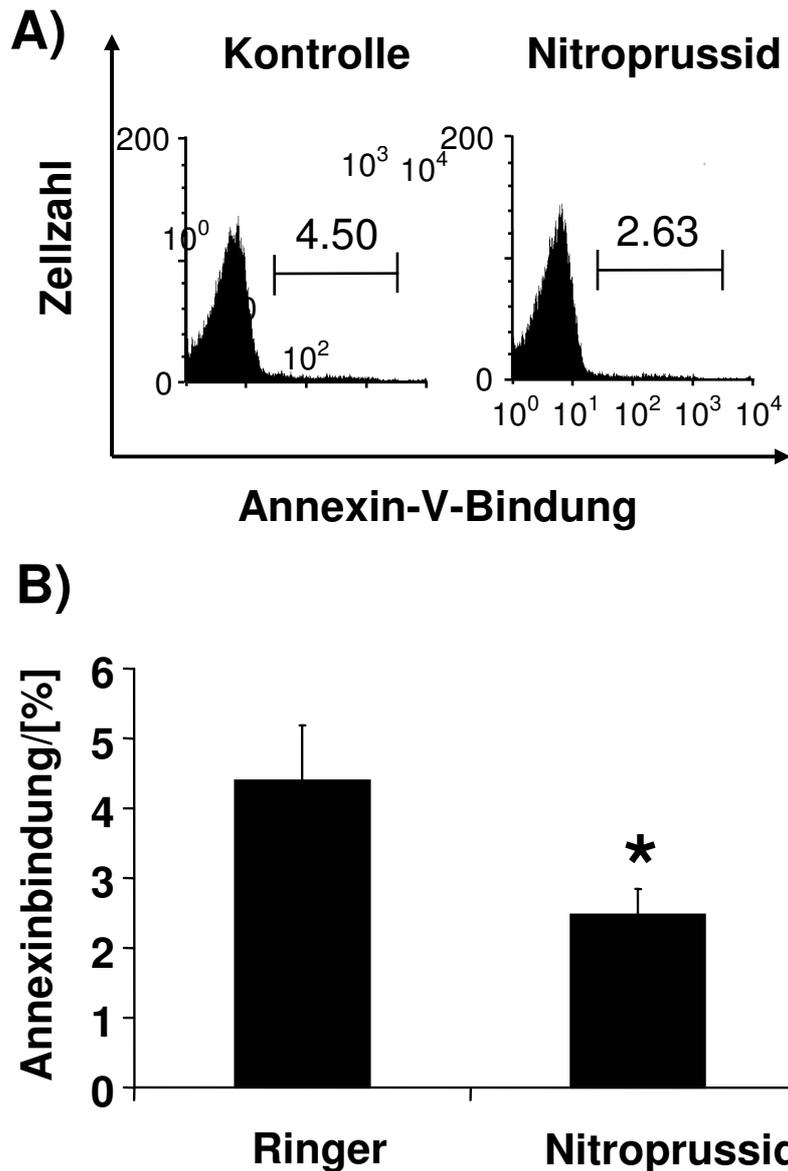


Abbildung 7: Annexin-V-Bindung \pm Nitroprussid nach 24 Stunden in Ringerlösung

- A) Originalhistogramme Annexin-V bindender Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 24 Stunden bei 37°C mit und ohne 1 μ M Natriumnitroprussid versetzt wurden.
- B) Mittelwert Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 24 h in Ringerlösung (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (t-test; $P \leq 0.05$).

3.1.2 Ionomycin und Ceramid

Um diese Beobachtung der protektiven Wirkung von NO auf die erythrozytäre Apoptose zu untermauern, sollten die Erythrozyten nun in weiteren Experimenten bewusst mit hocheffektivem Zellstress, der in der Lage sein sollte, Eryptose zu induzieren, konfrontiert werden. Hierzu wurde zuerst eine Erhöhung der

intrazellulären Calciumkonzentration gewählt, da ein Hauptsignalweg der Eryptose calciumvermittelt ist [Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Woon et al., 1999]. Dabei wurden die Zellen 4 Stunden lang mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin behandelt. Abbildung 8 zeigt, dass durch diese Behandlung die Annexinbindungsrate von $2,67 \pm 0,19$ % in Ringerlösung drastisch auf $54,82 \pm 5,20$ % anstieg. Koinkubation mit Natriumnitroprussid als NO-Donator bewirkte eine deutliche Abschwächung des Effektes, lediglich $13,38 \pm 3,86$ % der Erythrozyten zeigten noch gesteigerte Phosphatidylserin (PS)-Exposition auf ihrer Oberfläche. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abbildung 8C zeigt, dass für eine Reduktion des durch Ionomycin bewirkten apoptotischen Effektes um 50 % eine Nitroprussid-Konzentration von nur ca. 1 nM bereits ausreichend ist.

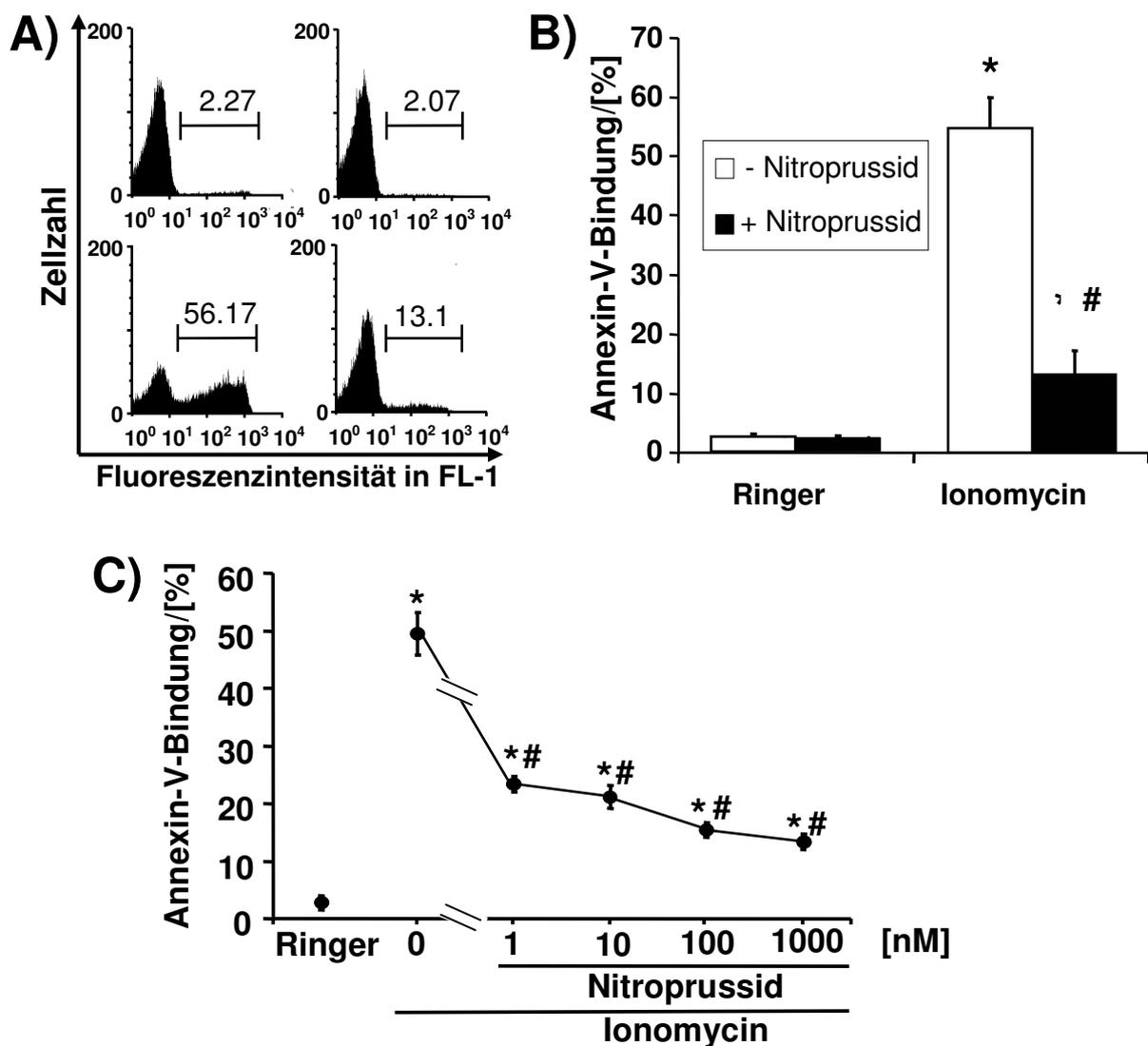


Abbildung 8: Annexin-V-Bindung mit Ionomycin \pm Nitroprussid nach 4 Stunden in Ringerlösung

- A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 4 Stunden bei 37 °C mit und ohne 0,1 µM Ionomycin ± 1 µM Nitroprussid inkubiert wurden.
- B) Mittelwert der Zellen mit gesteigerter Annexin-V-Bindung (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel ± SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe mit Ionomycin (ANOVA; $P \leq 0.05$).
- C) Dosis-Wirkungs-Beziehung der Annexin-V-Bindung in Abhängigkeit von der Nitroprussid-Konzentration (1 – 1000 nM) nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 0,1 µM Ionomycin in Ringerlösung (arithmetisches Mittel ± SEM; n=4). # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe mit Ionomycin (ANOVA; $P \leq 0.05$).

Neben Calcium-vermitteltem Signalling ist das zweite Hauptsignal für die Induktion von Eryptose die Aktivierung von Sphingomyelinasen und dadurch die Synthese von Ceramid [Lang et al., 2004a; Lang et al., 2005d]. Deswegen wurde in vitro die Wirkung von Nitroprussid auf die durch C₆-Ceramid (N-Hexanoyl-D-sphingosine) vermittelte Eryptose untersucht.

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieser Experimentserie. Dabei fällt auf, dass Ceramid bei alleiniger Zugabe in einer Konzentration von 3 µM die ansonsten annähernd vernachlässigbare Eryptoserate nach 24-stündiger Inkubation auf $34,18 \pm 7,20$ % steigerte. Diese potente Annexin-V-Bindungs-Stimulation kann wie auch im Fall der Ionomycin-Experimente durch die zusätzliche Gabe von 1 µM Nitroprussid auf $8,93 \pm 3,19$ % abgesenkt werden. Die Hemmung beider Hauptsignalwege der Eryptose deutet darauf hin, dass Nitroprussid auf die gemeinsame Endstrecke des Eryptosesignallings inhibitorisch wirkt.

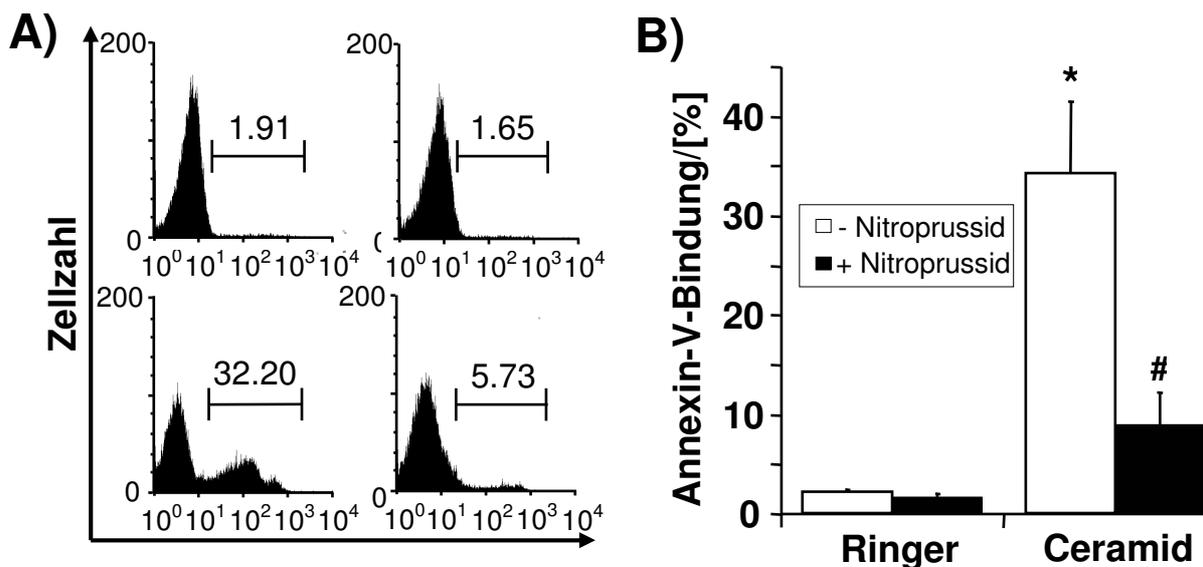


Abbildung 9: Annexin-V-Bindung mit C₆-Ceramid ± Nitroprussid nach 24 Stunden in Ringerlösung

- A) *Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung bei 37°C für 24 Stunden mit und ohne 3 µM Ceramid ± 1 µM Nitroprussid behandelt wurden.*
- B) *Arithmetisches Mittel ± SEM der Zellen mit gesteigerter Annexin-V-Bindung (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe mit Ceramid (ANOVA; P ≤ 0.05).*

3.1.3 Stresslösungen

In einer nächsten Folge von Experimenten sollte, nachdem die protektive Wirkung von Nitroprussid auf durch Ionomycin und Ceramid ausgelöste Annexinbindung gezeigt war, dieser Effekt auch auf weitere Formen von Zellstress getestet werden, die weniger artifiziell waren. Dazu wurden die in 2.3 beschriebenen Stresslösungen verwendet, die mit Stress durch Calciumeinstrom, osmotischem Stress und Energiedepressionsstress physiologischere Formen darstellen. Damit sollte gezeigt werden, ob NO auch nach physiologisch relevantem Zellstress antiapoptotische Wirkung bei roten Blutkörperchen zeigt.

3.1.3.1 Chloridfreie Lösung

Als erstes Stressmedium, das ebenfalls über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration wirkt, wurde chloridfreie Lösung verwendet. Im Unterschied zu Ionomycin erfolgt der Ca^{2+} -Einstrom allerdings ionenkanalvermittelt [Huber et al., 2001]. Der genaue Mechanismus dieses Effektes ist, soweit bekannt, bereits unter 2.3.2 beschrieben.

Abbildung 10 zeigt den Effekt von Nitroprussid auf die PS-Exposition von Erythrozyten in chloridfreier Lösung. Hierbei manifestierte sich auch für den kanallasoziierten Calciumeinstrom dieselbe Wirkung von Nitroprussid wie für den durch Ionomycin vermittelten kanal-unabhängigen. Die Annexin-V-Bindung, die durch Inkubation in chloridfreier Lösung auf $30,38 \pm 2,15$ % gestiegen war, konnte durch den Zusatz von 1 µM Nitroprussid auf $7,95 \pm 0,73$ % gesenkt werden.

Dieses Experiment zeigt, dass Nitroprussid effektiv die calcium-induzierte Eryptose hemmen kann, wobei dieser hemmende Effekt unabhängig von der Art des Calciumeinstromes ist, da sowohl kanalabhängiger als auch –unabhängiger Effekt gehemmt wurden. Das Reagenz muss also im Signalling downstream des Calciumeinstromes wirken.

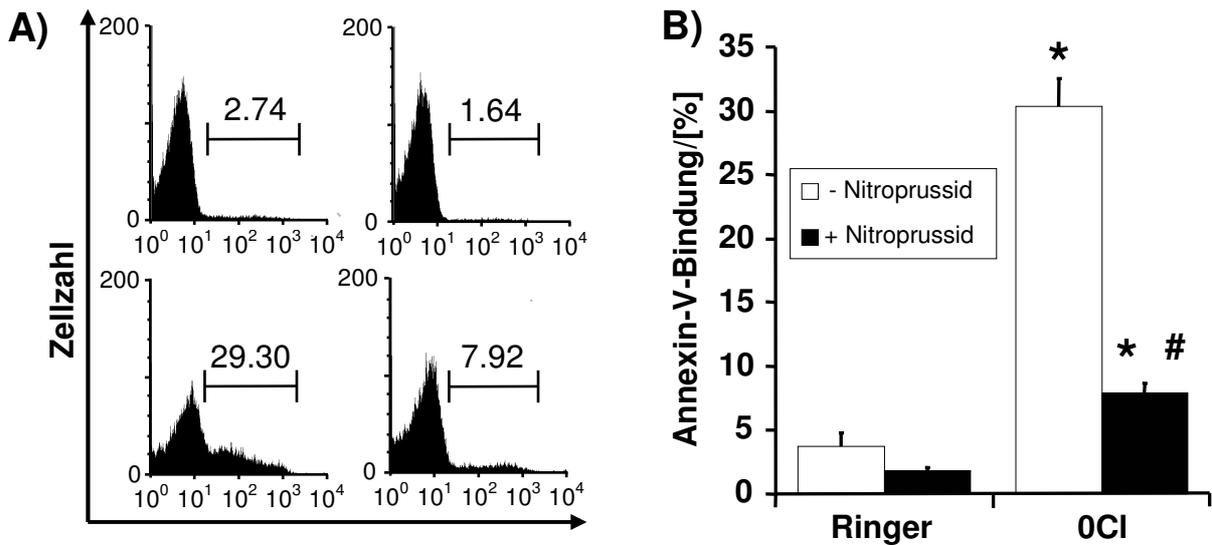


Abbildung 10: Annexin-V-Bindung \pm Nitroprussid nach 24 Stunden in chloridfreier Lösung (OCI)

- A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in chloridfreier Lösung vs. Ringer bei 37°C für 24 Stunden mit und ohne 1 μ M Nitroprussid behandelt wurden.
- B) Mittelwert der Zellen mit gesteigerter Annexin-V-Bindung (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse der Erythrozyten bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zu OCI (ANOVA; $P \leq 0.05$).

3.1.3.2 Glucosefreie Lösung

Als nächster Schritt sollte eine mögliche protektive Wirkung von Nitroprussid auf die Eryptose in glucosefreier Lösung untersucht werden. Dazu wurde die Eryptoserate in dieser Lösung nach 48 Stunden gemessen, da nach dieser Zeit die Energiedepletion und der Mangel an Reduktionsäquivalenten den Erythrozyten zur Einleitung seines Apoptoseprogramms veranlassen [Bilmen et al., 2001; Lang et al., 2006a; Mavelli et al., 1984].

Abbildung 11 demonstriert den Effekt von Nitroprussid auf die Eryptose durch Glucosedepletion. Hierbei zeigte sich, dass glucosefreie Lösung eine erhöhte PS-Exposition in $52,39 \pm 5,05$ % der Zellen triggerte, wohingegen die Zugabe von 1 μ M Nitroprussid diesen Effekt auf $9,77 \pm 1,88$ % abschwächte.

Diese Wirkung verdeutlicht, dass Nitroprussid nicht nur auf die calciumvermittelte, sondern auch auf die Eryptose durch Glucosedepletion wirkte, so dass zumindest ein Teil des Effektes mechanistisch recht weit am Ende der eryptoseauslösenden

Signalkette stehen muss, da der Signalweg im Falle der Glucosedepletion vom reinen Calciumeinstrom verschieden ist.

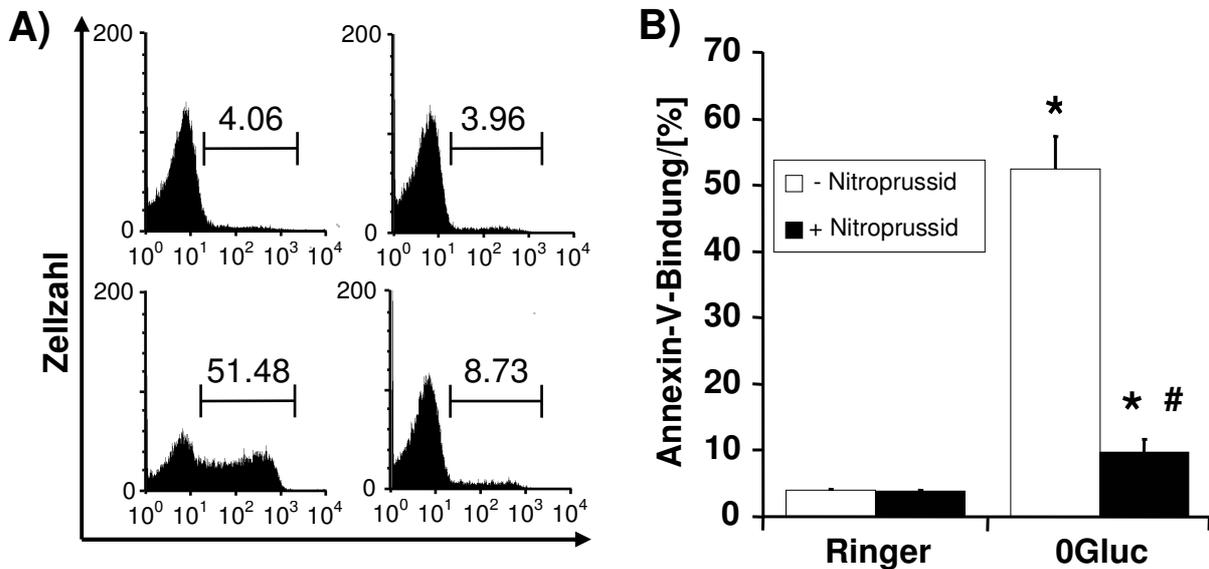


Abbildung 11: Annexin-V-Bindung \pm Nitroprussid nach 24 Stunden in glucosefreier Lösung (OGluc)

- A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung und in glucosefreier Lösung bei 37°C für 48 Stunden mit und ohne 1 μ M Nitroprussid behandelt wurden.
- B) Arithmetisches Mittel \pm SEM der Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse der Erythrozyten (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zu OGluc (ANOVA; $P \leq 0.05$).

3.1.3.3 Hyperosmolare Lösung

Auch auf Zellstress durch hyperosmolares Medium sollte die Wirkung von Nitroprussid nachgewiesen werden. Die durch diesen Stressor induzierte Eryptose erfolgt über mehrere Signalwege, die zumindest zum Teil sowohl calcium- als auch ceramidvermittelt sind [Lang et al., 2006b]. Neben der Glucosedepletion ist dieser Stressor der physiologisch relevanteste.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, steigerte die 6-stündige Inkubation von Erythrozyten in hyperosmolarer Lösung die PS-Exposition bei $25,01 \pm 1,33$ % der Zellen. Zugabe von 1 μ M Nitroprussid zu dem Ansatz schwächte diesen Effekt auf $12,29 \pm 1,73$ %, also um über die Hälfte ab. Auch gegen diese Form des Zellstress machte Nitroprussid die Zellen resistenter in ihrer Apoptoseneigung.

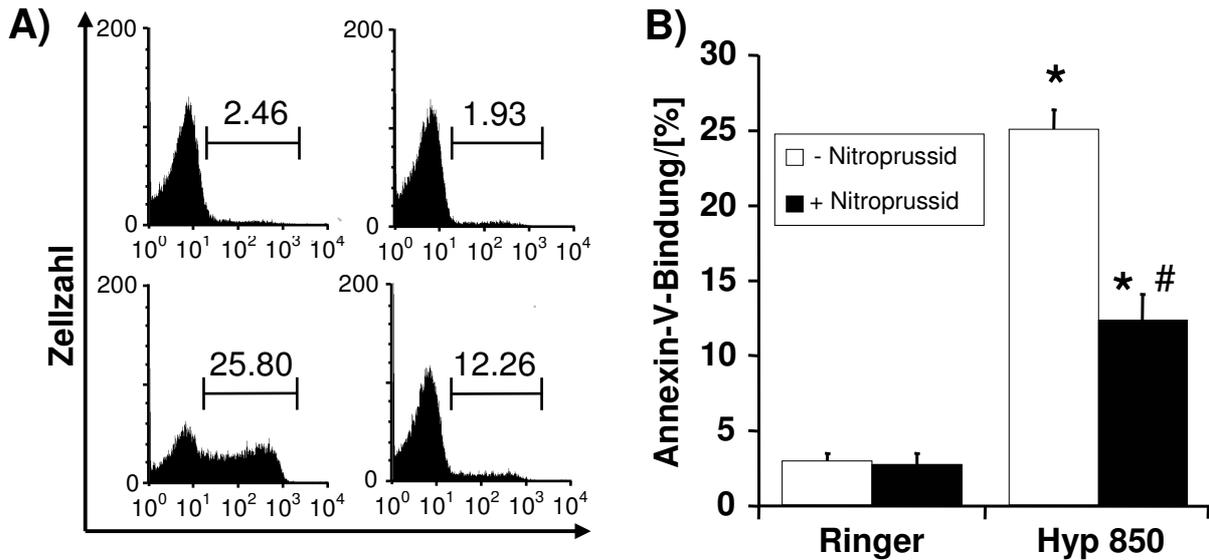


Abbildung 12: Annexin-V-Bindung \pm Nitroprussid nach 6-stündiger Inkubation in hyperosmolarer Lösung (Hyp 850)

- A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung bzw. in hypertoner Lösung für 6 Stunden bei 37°C mit und ohne 1 μ M Nitroprussid behandelt wurden.
- B) Mittelwert der Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse der Erythrozyten (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zu Hyp 850 (ANOVA; $P \leq 0.05$).

3.2 Forward-scatter-Messungen mit Nitroprussid

3.2.1 Ionomycin und Ceramid

Parallel zu allen Annexin-V-Messungen, die als ein Apoptosekriterium die Phosphatidylserinexposition widerspiegeln, wurden auch Messungen des Forward scatter durchgeführt, die Aufschluss über die Zellschrumpfung geben sollten, die als weiteres Apoptosemerkmal Hinweise auf den zu Grunde liegenden Mechanismus liefern kann. Diese Messungen lassen dabei nur relative beziehungsweise qualitative Aussagen zu, da der gemessene forward scatter keine absolut zu quantifizierende Einheit hat, sondern sich nur mit Hilfe der Zahlenwerte mit Kontrollwerten vergleichen lässt. Üblicherweise besteht der Zusammenhang zur Annexin-V-Messung, dass häufig bei höheren Werten für Annexin-Messung eine proportionale gesteigerte Zellschrumpfung beobachtbar ist. Auch das Phänomen des „membrane blebbing“ lässt sich hiermit erfassen, da die einzelnen kleinen „blebs“ ebenfalls im forward scatter ganz links in den Histogrammen nachweisbar sind.

Die calciumvermittelte Eryptose ist neben der charakteristischen Phosphatidylserinexposition durch eine Schrumpfung des Zellvolumens nach Calciumeinstrom gekennzeichnet [Brugnara et al., 1993]. Diese kommt dadurch zustande, dass erhöhtes intrazelluläres $[Ca^{2+}]$ calciumsensitive Kaliumkanäle vom Gardos-Typ öffnet. Infolgedessen strömen Kaliumionen aus der Zelle; passiv wird dabei aus osmotischen Gründen Wasser mitgezogen, so dass die Zelle durch den Wasserverlust schrumpft.

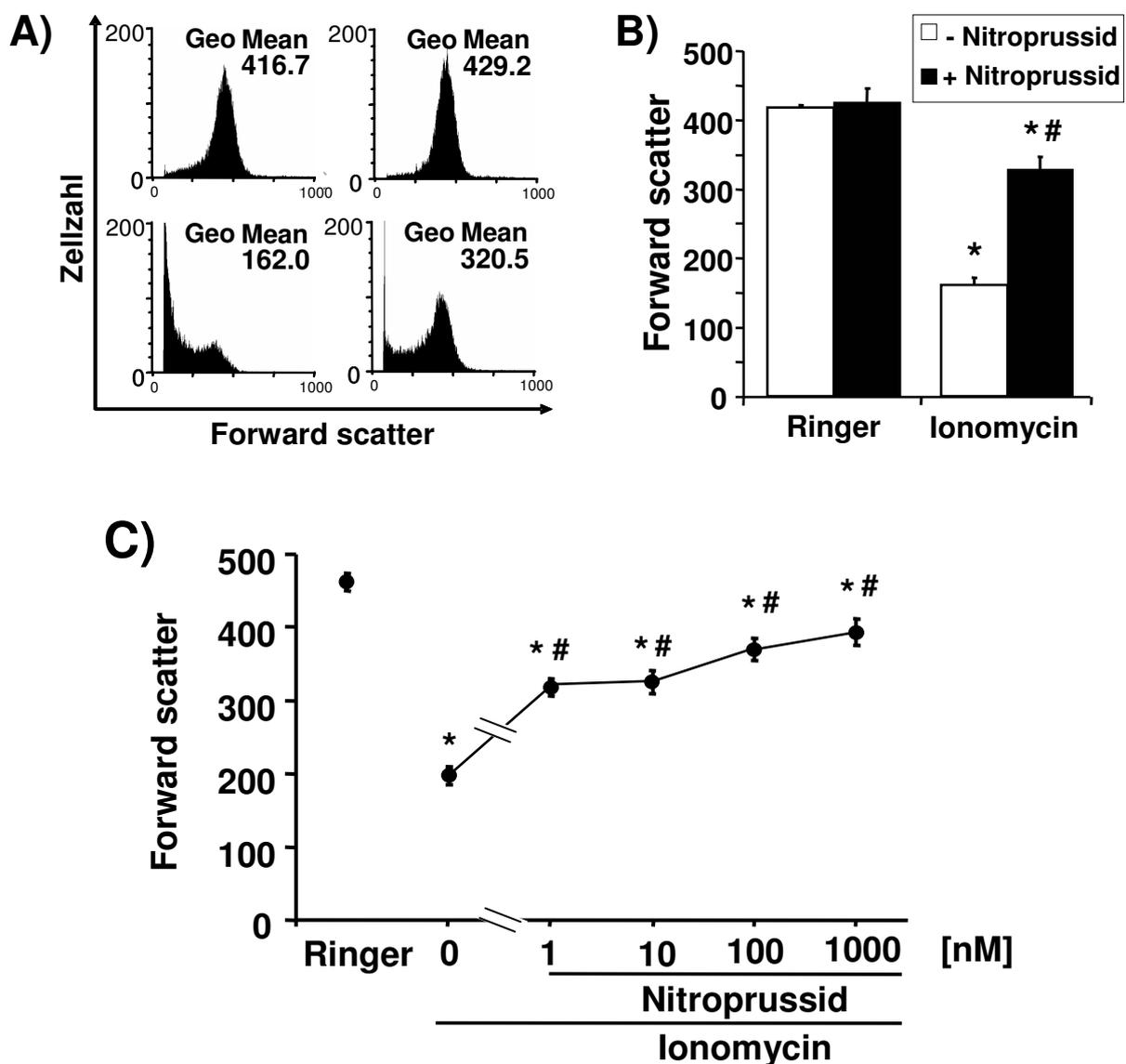


Abbildung 13: Forward scatter-Messung mit Ionomycin ± Nitroprussid nach 4 Stunden in Ringerlösung

A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Bestimmung des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem die Zellen für 4 Stunden bei 37°C in Ringerlösung mit und ohne 0,1 μ M Ionomycin ± 1 μ M Nitroprussid inkubiert wurden. Die beiden linken Histogramme zeigen die Ergebnisse der Ansätze ohne NO, die rechten zeigen die Messungen

in Anwesenheit von NO. Oben sind dabei die Messungen ohne Ionomycin, unten die mit Ionomycin zu sehen.

- B) *Arithmetisches Mittel \pm SEM des Forward scatter in der durchflusszytometrischen Messung von Erythrozyten bei demselben Experiment (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe mit Ionomycin (ANOVA; $P \leq 0.05$).*
- C) *Dosis-Wirkungs-Beziehung der Zellschrumpfung in Abhängigkeit von der Nitroprussid-Konzentration (1 – 1000 nM) nach 4-stündiger Inkubation der Erythrozyten mit 0,1 μ M Ionomycin in Ringerlösung (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe mit Ionomycin (ANOVA; $P \leq 0.05$).*

Deswegen war für die vorliegenden Experimente interessant, ob Nitroprussid neben seinem protektiven Effekt auf die Annexin-V-Bindung auch in der Lage ist, die Zellschrumpfung einzudämmen. Tatsächlich nahm das Zellvolumen, wie in Abbildung 13 dargestellt, durch Zugabe von Ionomycin dramatisch ab, was sich in der starken Abnahme des forward scatter widerspiegelt, der als Maß für die Zellschrumpfung durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Der zu beobachtende Effekt wird allerdings durch die Anwesenheit von Nitroprussid weitestgehend blockiert. Auch hier zeigt sich in der Dosis-Wirkungs-Reihe (Abb. 13C) schon ein Effekt von 50 % bereits bei einer Nitroprussid-Konzentration von ca. 0,1 nM.

Während bei der calciumvermittelten Eryptose sowohl Annexin-V-Bindung als auch Zellschrumpfung durch Zugabe von Nitroprussid hemmbar waren, hatte Nitroprussid im Fall der ceramidvermittelten Eryptose lediglich einen inhibierenden Effekt auf die Annexin-V-Bindung; der Forward scatter blieb unverändert. Dieser Umstand liegt allerdings darin begründet, dass die ceramidvermittelte Eryptose selbst ohne nennenswerte Zellschrumpfung abläuft, die hätte gehemmt werden können. Dennoch zeigt Nitroprussid hier im Gegensatz zu den Experimenten mit Ionomycin eher eine Tendenz, die Zellgröße leicht zu verringern. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Experimente mit Ceramid. Hierbei ließ sich kein signifikanter Effekt durch Ceramidzugabe nachweisen; folglich konnte auch Nitroprussid keinen protektiven Effekt auf den forward scatter ausüben.

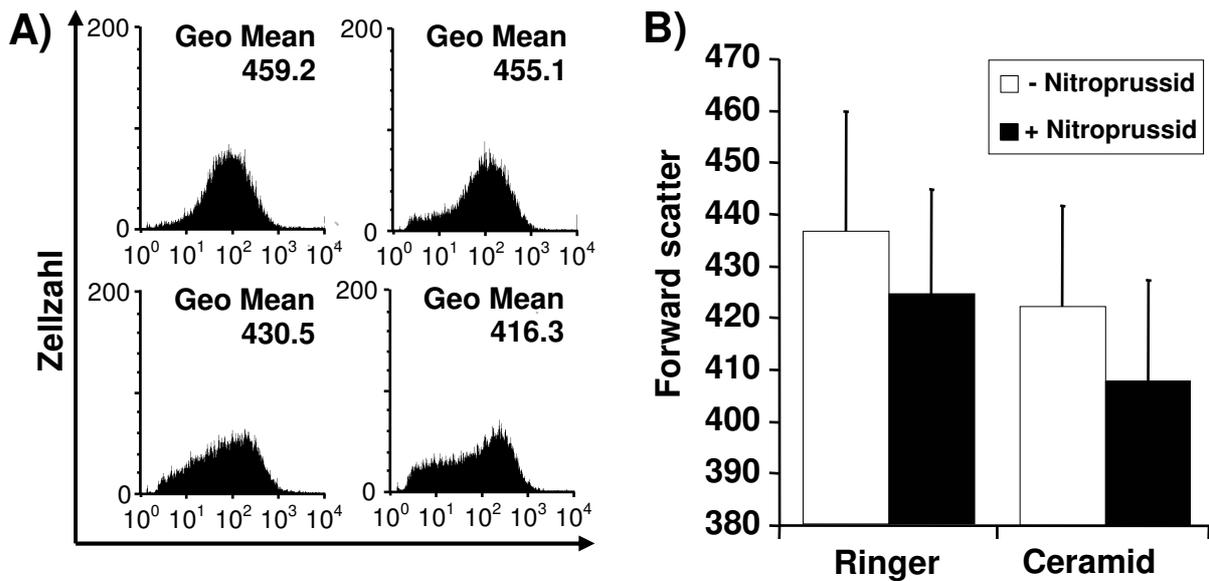


Abbildung 14: Messung des Forward scatter mit C₆-Ceramid ± Nitroprussid nach 24 Stunden in Ringerlösung

- A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 24 Stunden bei 37 °C mit und ohne 3 µM Ceramid ± 1 µM Nitroprussid behandelt wurden. Die Einteilung der Histogramme ist wie in Abbildung 13, die unteren Histogramme zeigen hier Messungen mit Ceramid, die rechten beiden Histogramme zeigen Messungen mit Nitroprussid.
- B) Mittelwert des gemessenen Forward scatter (angegeben in gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel ± SEM; n=4). Es zeigten sich im Signifikanztest (ANOVA; $P \leq 0.05$) keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.2 Stresslösungen

3.2.2.1 Chloridfreie und hyperosmolare Lösung

Auch in den Experimenten mit den oben erwähnten Stresslösungen, die physiologischere Formen des Zellstress repräsentierten, wurde jeweils der forward scatter bestimmt, um eventuelle Einflüsse von Nitroprussid auf das Zellvolumen gestresster Erythrozyten beobachten zu können.

Hierbei zeigt sich, dass in chloridfreier und hyperosmolarer Lösung, bei denen die Zellschrumpfung im Vordergrund steht und einer der ersten Schritte im Signalweg der Eryptose ist, durch Nitroprussid zwar signifikant, aber dennoch kaum merklich gehemmt wird.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. In beiden Experimenten zog die Inkubation der Zellen in der jeweiligen Stresslösung wie erwartet eine deutliche Zellschrumpfung um ca. 1/3 des ursprünglichen Volumens nach sich, die durch die

oben beschriebenen Mechanismen (K^+ -Ausstrom bzw. osmotische Schrumpfung) begründet ist. Diese Formen der osmotischen Zellschrumpfung konnten durch NO erwartungsgemäß nur geringfügig beeinflusst werden, da NO, wie sich in der Annexin-V-Bindung schon zeigte, im Signalling downstream der schrumpfenden Einflüsse wirkt.

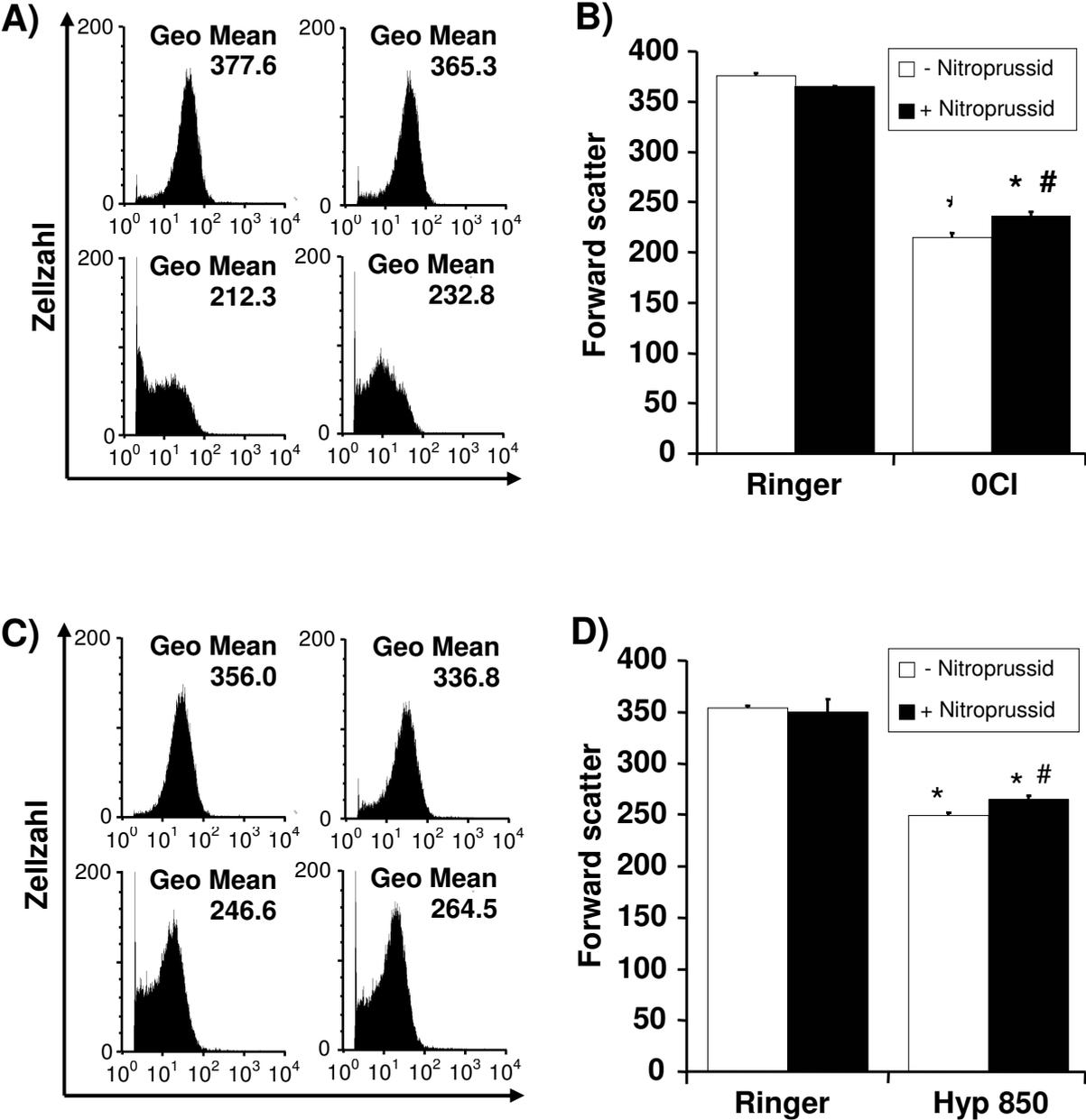


Abbildung 15: Messung des Forward scatter in chloridfreier und hyperosmolarer Lösung nach 24 bzw. 6 Stunden

A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in chloridfreier Lösung für 24 Stunden bei 37°C mit und ohne 1 µM Nitroprussid behandelt wurden. Die unteren Histogramme zeigen die Messungen in chloridfreier Lösung als Stressor, während die oberen in Ringerlösungen als

Kontrolle gemessen wurden. Rechts sind die Messungen in Anwesenheit von Nitroprussid dargestellt, links die ohne NO.

- B) Arithmetisches Mittel \pm SEM des gemessenen Forward scatter (angegeben in fiktiven Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment ($n=4$). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe in chloridfreier Lösung (ANOVA; $P \leq 0.05$)
- C) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten 6 Stunden lang in hyperosmolarer Lösung bei $37^\circ\text{C} \pm 1$ μM Nitroprussid inkubiert wurden. Die unteren Histogramme zeigen die Messungen in hypertoner Lösung, während die oberen in Ringerlösungen gemessen wurden. Rechts sind die Messungen in Anwesenheit von Nitroprussid dargestellt, links die ohne NO.
- D) Mittelwert des gemessenen Forward scatter (angegeben in fiktiven Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; $n=4$). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe in hypertoner Lösung ohne NO (ANOVA; $P \leq 0.05$)

3.2.2.2 Glucosefreie Lösung

Im Gegensatz zu den Forward-scatter-Ergebnissen in chloridfreier und hyperosmolarer Lösung zeigte sich in glucosefreier Lösung ein deutlicher Effekt von Nitroprussid auf die Zellschrumpfung.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, verringerte die Inkubation der Zellen in glucosefreier Lösung für 48 Stunden den Forward scatter um die Hälfte gegenüber Ringerlösung. Diese durch Energiedepletion ausgelöste Schrumpfung der Zellen konnte durch Zugabe von 1 μM Nitroprussid fast vollständig aufgehoben werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Zellschrumpfung nicht primär, sondern reaktiv auf das Apoptosesignal der Glucosedepletion folgt, dessen Auslösung oder Weiterleitung durch NO unterbrochen werden könnte.

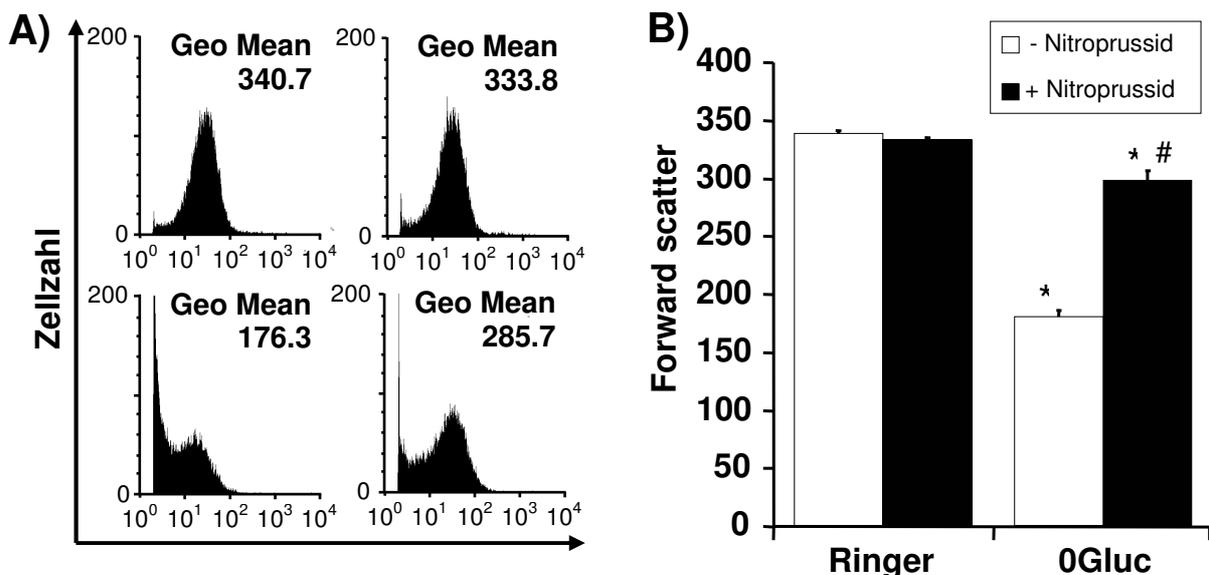


Abbildung 16: Forward scatter \pm Nitroprussid nach 48 Stunden in glucosefreier Lösung gegen Ringerlösung

- A) *Originalhistogramme des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringer- und glucosefreier Lösung für 48 Stunden bei 37 °C ohne und mit 1 µM Nitroprussid inkubiert wurden. Die unteren Histogramme zeigen die Messungen in glucosefreier Lösung, während die oberen in Ringerlösungen gemessen wurden. Rechts sind die Messungen in Anwesenheit von Nitroprussid dargestellt, links die ohne NO.*
- B) *Mittelwert des Forward scatter (angegeben in relativen, gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 48 h in glucosefreier Lösung (arithmetisches Mittel ± SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bezeichnet Signifikanz gegenüber glucosefreier Lösung (ANOVA; P ≤ 0.05).*

3.3 Durchflusszytometrische Messungen mit Papa-NONOate

Nachdem nun die Effekte von Nitroprussid auf die verschiedenen getesteten Formen des zellulären Stresses, der Eryptose auslösen kann, gezeigt waren, musste bewiesen werden, dass diese Wirkungen tatsächlich auf der Freisetzung von NO beruhen und nicht durch andere Zerfallsprodukte von Nitroprussid hervorgerufen werden.

Hierzu wurde Papa-NONOate (NOC-15) als weiterer NO-Donator verwendet, dessen NO-Freisetzung auf einem anderen Prinzip beruht als bei Nitroprussid. Die Produkte des NOC-15-Zerfalls sind ebenfalls unterschiedlich zu Nitroprussid, so dass als einzige Gemeinsamkeit die NO-Freisetzung auftritt. Auf Grund der unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften von NOC-15 im Gegensatz zu Nitroprussid wurden hier 100 µM verwendet, was dem angegebenen Literaturwert einer gängigen Dosierung entspricht [Zeigler et al., 2003].

Abbildung 17 verdeutlicht die Effekte von NOC-15 auf die ionomycin-vermittelte Eryptose. Es zeigte sich auch hier, dass die durch Ionomycin nach 4 Stunden auf $37,48 \pm 1,46$ % angestiegene Annexin-Bindungsrate durch Zugabe von 100 µM NOC-15 auf $17,29 \pm 0,68$ % absank. Der beobachtete antiapoptotische Effekt muss also tatsächlich auf der Freisetzung von NO beruhen.

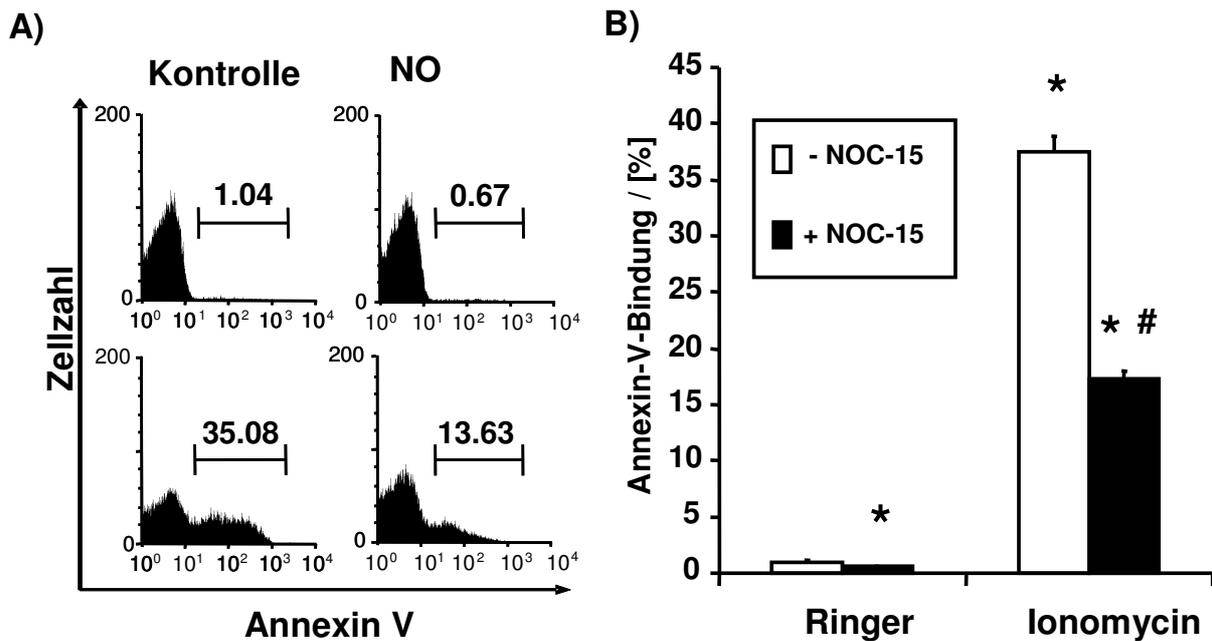


Abbildung 17: Annexin-V-Bindung mit Ionomycin \pm NOC-15 nach 4 Stunden in Ringerlösung

- A) Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 4 Stunden bei 37°C mit und ohne 0,1 μ M Ionomycin \pm 100 μ M NOC-15 inkubiert wurden. Die unteren Histogramme zeigen die Messungen in Anwesenheit von Ionomycin, während die oberen in Abwesenheit des Calciumionophors gemessen wurden.
- B) Mittelwert der Zellen mit gesteigerter Annexin-V-Bindung (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Probe mit Ionomycin (ANOVA; $P \leq 0.05$).

Auf den Forward scatter der Zellen hatte NOC-15 jedoch im Gegensatz zu Nitroprussid bei ionomycin-induzierter Eryptose keinen signifikanten Effekt.

Ferner wurde noch Linsidomin als NO-Donator eingesetzt, das ebenfalls auf verschiedene Stressoren einen protektiven Effekt hatte. Die Ergebnisse dieser Experimente sind hier nicht dargestellt, da die Wirkung sich analog zu Nitroprussid und NOC-15 verhielt.

3.4 Durchflusszytometrische Messungen mit dibutyryl-cGMP

Nachdem nun die protektive Wirkung von NO auf die erythrozytäre Apoptose gezeigt war, musste als nächster Schritt die Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus erfolgen. In kernhaltigen Zellen wirkt NO zu einem großen Teil über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und anschließende Aktivierung der Proteinkinase G [Clementi et al., 1995; Das et al., 2006; Li and Billiar 1999; Nagai-

Kusuhara et al., 2007]. Auch in Erythrozyten existiert die enzymatische Ausstattung für diesen Signalweg.

Deswegen wurde nun die Wirkung eines membrangängigen Analogons von cGMP, dem N²,2'-O-Dibutyrylguanosin 3',5'-zyklische Monophosphat (db-cGMP), das durch seine unpolaren Reste in der Lage ist, die Erythrozytenmembran zu permeieren, auf die Erytose getestet.

Hierfür wurde die Wechselwirkung mit den gleichen Stressoren überprüft wie für die Wechselwirkung von Nitroprussid bzw. NOC-15.

3.4.1 Annexin-V-Messungen mit Ionomycin und Ceramid

Zunächst wurden auch hierbei die Wirkungen von db-cGMP auf die isolierte ionomycin- und ceramidvermittelte Erytose betrachtet. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente:

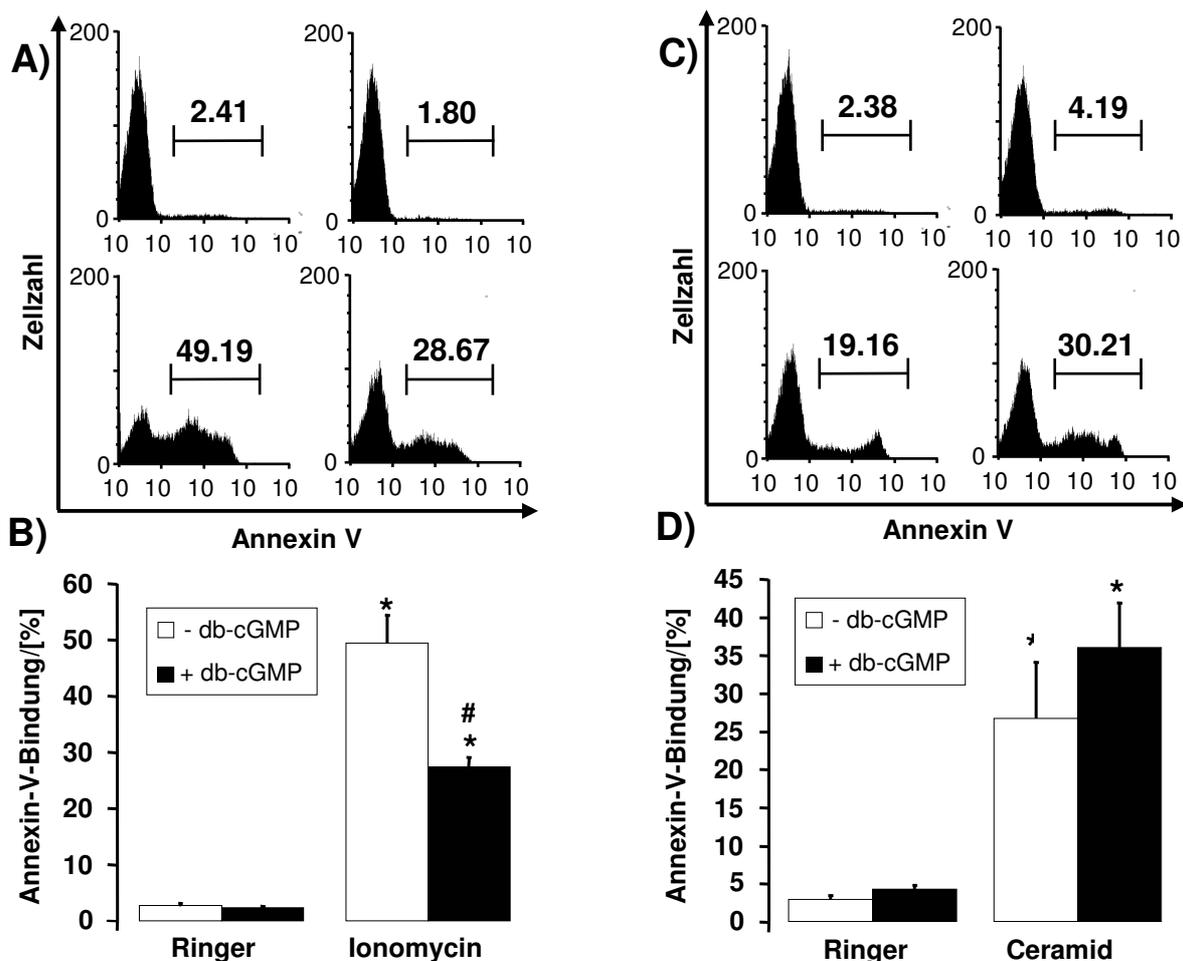


Abbildung 18: Annexin-V-Bindung mit Ionomycin bzw. C₆-Ceramid ± db-cGMP nach 4 bzw. 24 Stunden in Ringerlösung

- A) *Originalhistogramme Annexin-V bindender Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 4 Stunden bei 37 °C mit und ohne 0,1 µM Ionomycin ± 1 mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen.*
- B) *Mittelwert Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 4 h bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel ± SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet Signifikanz gegenüber Ionomycin (ANOVA; P ≤ 0.05).*
- C) *Originalhistogramme Annexin-V bindender Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung bei 37 °C 24 Stunden lang mit und ohne 3 µM C₆-Ceramid ± 1 mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen.*
- D) *Arithmetisches Mittel ± SEM Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; P ≤ 0.05).*

Hierbei zeigte sich, dass db-cGMP in der Lage war, die ionomycin-induzierte Annexin-Bindungsrate der Zellen, also die calciumvermittelten Effekte, von $49,47 \pm 4,87$ % auf $27,36 \pm 1,62$ % deutlich zu verringern (Abbildung 18A und 18B).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Experimenten mit C₆-Ceramid kein protektiver Effekt von db-cGMP, im Gegenteil stieg die Eryptoserate sogar noch geringfügig an. Dieser Effekt zeigte allerdings keine Signifikanz (Abbildung 18C und 18D). Das deutet darauf hin, dass ein Teil der NO-Wirkung auf die calciumvermittelte Eryptose über cGMP weitervermittelt wird, während cGMP bei der ceramidvermittelten Wirkung im Signalling keine Rolle spielt.

3.4.2 Annexin-V-Messungen mit Stresslösungen

Auch für db-cGMP wurde eine eventuelle Wirkung auf Eryptose in Stresslösungen getestet. Dabei bestätigte sich die Beobachtung der Ergebnisse mit Ionomycin und Ceramid.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Annexin-V-Messungen mit db-cGMP in Stresslösungen. Dabei wurde eine deutlich erhöhte Eryptoserate in chloridfreier Lösung nachgewiesen, die darin $53,22 \pm 7,08$ % betrug, durch die Zugabe von 1 mM db-cGMP signifikant auf $30,61 \pm 4,73$ % abgeschwächt wurde.

In glucosefreier Lösung war immerhin ein leichter, jedoch nicht signifikanter protektiver Effekt zu verzeichnen, während das Reagenz in hypertoner Lösung überhaupt keinen Effekt auf die Annexin-V-Bindung hatte.

Deswegen wird auch hierbei deutlich, dass cGMP im NO-Signalling der Eryptoseprotektion lediglich eine Rolle im calciumvermittelten Prozes spielte, der durch die chloridfreie Lösung repräsentiert wurde. Eryptose durch Glucosedepletion und osmotischer Stress blieben wie die ceramidvermittelte Eryptose unberührt.

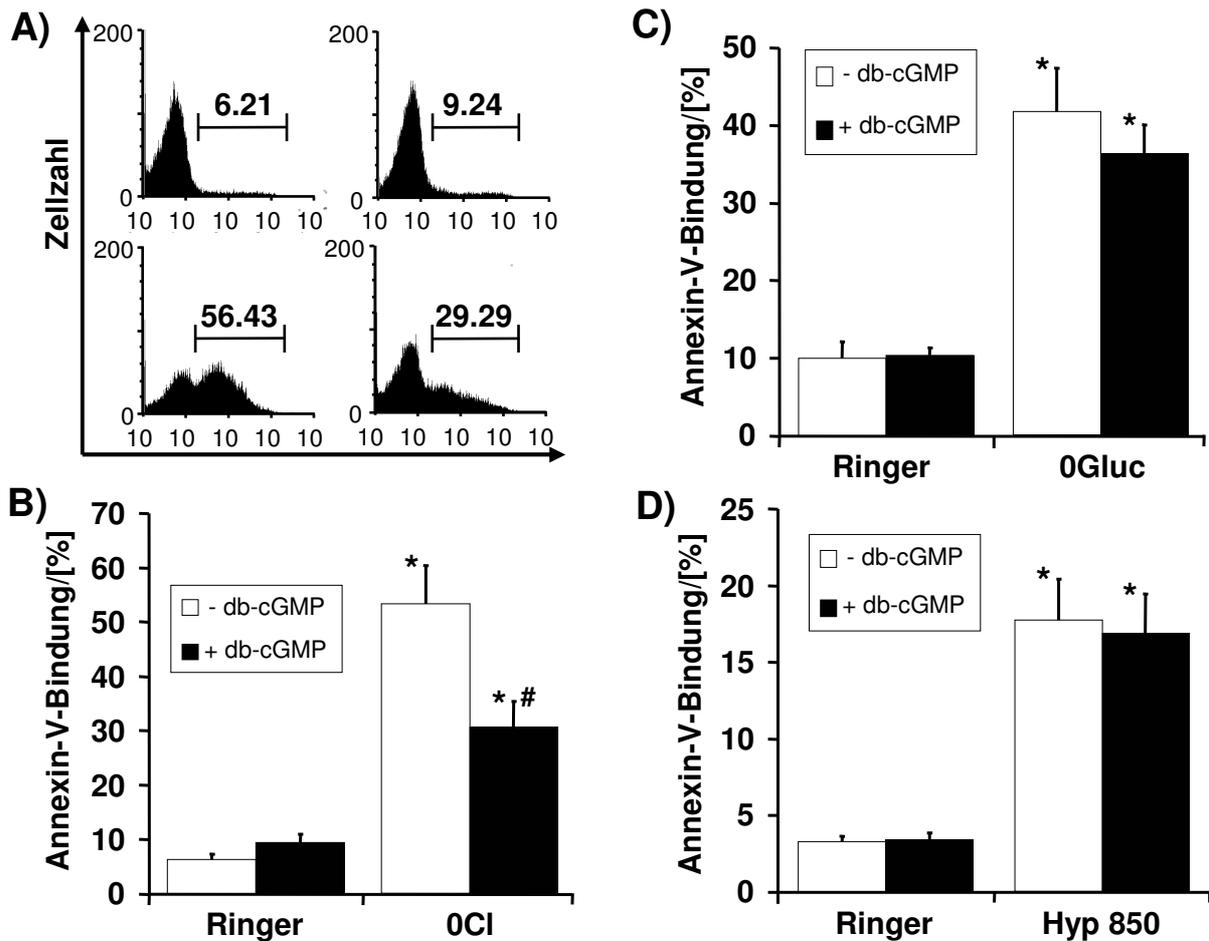


Abbildung 19: Annexin-V-Bindung \pm db-cGMP in chloridfreier, glucosefreier und hypertoner Lösung

- A) Originalhistogramme der Annexin-V-Bindung der Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in chloridfreier Lösung gegen Ringerlösung für 24 Stunden bei 37°C mit und ohne 1 mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen und in Abbildung 15A beschrieben.
- B) Mittelwert Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 24 h bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet Signifikanz gegenüber chloridfreier Lösung (ANOVA; $P \leq 0.05$).
- C) Mittelwert Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten, die in glucosefreier Lösung vs. Ringer 48 Stunden lang bei 37°C \pm 1 mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0,05$).
- D) Arithmetisches Mittel \pm SEM Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten in hypertoner Lösung vs. Ringer 6 Stunden lang bei 37°C \pm 1 mM dibutyryl-cGMP. (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0.05$).

3.4.3 Forward scatter-Messungen mit Ionomycin und Ceramid

Die Forward scatter-Messungen der Experimente mit db-cGMP fielen erwartungsgemäß aus. Wie schon erwähnt, bedingen sich Zellschrumpfung und

Annexin-V-Bindung gegenseitig in dem Sinne, dass höhere Annexinbindung mit geringerem Zellvolumen korreliert.

Da die durch Ionomycin ausgelöste Erhöhung der PS-Exposition durch die Zugabe von db-cGMP deutlich abgemildert wurde, wurde auch die Zellschrumpfung durch dieses Reagenz inhibiert. Wie in Abbildung 20 dargestellt, sank der gemessene forward scatter um mehr als die Hälfte durch die Zugabe von Ionomycin; der Effekt konnte aber durch Koinkubation mit db-cGMP signifikant abgemildert werden

Dagegen wurde die ohnehin nur leicht ausgeprägte Zellschrumpfung bei der durch C₆-Ceramid induzierten Eryptose durch die Zugabe von db-cGMP eher leicht, aber nicht signifikant verstärkt, was auch parallel zur gemessenen leichten Erhöhung der Annexin-V-Bindung passt.

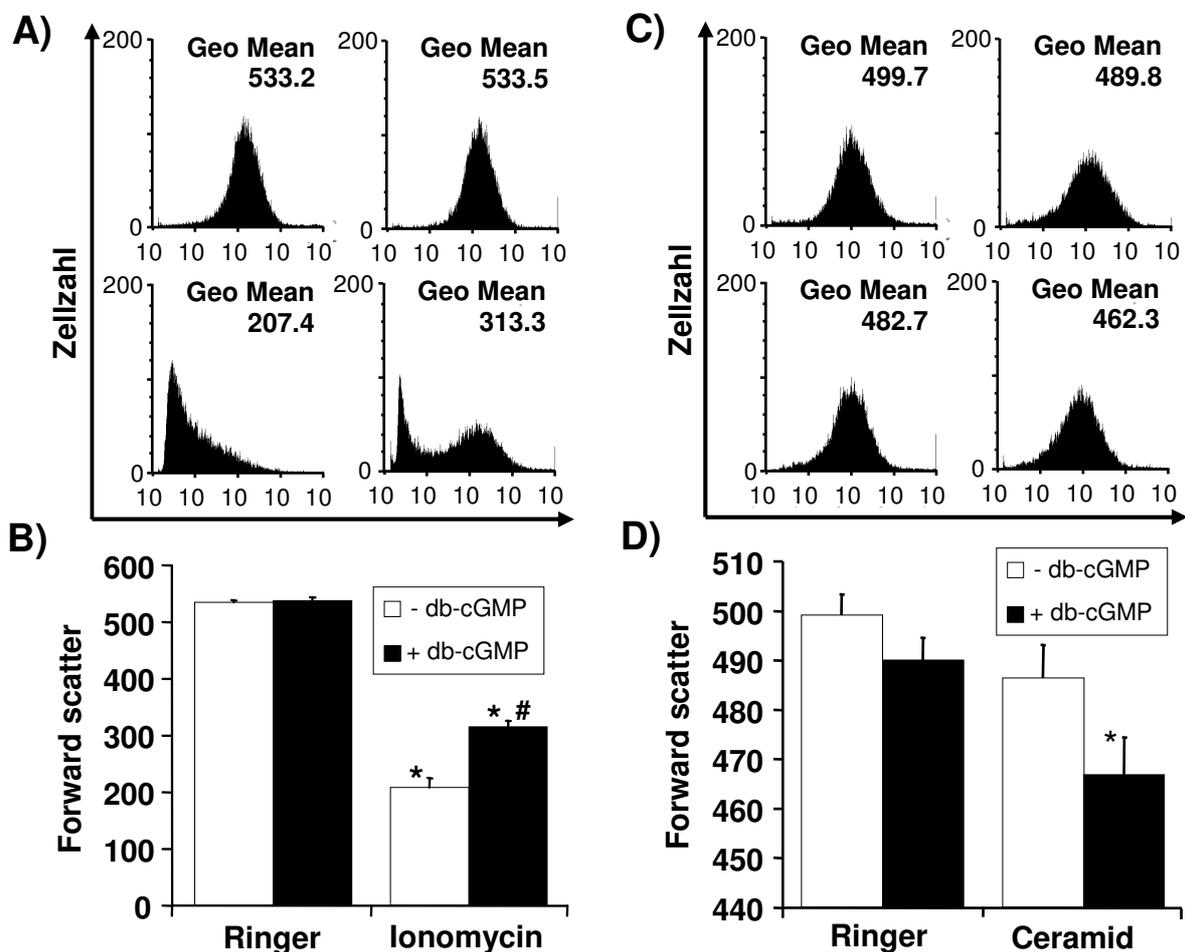


Abbildung 20: Messung des Forward scatter mit Ionomycin bzw. C₆-Ceramid ± db-cGMP nach 4 bzw. 24 Stunden in Ringerlösung

A) Originalhistogramme des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung bei 37°C für 4 Stunden mit und ohne 0,1 µM Ionomycin ± 1 mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen und in Abbildung 15A beschrieben.

- B) Mittelwert des gemessenen Forward scatter (angegeben in relativen, gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 4 h bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # bedeutet Signifikanz gegenüber Ionomycin (ANOVA; $P \leq 0.05$).
- C) Forward scatter-Originalhistogramme in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung 24 Stunden lang bei 37°C mit und ohne 3 μ M C_6 -Ceramid \pm 1 mM dibutyl-cGMP angesetzt wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen und in Abbildung 15A beschrieben.
- D) Arithmetisches Mittel \pm SEM des Forward scatter (angegeben in gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0.05$).

3.4.4 Messungen des Forward scatter in Stresslösungen

Der bei physiologischen Formen des zellulären Stresses in den verwendeten Stresslösungen gemessene forward scatter veränderte sich durch die Zugabe von db-cGMP in keinem Fall signifikant. Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigte sich weder in chloridfreier noch in glucosefreier oder hypertoner Lösung ein Effekt, das Zellvolumen blieb durch die Zugabe des Reagenzes in Stresslösungen konstant.

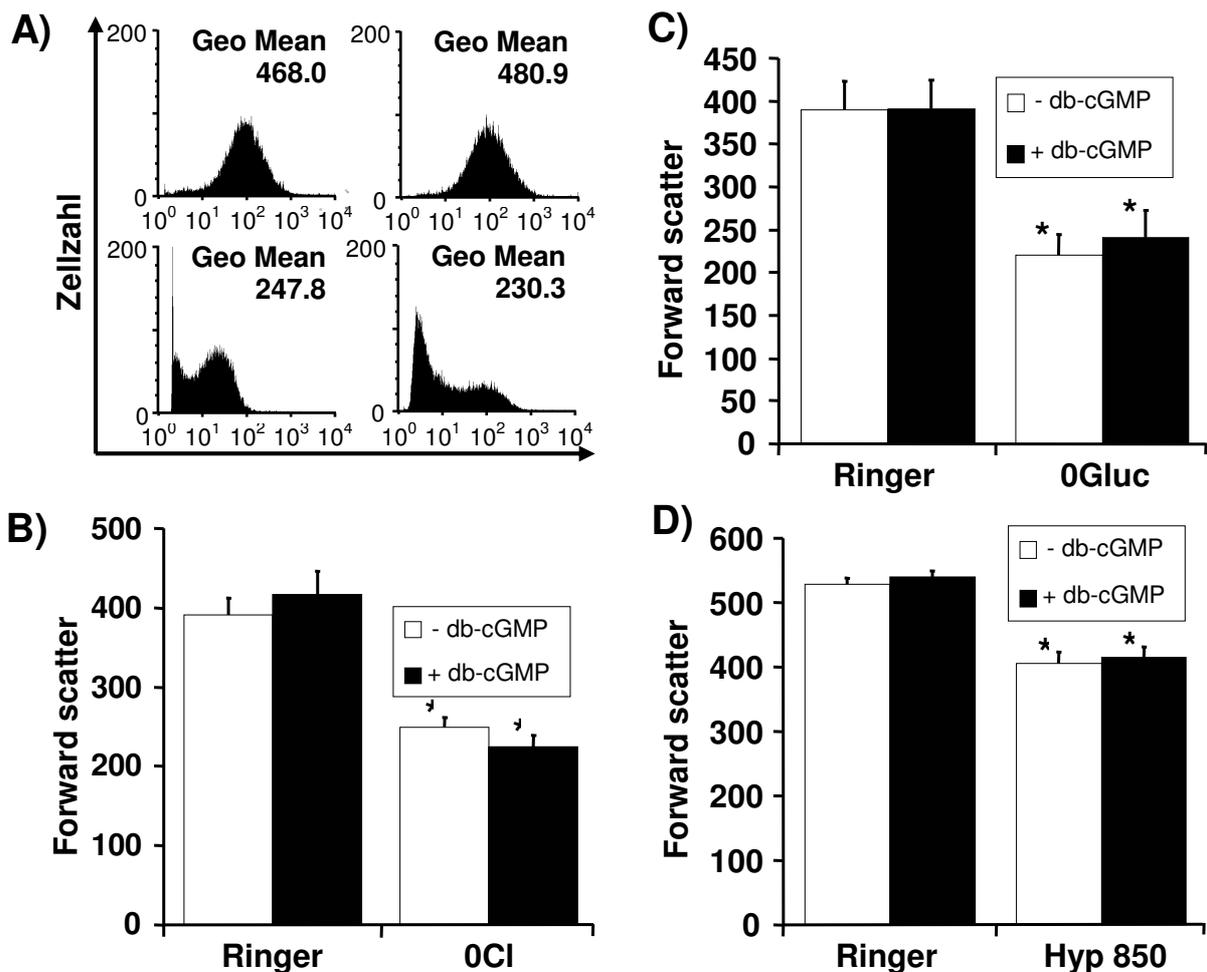


Abbildung 21: Messung des Forward scatter \pm db-cGMP in chloridfreier, glucosefreier und hypertoner Lösung

- A) *Originalhistogramme des Forward scatter der Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in chloridfreier Lösung gegen Ringerlösung für 24 Stunden bei 37°C mit und ohne 1 mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen und in Abbildung 15A beschrieben.*
- B) *Mittelwert des Forward scatter (angegeben in gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 24 h bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0.05$).*
- C) *Mittelwert des Forward scatter (angegeben in gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten, die in glucosefreier Lösung vs. Ringer 48 Stunden lang bei $37^\circ\text{C} \pm 1$ mM dibutyryl-cGMP inkubiert wurden. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0,05$).*
- D) *Arithmetisches Mittel \pm SEM des gemessenen Forward scatter (angegeben in relativen, gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten in hypertoner Lösung vs. Ringer 6 Stunden lang bei $37^\circ\text{C} \pm 1$ mM dibutyryl-cGMP. (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0.05$).*

3.5 Calciummessung mit Ionomycin und Nitroprussid

Mit Hilfe der Annexin-V- und forward-scatter-Messungen unter Zugabe von NO-Donatoren konnten die antiapoptotischen Effekte von NO als Phänomen charakterisiert werden. Dabei war festzustellen, dass NO in der Lage ist, die Phosphatidylserin-Exposition und die Zellschrumpfung signifikant abzuschwächen, die durch zellulären Stress in Erythrozyten induziert wurde, und so protektiv zu wirken. Neben der Beschreibung der Phänomene konnten aus diesen Experimenten schon Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus gewonnen werden. Diese beruhten auf der Wirkung gegenüber den einzelnen Stressoren und der Wirkungskonstellation bzw. auf der Wirkung von db-cGMP auf die einzelnen Stressoren.

Deswegen mussten nun Experimente durchgeführt werden, die zu einer genaueren Aufklärung des zellulären bzw. molekularen Mechanismus führten.

Hierzu wurde zuerst, da sowohl NO als auch cGMP auf die calciuminduzierte Eryptose protektiv wirkten, eine Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nach 1-, 3- und 6-stündiger Inkubation von Erythrozyten mit Ionomycin \pm Nitroprussid in Ringerlösung durchgeführt.

Abbildung 22 zeigt, dass nach drei Stunden durch 0,1 μM Ionomycin ein signifikanter Anstieg der Fluo-3-abhängigen Fluoreszenz zu verzeichnen war. Dieser Calciumeinstrom blieb auch nach 6 Stunden noch bestehen. Die Zugabe von 1 μM Nitroprussid beeinflusste den Calciumeinstrom nicht signifikant, dieser blieb unverändert erhöht. Die Messung zu verschiedenen Zeitpunkten sollte aufklären, ob im Signalling Unterschiede oder Gradienten in den NO-Effekten auftraten; im zeitlichen Verlauf zeigte sich allerdings weder ein schneller noch ein zeitverzögerter

Effekt über die ganze Zeitspanne, die zur Eryptoseauslösung ausreicht. Aus diesen Experimenten konnte also geschlossen werden, dass NO nicht hemmend auf den Calciumeinstrom wirkt, sondern in der Signalkaskade der Eryptose downstream dieses zellulären Signals.

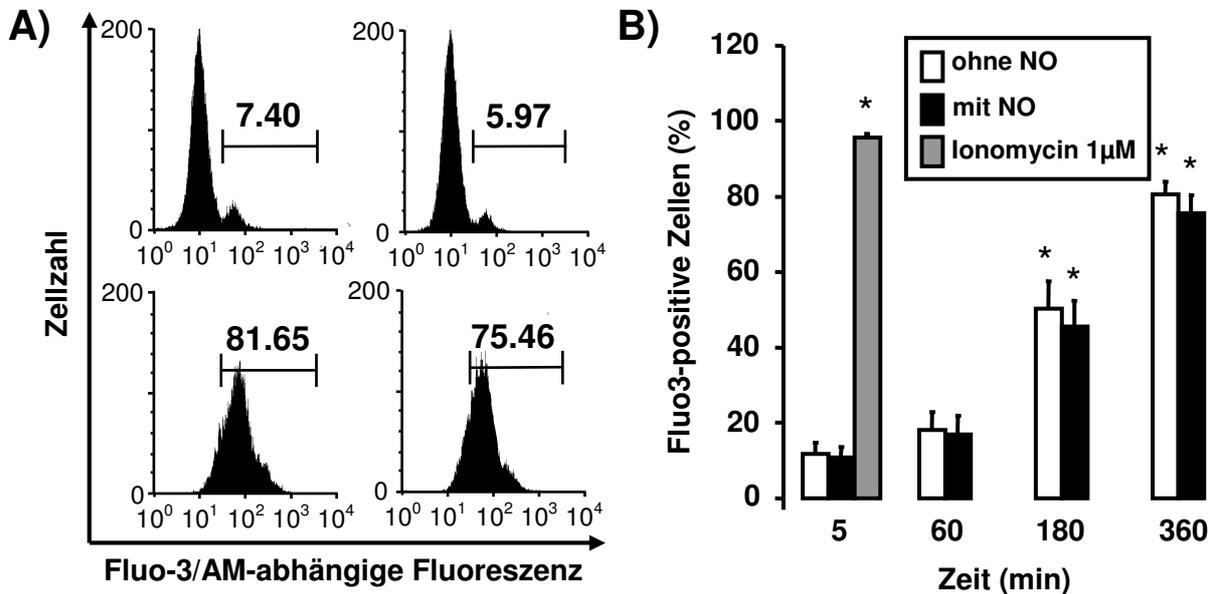


Abbildung 22: Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Inkubation mit Ionomycin ± Nitroprussid in Ringerlösung

- A) Originalhistogramme der Fluo-3-abhängigen Fluoreszenz der Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 4 Stunden bei 37°C mit und ohne 0,1 µM Ionomycin ± 1 µM Nitroprussid inkubiert wurden. Die Anordnung der Histogramme ist gewählt wie in den vorherigen Abbildungen und in Abbildung 15A beschrieben.
- B) Arithmetisches Mittel ± Standardfehler (n=4) der Fluo-3-abhängigen Fluoreszenz in Erythrozyten, die für 1, 3 und 6 Stunden in Ringerlösung ohne und mit 0,1 µM Ionomycin ± 1 µM Nitroprussid behandelt wurden. Als Positivkontrolle wurden Erythrozyten für 1 Stunde mit 1 µM Ionomycin versetzt. * bezeichnet den signifikanten Unterschied der Fluoreszenz von der korrespondierenden Negativkontrolle ungestresster Erythrozyten in Ringerlösung zum Zeitpunkt t = 0 min im ANOVA-Test (P < 0,05).

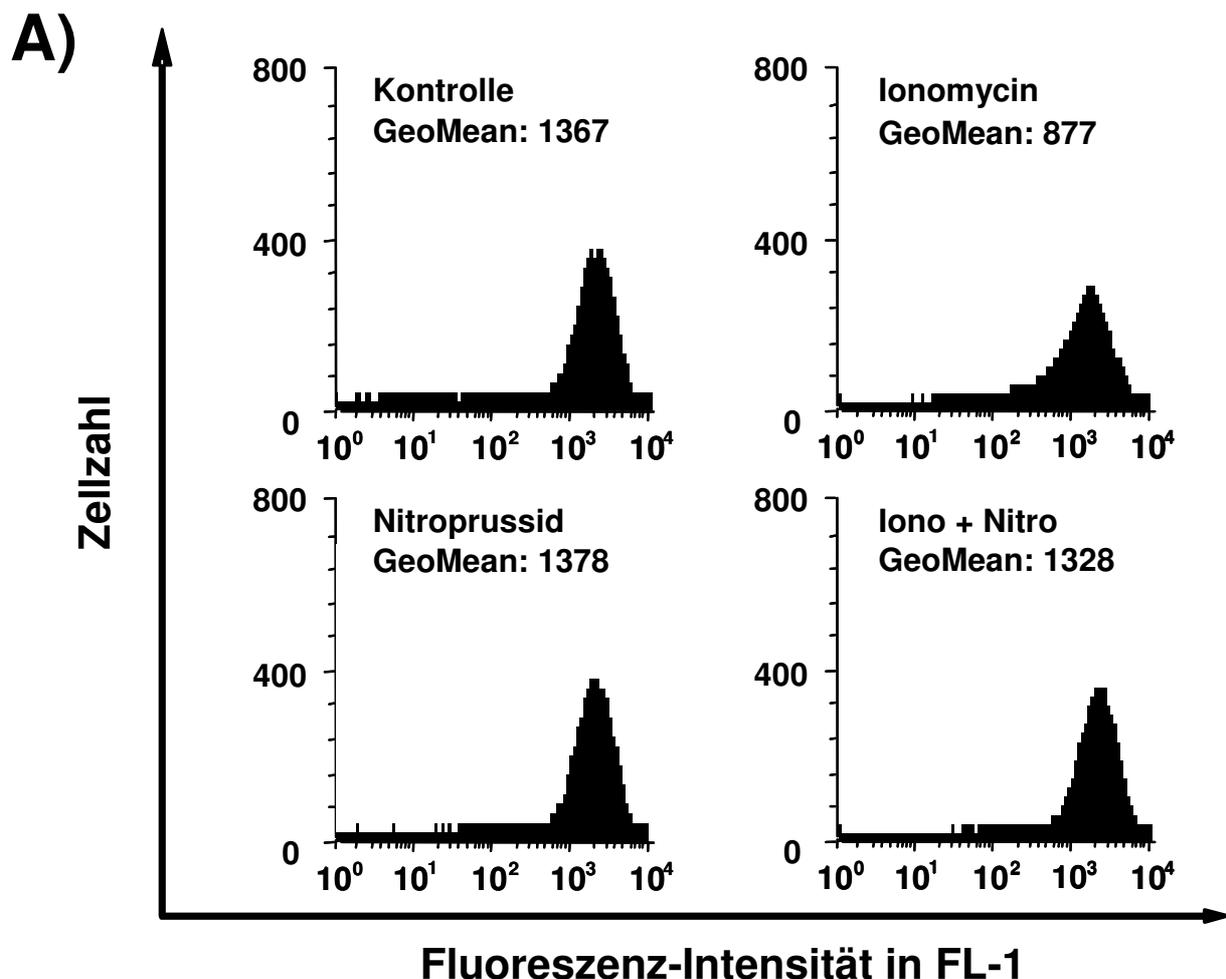
3.6 Messung der „Scrambling“-Aktivität der Zellmembran mit NO

Nachdem nun gezeigt war, dass ein Einfluss von NO auf den Calciumeinstrom in die Zelle bzw. die intrazelluläre Calciumkonzentration mechanistisch nicht bei der protektiven Wirkung von NO auf die ionomycin-vermittelte Eryptose nachzuweisen war, wurde in einer weiteren Experimentserie überprüft, ob NO das letzte Glied in der Signalkette der Eryptoseauslösung, die Phosphatidylserin-(PS)-Exposition, direkt beeinflussen konnte. Diese stellt die gemeinsame Endstrecke aller durch Stressoren

induzierten Eryptosewege dar und müsste folglich bei Anwesenheit von NO Effekte zeigen, da NO auf alle Wege wirkt.

Dazu wurde die oben beschriebene Methode zur Messung der Scrambling-Aktivität eingesetzt, die das Ausmaß an exponiertem PS bestimmt.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente, bei denen Erythrozyten für 4 Stunden bei 37°C in Ringerlösung mit und ohne 0,1 µM Ionomycin ± 1 µM Nitroprussid behandelt wurden. Dabei zeigte sich nach 4 Stunden, dass die Fluoreszenzintensität in der mit Ionomycin inkubierten Probe nach 4 Stunden gegenüber der Kontrolle in Ringerlösung deutlich gesunken war. Wie in 2.4.4 beschrieben, bedeutet verringerte Fluoreszenz eine erhöhte PS-Exposition; Ionomycin verstärkte die PS-Exposition also, wie erwartet, deutlich. Bei zusätzlicher Zugabe von Nitroprussid zeigte sich allerdings eine vollständige Aufhebung dieses Effektes. NO inhibiert also die ionomycin-induzierte PS-Exposition, was zumindest einen Teil des Mechanismus des protektiven NO-Effektes auf die Eryptose darstellt.



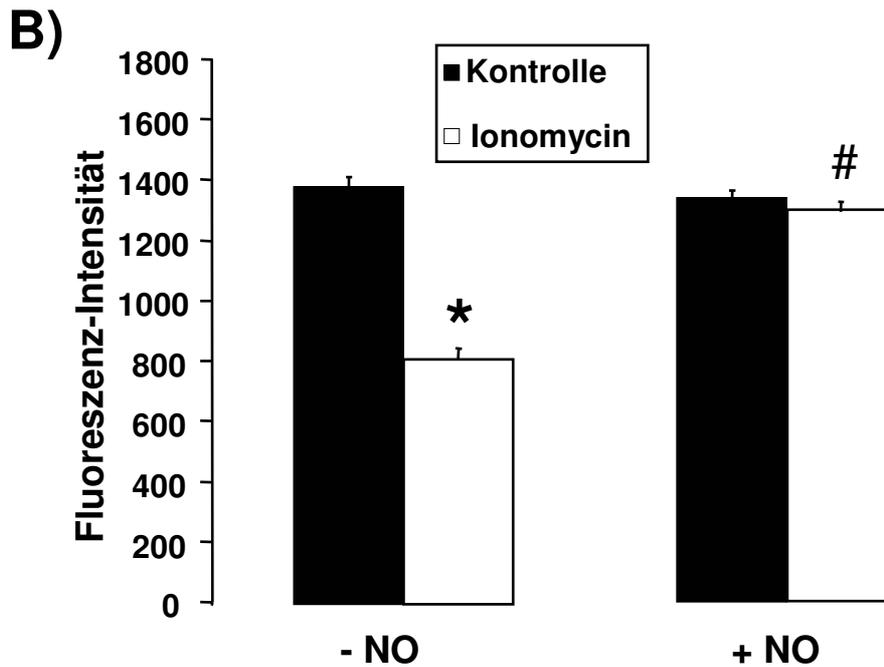


Abbildung 23: Messung des PS-Scrambling an der Zellmembran mit Ionomycin und Nitroprussid

- A) Originalhistogramme der Scrambling-Messung in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung bei 37°C 4 Stunden lang mit und ohne 0,1 μM Ionomycin \pm 1 μM Nitroprussid inkubiert wurden.
- B) Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler ($n=4$) der Messung des PS-Scrambling in Ringerlösung ohne und mit 0,1 μM Ionomycin \pm 1 μM Nitroprussid. * bezeichnet den signifikanten Unterschied der Fluoreszenz von der korrespondierenden Negativkontrolle ungestresster Erythrozyten in Ringerlösung, # bedeutet Signifikanz gegenüber der Probe mit Ionomycin. (ANOVA; $P < 0,05$).

3.7 Messung des Gehalts an S-nitrosylierten Thiolgruppen

Ein weiterer Mechanismus, über den NO Einfluss auf die Apoptose nehmen kann, ist über die Nitrosylierung von regulatorischen Cystein-Thiolgruppen zellulärer Proteine. Dabei können einerseits proapoptotisch wirkende Proteine durch Nitrosylierung inaktiviert werden, auf der anderen Seite reduzieren proapoptotische Stimuli den Gehalt an nitrosylierten Proteinen, was zur Apoptoseauslösung als entscheidend angesehen wird [Hoffmann et al., 2001; Mannick et al., 1999].

Um diesen Effekt auch für die Apoptose in Erythrozyten zu überprüfen, wurde der Grad an nitrosylierten Thiolgruppen mit und ohne Ionomycin als Erythrozyten-induzierendem Stimulus gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 24 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit 0,1 μM Ionomycin für 6 Stunden den Gehalt an nitrosylierten SH-Gruppen auf $< 40\%$ des Gehaltes in ungestressten Kontrollerythrozyten in Ringerlösung reduzierte.

Zusätzliche Inkubation mit 100 μM NOC-15 (dargestellt in Abb. 24) oder mit 1 μM Nitroprussid (nicht gezeigt) hob diesen Effekt vollständig auf, der Gehalt an S-nitrosylierten Gruppen blieb konstant bei 100 %, was mit der deutlich reduzierten PS-Expositionsrate in der Annexin-V-Messung korrelierte.

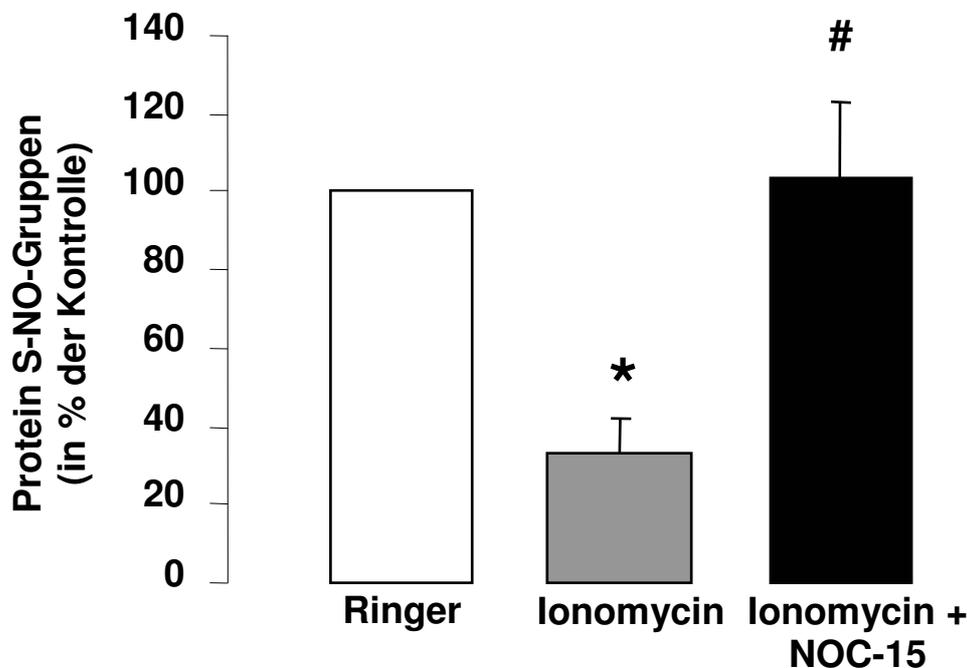


Abbildung 24: Messung des Gehalts von S-nitrosylierten Thiolgruppen mit Ionomycin und NOC-15

*Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler ($n=4$) der Messung S-nitrosylierter Thiol-Gruppen ohne und mit 0,1 μM Ionomycin \pm 100 μM NOC-15 in Ringerlösung nach 6 Stunden bei 37°C. * bezeichnet den signifikanten Unterschied des Nitrosylierungsgehaltes von der korrespondierenden Negativkontrolle ungestresster Erythrozyten in Ringerlösung, # bedeutet Signifikanz gegenüber der Probe mit Ionomycin. (ANOVA; $P < 0,05$).*

3.8 Messung der Thioredoxin-Aktivität

Eines der protektiven Enzyme, die durch S-Nitrosylierung modifiziert und reguliert werden, ist das Thioredoxin (Trx). Wie unter 2.6 beschrieben, wirkt es oxidativem Stress entgegen, indem es mit Hilfe von zwei Thiolgruppen oxidierte Proteine und Lipide reduzieren kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym in kernhaltigen Zellen durch S-Nitrosylierung des Cys 69-Restes aktiviert wird [Haendeler et al., 2002]. Deswegen sollte in einer weiteren Experimentserie untersucht werden, ob Calciueinstrom durch Ionomycin bzw. NO-Zugabe durch NOC-15 bzw. Nitroprussid die Aktivität von Trx in Erythrozyten beeinflussen kann. Wie

in Abbildung 25 dargestellt, reduzierte die 6-stündige Inkubation der Erythrozyten mit 0,1 μM Ionomycin die reduktive Trx-Aktivität auf ca. 60 % der Enzymaktivität ungestresster Kontrollerythrozyten in Ringerlösung. Zusätzliche Behandlung der Zellen mit 100 μM NOC-15 (ebenfalls dargestellt in Abb. 25) oder mit 1 μM Nitroprussid (nicht gezeigt) hob diese Reduktion fast komplett auf, die antiapoptotisch wirkende Aktivität von Trx blieb beinahe konstant bei 100 %. Auch diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit der deutlich reduzierten PS-Expositionsrate in der Annexin-V-Messung bzw. mit dem Gehalt an S-nitrosylierten Gruppen.

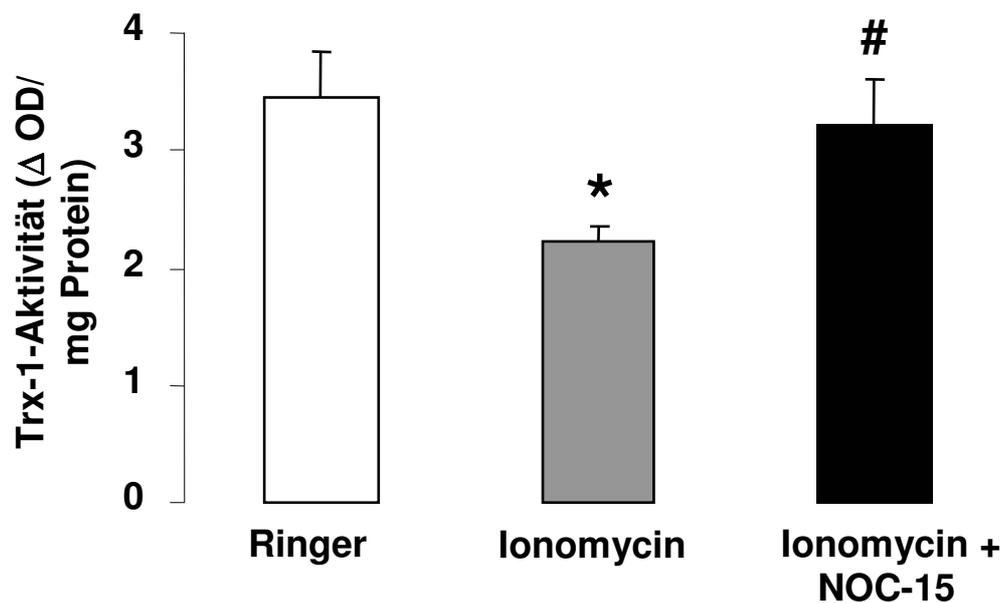


Abbildung 25: Messung der erythrozytären Trx-Aktivität mit Ionomycin und NOC-15

*Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=4) der Aktivitätsbestimmung von Trx-1 ohne und mit 0,1 μM Ionomycin \pm 100 μM NOC-15 in Ringerlösung nach 6 Stunden bei 37°C. * bezeichnet den signifikanten Unterschied der Enzymaktivität von der korrespondierenden Negativkontrolle ungestresster Erythrozyten in Ringerlösung, # bedeutet Signifikanz gegenüber der Probe mit Ionomycin. (ANOVA; $P < 0,05$).*

3.9 Bestimmung der „Clearance“ fluoreszenzmarkierter Erythrozyten

3.9.1 Messung der Clearance unter Stress

Nachdem der Mechanismus der Inhibition des apoptotischen Erythrozytentodes durch Stickstoffmonoxid weitgehend aufgeklärt war, sollte die Relevanz dieser Hemmung in vivo überprüft werden, da alle bisherigen Experimente nur mit isolierten Erythrozyten in vitro durchgeführt wurden.

Hierzu verwendeten wir ein Tiermodell, bei dem Mäuse, die über keine funktionelle endotheliale NO-Synthase (eNOS) verfügten, und verglichen sie mit gesunden Wildtyp-Mäusen, die über ein funktionierendes Enzym verfügten. Dabei wurden in einem ersten Experiment Erythrozyten aus beiden Mausgenotypen entnommen, mit CFSE fluoreszent markiert und analog zu den in-vitro-Experimenten mit Ionomycin (10 μ M für 1 Stunde; entsprechend den in der Literatur angegebenen verwendeten Konzentrationen) versetzt und dann den entsprechenden Spendermäusen reinjiziert. Die unter 2.7 beschriebene Messung der Clearance in der Milz erfolgte anschließend kontinuierlich über 2 Stunden, so dass eine zeitabhängige Wirkungskurve erstellt werden konnte.

Bei dieser Messung ergaben sich die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse. Sie zeigt den Anteil CFSE-markierter gestresster Zellen an der Gesamterthrozytenzahl im zirkulierenden Blut an, woraus man indirekt die Clearancerate bestimmen kann. Hierbei zeigte sich, dass bereits nach 20 Minuten ein signifikanter Unterschied der Clearance zu beobachten war. Der Anteil markierter Zellen war in den Wildtyp-Mäusen mit $4,70 \pm 0,21$ % deutlich höher als in den Knockout-Mäusen mit $3,14 \pm 0,27$ %, so dass deutlich weniger mit Ionomycin gestresste Zellen in den Tieren, die über eine funktionell nicht eingeschränkte eNOS verfügten, ausgesondert wurden. Die Funktion der eNOS schützt also auch in vivo vor Eryptose und anschließender Clearance PS-exponierender Zellen in der Milz.

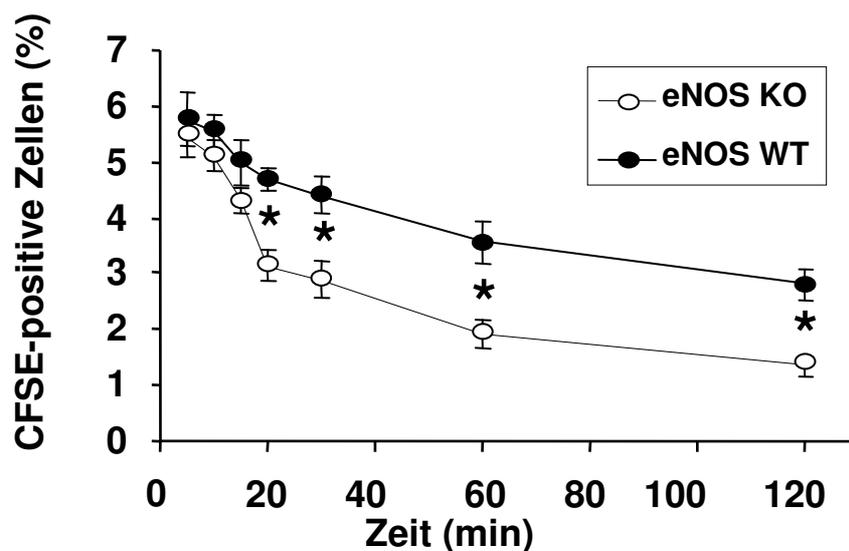


Abbildung 26: Messung der Clearance von Erythrozyten in eNOS^{-/-}-Mäusen vs. Wildtyp-Mäusen im peripheren Blut unter Stress

*Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=4) des Anteils CFSE-positiver Zellen im peripheren Blut von eNOS^{-/-}-(KO) Mäusen vs. Wildtyp-(WT) Mäusen, die für 1 Stunde mit 10 μ M Ionomycin versetzt und in gleicher Menge in beide Genotypen reinjiziert wurden, in Abhängigkeit von der Zeit. * bezeichnet den signifikanten Unterschied der markierten Zellen in eNOS^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen, die als Kontrolle fungierten. (ANOVA; P < 0,05).*

3.9.2 Messung ungestresster Erythrozyten

In den beschriebenen Experimenten ließ sich zeigen, dass in Analogie zu den in-vitro-Experimenten mit Ionomycin und NO auch die physiologische NO-Produktion der eNOS in vivo die stressinduzierte Eryptose durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration signifikant inhibieren kann.

In einer weiteren Experimentenserie wurde auf diese artifizielle Form von Zellstress verzichtet und die Clearance komplett ungestresster markierter Erythrozyten beider Genotypen in demselben eNOS-Tiermodell gemessen.

Dabei wurden die markierten Zellen einerseits in das jeweilige Spendertier reinjiziert; andererseits wurden sie in davon getrennten Experimenten einem Tier des jeweils anderen Genotyps appliziert. In diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob der unter Stress beobachtete Effekt eher auf einen Defekt der Zellen oder des zirkulatorischen Gefäßsystems durch den Gendefekt zurückzuführen war.

Hierbei wurde nach der Markierung, die wie unter 2.7 beschrieben durchgeführt wurde, eine längere Reaktionszeit im Bereich von Tagen zwischen der Markierung und der Messung gewählt, da eine viel geringere Stimulation der Eryptose zu erwarten war als im Falle gestresster Zellen.

Abbildung 27 stellt die Ergebnisse dieser Messungen in Abhängigkeit von der Zeit dar. Hierbei zeigte sich auch für unbehandelte Erythrozyten, wie in Abbildung 27a dargestellt, dass die Erythrozyten der eNOS-Knockout-Maus auch im ungestressten Zustand deutlich schneller abgebaut werden als die der entsprechenden Wildtyp-Tiere, was sich im geringeren Anteil markierter Zellen im peripheren Blut niederschlug. Dieser Effekt war bereits nach einem Tag signifikant und verstärkte sich bis zum dritten Tag noch weiter. Dann musste die Messung abgebrochen werden, da der Abbau des Farbstoffs dann keine akkuraten Aussagen mehr zuließ.

In Abbildung 27b sind dann die oben beschriebenen „cross-over“-Experimente dargestellt, bei denen die markierten Erythrozyten in die Tiere der jeweils anderen Genotypen injiziert wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Erythrozyten der Wildtypmäuse in den Knockout-Mäusen schneller abgebaut wurden als die der eNOS^{-/-}-Tiere in den Wildtyp-Tieren. Diese Beobachtungen gaben einen Hinweis darauf, dass

der proeryptotische Effekt durch das Fehlen der funktionellen eNOS sich eher im Gefäßsystem der Tiere als in den Zellen selbst manifestiert.

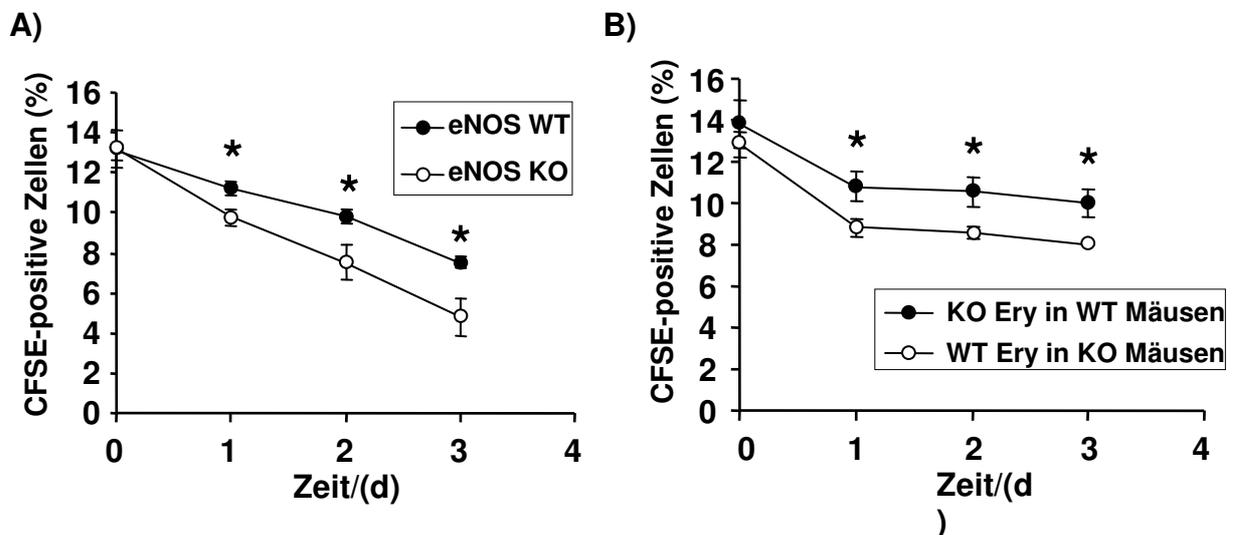


Abbildung 27: Messung der Clearance von Erythrozyten in eNOS^{-/-}-Mäusen vs. Wildtyp-Mäusen im peripheren Blutstrom ohne Stress

- A) Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=4) des Anteils CFSE-positiver Erythrozyten im peripheren Blut von eNOS^{-/-}-(KO) Mäusen vs. Wildtyp-(WT) Mäusen, die mit CFSE markiert und anschließend in gleicher Menge in die Spendertiere reinjiziert wurden, in Abhängigkeit von der Zeit. * bezeichnet den signifikanten Unterschied des Anteils der markierten Zellen in eNOS^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen, die als Kontrolle fungierten. (ANOVA; $P < 0,05$).
- B) Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=4) des Anteils CFSE-positiver Zellen im peripheren Blut von eNOS^{-/-}-(KO) Mäusen vs. Wildtyp-(WT) Mäusen, die mit CFSE markiert und anschließend in gleicher Menge in Tiere des jeweils anderen Genotyps reinjiziert wurden, in Abhängigkeit von der Zeit. * bezeichnet den signifikanten Unterschied zwischen den beiden beschriebenen Vergleichsgruppen. (ANOVA; $P < 0,05$).

3.9.3 Messung der Clearance in der Milz

Erythrozyten, die als Apoptosekennzeichen und Signal zur Phagozytose Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche präsentieren, werden von Makrophagen der Milz aus dem zirkulierenden Blutstrom ausselektiert.

Deswegen sollte eine gesteigerte Clearance, wie sie bei den eNOS^{-/-}-Mäusen zu finden war, mit einer ebenfalls gesteigerten Anreicherung CFSE-markierter Erythrozyten in der Milz der Tiere einhergehen. Zur Kontrolle bzw. Bestätigung dieses Phänomens der gesteigerten Clearance wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob in der Milz der eNOS^{-/-}-Tiere eine erhöhte Fluoreszenz beim unter 3.9.2 beschriebenen Versuchssetting zu messen war.

Hierzu wurden die Mäuse des in 3.9.2 beschriebenen Experiments nach der Messung am dritten Tag getötet; anschließend wurde die Milz entfernt und die Fluoreszenz der aufgearbeiteten Suspensionen wie unter 2.7 beschrieben gemessen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 28 dargestellt. Es zeigte sich wie erwartet in Analogie zur Clearance-Messung im peripheren Blut, dass der Anteil CFSE-markierter Erythrozyten in der Milz der eNOS-Knockout-Mäuse signifikant höher ist als in der Milz der entsprechenden Wildtyp-Tiere. Auch diese Messung ergab, dass die Präsenz einer funktionell aktiven eNOS protektiv auf die Eryptose wirkt bzw. die Lebensdauer der Zellen *in vivo* verlängert.

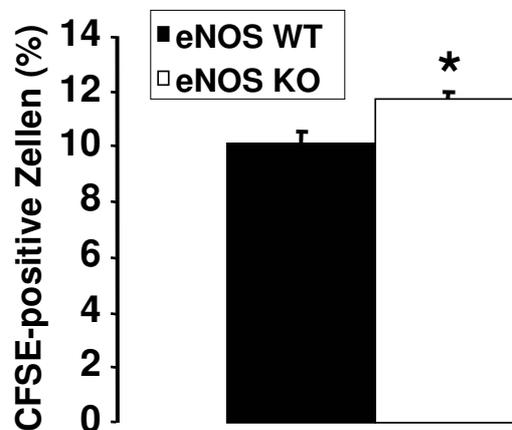


Abbildung 28: Messung der Clearance von Erythrozyten in eNOS^{-/-}-Mäusen vs. Wildtyp-Mäusen in der Milz

*Arithmetisches Mittel ± Standardfehler (n=4) des Anteils CFSE-positiver Erythrozyten in der Milzsuspension von eNOS^{-/-}(KO) Mäusen vs. Wildtyp-(WT) Mäusen, die mit CFSE fluoreszent markiert und anschließend in gleicher Menge in die jeweilige Spendermaus reinjiziert wurden, nach 3 Tagen Inkubation. * bezeichnet den signifikanten Unterschied des prozentualen Anteils markierter Zellen in der Milz von eNOS^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen, die als Kontrolle fungierten. (t-test; P < 0,05).*

3.10 Messungen mit hohen Konzentrationen von NO

Die protektive Wirkung auf die Apoptose kernhaltiger Zellen ist in der Literatur allerdings nur für geringe Konzentrationen von NO beschrieben. Hohe Konzentrationen von NO führen im Gegenteil in diesen Zellen zu einer Aktivierung der Signalkaskade der Apoptose (s. Einleitung Kap. 1.4.2), so dass NO konzentrationsabhängig als pro- oder antiapoptotisches Signal wirken kann [Duan and Chen 2007; Taylor et al., 2003].

Auf Grund der Beobachtung dieses Phänomens in kernhaltigen Zellen sollte nun in einer weiteren Experimentserie auch für Erythrozyten überprüft werden, ob höhere Konzentrationen von NO zu einer Auslösung der Apoptose führen können.

Deswegen wurden Erythrozyten mit 0,1 mM bzw. 1 mM Nitroprussid bzw. NOC-15 versetzt und die Phosphatidylserin-Exposition und der forward scatter nach 24 Stunden bestimmt. Hierbei zeigte sich, wie in Abbildung 29 dargestellt, dass bereits die Konzentration von 0,1 mM NO, was dem Hundertfachen der noch protektiv wirkenden Konzentration entspricht, die Erythrozytenrate nach 24 Stunden von $3,57 \pm 0,43 \%$, dem Wert der Kontrolle, auf $31,91 \pm 1,82 \%$ ansteigen ließ, bei einer Konzentration von 1 mM sogar auf $78,37 \pm 1,99 \%$. Dies zeigt, dass hohe Konzentrationen von NO auch in Erythrozyten Apoptose auslösen können und NO somit auch hier als Schaltmolekül der Apoptoseauslösung wirken kann.

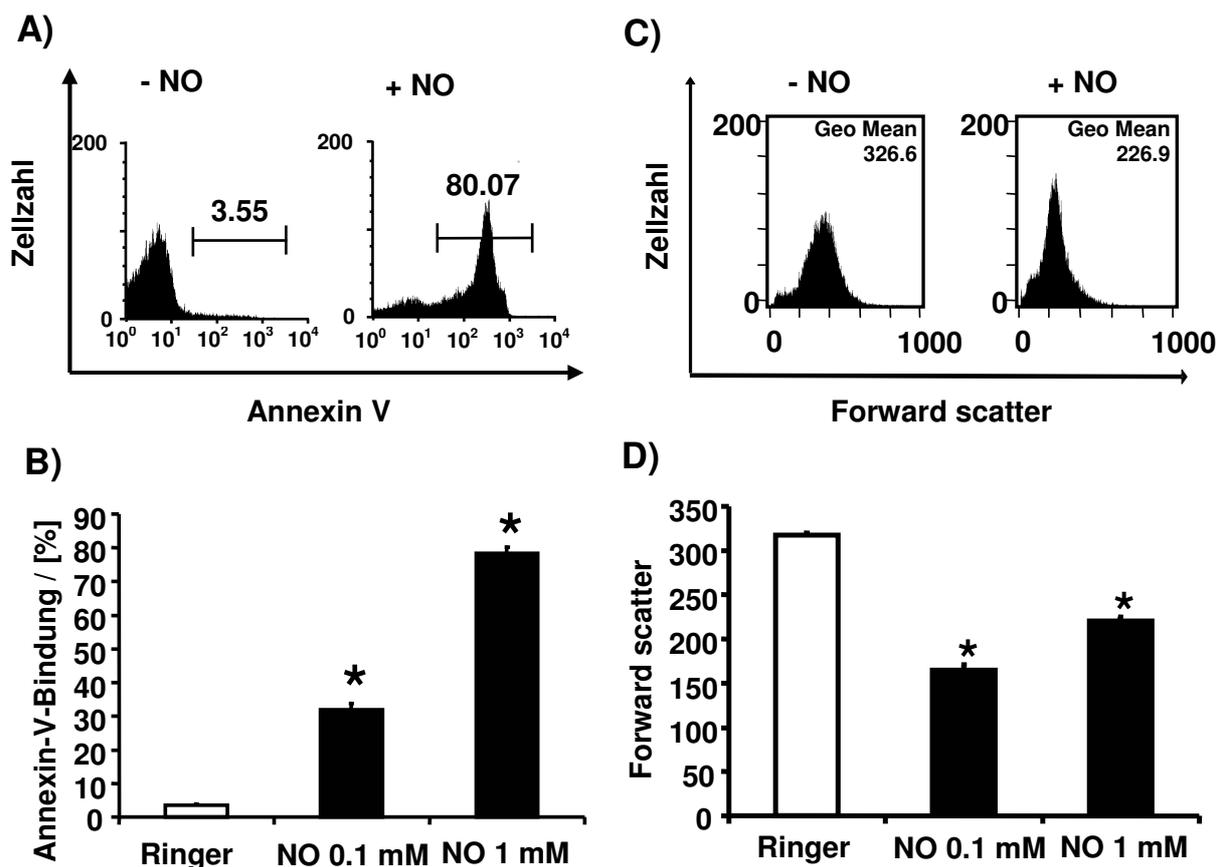


Abbildung 29: Messung der Annexin-V-Bindung und Forward scatter mit hohen Konzentrationen von NO nach 24 Stunden in Ringerlösung

A) Originalhistogramme Annexin-V bindender Zellen in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung für 24 Stunden bei 37°C ohne und mit 1 mM Nitroprussid inkubiert wurden.

- B) *Mittelwert Annexin-V-bindender Zellen (angegeben in % der Gesamtzellpopulation) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten nach 24 h bei demselben Experiment (arithmetisches Mittel \pm SEM; n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0.05$).*
- C) *Originalhistogramme des Forward scatter in einem repräsentativen Experiment, bei dem Erythrozyten in Ringerlösung bei 37°C 24 Stunden lang ohne und mit 1 mM Nitroprussid inkubiert wurden.*
- D) *Arithmetisches Mittel \pm SEM des Forward scatter (angegeben in relativen, gerätespezifischen Einheiten) in der durchflusszytometrischen Analyse von Erythrozyten bei demselben Experiment (n=4). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (ANOVA; $P \leq 0.05$).*

Bei der durchflusszytometrischen Messung des Forward scatter ergab sich in Analogie zu den Annexin-V-Ergebnissen, dass die hohen Konzentrationen von NO zu einer deutlichen Schrumpfung der Zellen, die sich in einer Minderung des Forward scatter von 50 % bzw. 30 % widerspiegelte, führten. Bemerkenswert war hierbei allerdings, dass die Abnahme des Forward scatters nicht mit der Konzentration korrelierte, sondern zuerst abnahm und anschließend wieder anstieg.

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den vorliegenden Experimenten wurde das physiologische Signalmolekül Stickstoffmonoxid auf seine Potenz getestet, die Erythrozytenapoptose zu beeinflussen.

Aus Nitroprussid freigesetztes NO war in der Lage, in physiologisch relevanten Konzentrationen in gesunden Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen in Ringerlösung die durch Ionomycinzugabe und darauf folgenden Calciumeinstrom induzierte Phosphatidylserin-Exposition signifikant zu inhibieren. Diese protektive Wirkung zeigte sich auch bei anderen Formen des zellulären Stresses durch chloridfreie, hyperosmolare und glucosefreie Lösung und durch Ceramid. Analog dazu konnte NO auch die durch Ionomycin und Stresslösungen ausgelöste Zellschrumpfung inhibieren, was bei Stress durch Ceramid nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse ließen sich auch mit anderen NO-Donatoren wie NOC-15 reproduzieren. Der im Signalling auf den NO-Stimulus freigesetzte Second messenger cGMP hemmte signifikant die calciuminduzierte Eryptose, während die ceramidvermittelte Eryptose dadurch unbeeinflusst blieb. Zumindest ein Teil der NO-Wirkung lässt sich also über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und folgende cGMP-Freisetzung erklären. Mechanistisch zeigte sich außerdem, dass die NO-Wirkung auf die Erythrozytenapoptose nicht durch eine quantitative Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentration zustande kommt, da diese

durch NO unbeeinflusst blieb. Neben der Wirkung über cGMP wurde auch der Scrambling-Apparat, der für die Externalisierung von Phosphatidylserin verantwortlich ist, durch NO direkt inaktiviert. Außerdem zeigte sich, dass NO-Donatoren den Gehalt an S-nitrosylierten Protein-Thiolgruppen, der durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration drastisch abnimmt, wieder signifikant steigern können. Speziell das reduktiv tätige zellprotektiv wirksame Enzym Thioredoxin-1 konnte in Erythrozyten durch NO-Donatoren aktiviert werden, was auf die Nitrosylierung regulatorischer Thiolgruppen zurückzuführen ist.

Auch in vivo wurde die Relevanz dieser Ergebnisse gezeigt, da die Lebensdauer der Erythrozyten in Mäusen ohne funktionelle eNOS deutlich kürzer ist als in gesunden Wildtyp-Mäusen. Die Clearance von Erythrozyten in der Milz ist dementsprechend in eNOS^{-/-}-Tieren signifikant gesteigert.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von NO auf die Eryptose analog zu kernhaltigen Zellen konzentrationsabhängig ist, in geringen Konzentrationen wirkt es protektiv, in höheren Konzentrationen dagegen apoptoseauslösend.

Tabelle 9 zeigt noch einmal die Tendenzen und Wirkungen auf, die die Messung des jeweiligen Reagenzes ergab. Der Pfeil nach oben bedeutet eine Erhöhung, der Pfeil nach unten steht für eine Verringerung, während der horizontale Doppelpfeil anzeigt, dass keine Veränderung eintrat.

Tabelle 9. Zusammenfassung der Messergebnisse

	Nitroprussid	NOC-15	db-cGMP
Annexin-V-Bindung			
Ringer-Lösung 24h	↓		
Ionomycin 4 h	↓	↓	↓
C ₆ -Ceramid 24 h	↓	↓	↔
Hypertone Lösung	↓		↔
Chloridfreie Lösung	↓		↓
Glucosefreie Lösung	↓		↔
Forward scatter			
Ringer-Lösung 24h	↔		
Ionomycin 4 h	↑	↑	↓
C ₆ -Ceramid 24 h	↑	↑	↔
Hypertone Lösung	↑		↔
Chloridfreie Lösung	↑		↓
Glucosefreie Lösung	↑		↔
Intraz. Ca²⁺-Gehalt	↔	↔	
S-Nitrosylierungsrate	↑	↑	
Trx-1-Aktivität	↑	↑	
Scrambling-Aktivität	↓	↓	

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Erklärungen zu den Messungen

Bei der Charakterisierung der Eryptose werden durchflusszytometrische Messmethoden zur Quantifizierung der PS-Exposition und somit der Apoptose- und Eryptoserate, zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration schon seit langer Zeit verwendet, deswegen sind sie valide und gut etabliert. Zur Minimierung des Risikos für das Auftreten von Fehlmessungen oder falschen Ergebnissen wurden zusätzlich für alle Messungen unabhängige Doppelbestimmungen einer Probe durchgeführt und darüber hinaus jeweils $n = 4$ verschiedene Blutproben unterschiedlicher Blutgruppen gemessen. Dabei zeigten sich bei den Doppelbestimmungen gute Übereinstimmungen der Messwerte. Die relativen Fehler bei den Messungen waren gering, so dass auftretende Signifikanz valide und eindeutige Aussagen über das Eryptoseverhalten erlaubte. Gleiches gilt neben den durchflusszytometrischen Messungen auch für die photometrischen Messungen und die Tierexperimente, die ebenfalls gut etabliert und mit $n = 4$ Proben unter jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt wurden und signifikante Ergebnisse lieferten.

Bei allen durchflusszytometrischen und photometrischen Messungen wurden Ansätze mit Hämatokritwerten (Hct) verwendet, die mit 0,3 % bis 0,6 % deutlich unterhalb physiologischer Hct-Werte lagen. Diese liegen normalerweise für Frauen im Bereich von 37 % - 47 % und für Männer zwischen 40 % - 54 %. Die Verwendung der niedrigen Werte begründet sich in den folgenden technischen und inhaltlichen Überlegungen: erstens sind hierbei optimale rheologische Eigenschaften für die durchflusszytometrische Messung gewährleistet, da höhere Hct-Werte und somit höhere Zelldichten die Auflösung der Einzelzelldetektion negativ beeinflussen können und die Gefahr beinhalten, die Ansaugdüse des FACS-Geräts zu verstopfen. Zweitens soll der niedrige Hct den Umstand ausgleichen, dass die Inkubationszeit in den vorliegenden in-vitro-Experimenten maximal 48 Stunden betrug, während der durch die Medikamente oder Stresslösungen ausgelöste zelluläre Stress in vivo deutlich länger, meist über ihre ganze 120-tägige Lebensdauer, auf die Erythrozyten einwirkt. Außerdem soll er gewährleisten, dass die Konzentration aller eingesetzten Stoffe im Ansatz konstant bleibt und nicht durch Aufnahme ins Zellinnere verfälscht beziehungsweise verändert wird.

Dem Arbeiten mit diesen niedrigen Hct-Werten liegen also funktionelle Erwägungen zu Grunde, wobei gesichert war, dass die Relevanz der Experimente hierdurch nicht eingeschränkt wurde.

4.2 Eryptose durch Calciumstress

Die initial durchgeführten Messungen, die zur Kontrolle der Spontaneryptoserate dienten, zeigten, dass gesunde, nicht a priori durch Stress vorbelastete Zellen zur Verfügung standen. Die PS-Expositionsrate ohne Inkubation lag bei 1,2 %, was dem physiologischen Wert in vivo exakt entspricht. Die Erhöhung nach 24 Stunden Inkubation auf 4,4 % lässt sich wahrscheinlich auf die Plasmadeprivation und die Inkubation in Ringerlösung unter semisterilen Bedingungen zurückführen.

Zunächst wurde durch die durchflusszytometrischen Experimente bestätigt, dass die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die hier durch den Ionophor Ionomycin vermittelt wurde und einen der stärksten bekannten Induktoren erythrozytärer Apoptose darstellt, die PS-Exposition von Erythrozyten deutlich erhöht und dadurch Eryptose auslöst [Lang et al., 2004a]. Die Experimente mit Nitroprussid zeigten, dass das freigesetzte Signalmolekül NO in der Lage ist, bereits ab einer Konzentration von 1 nM signifikant die durch Calciumanstieg ausgelöste PS-Exposition zu verringern, was als wichtiges Indiz für die protektive Wirkung auf die Eryptose gewertet werden kann [Lang et al., 2005a]. Ferner führte die Behandlung der Zellen mit Ionomycin zu einer deutlichen Zellschrumpfung im forward scatter, die normalerweise immer mit calciumvermittelter Eryptose einhergeht, ebenfalls ein unter NO-Behandlung reversibler Effekt. Auch die Zellschrumpfung ist ein Marker für Eryptoseinduktion [Lang et al., 2005a], so dass durch diese Beobachtungen ein weiteres Indiz für die antieryptotische Wirkung von Nitroprussid gegeben war. Die Zellschrumpfung lässt sich im Fall der calciumvermittelten Eryptose dadurch erklären, dass der Calciumeinstrom in die Zelle die calciumsensitiven K⁺-Kanäle oder Gardos-Kanäle aktiviert, woraufhin Kalium aus der Zelle ausströmt. Dadurch wird die Zellmembran hyperpolarisiert, was wiederum einen Chloridionenausstrom aus dem Zellinneren nach sich zieht. Aus osmotischen Gründen strömt Wasser entlang des Gradienten vom Zellinneren nach extrazellulär, um einen Ausgleich der Ionenstärken intra- und extrazellulär zu erreichen, was wiederum zu einer signifikanten Schrumpfung der Zelle führt [Lang et al., 2003c; Myssina et al., 2004].

In Kontrollexperimenten mit anderen NO-Donatoren wie NOC-15 unter gleichen Bedingungen, die gleiche Resultate erzielten, konnte dabei sichergestellt werden, dass tatsächlich das freigesetzte NO für die beobachteten antiapoptotischen Effekte verantwortlich war.

In zahlreichen kernhaltigen Zellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass NO die Apoptosekaskade inhibieren kann [Dimmeler et al., 1997b; Dimmeler et al., 1997a; Dimmeler and Zeiher 1999; Rossig et al., 1999], allerdings hauptsächlich über Wirkungen auf caspasenabhängige bzw. mitochondrial vermittelte Signalwege, die im Erythrozyten nicht existieren bzw. inaktiv zu sein scheinen [Berg et al., 2001]; zumindest sind diese Signalwege für die calciumvermittelte Eryptose nicht relevant. Die hier vorliegenden Messungen der Annexin-V-Bindung und des Forward scatters in kernlosen Zellen zeigen, dass NO auch über Effekte auf caspasenunabhängige Wege in der Lage ist, Apoptosekaskaden und PS-Externalisation zu inhibieren. Die zur signifikanten Abschwächung der Annexin-Bindung und Zellschrumpfung benötigten Nitroprussid-Konzentrationen lagen in einem Konzentrationsbereich, der sogar noch deutlich unterhalb der Konzentrationen liegt, die benötigt werden, um in kernhaltigen Zellen Apoptose zu inhibieren [William et al., 2005]. Die verwendeten Konzentrationen sind sogar in Bereichen angesiedelt, die lokal physiologisch als Resultat der körpereigenen NO-Biosynthese auftreten können, was unterstreicht, dass dem Signalmolekül NO in vivo eine weitere physiologische Rolle zuzukommen scheint, nämlich als hochpotentes Regulatormolekül der Eryptose.

Dabei muss auch festgehalten werden, dass der Effekt von NO auf die Eryptose analog zu seiner Wirkung in kernhaltigen Zellen konzentrationsabhängig variiert. Denn auch in Erythrozyten führte die Einwirkung von NO-Donatoren in unphysiologisch hohen Konzentrationen, wie sie allerdings lokal im Rahmen immunologischer Prozesse auftreten können, zu einer Steigerung der Apoptoserate statt zu einer Verringerung. Diese Effekte treten allerdings unter physiologischen Bedingungen nicht auf, da solche Konzentrationen von NO nur in absoluten Ausnahmezuständen erreicht werden, wie bei der Sepsis, bei der diese Konzentrationen ein zusätzliches Risiko darstellen [Kilbourn and Griffith 1992].

4.3 Eryptose durch andere physiologische Stressoren

Die Relevanz der hier dargestellten Ergebnisse wurde noch dadurch unterstrichen, dass NO nicht nur die durch Calciumstress ausgelöste Eryptose hemmen konnte.

Der durch Ionomycin vermittelte Calciueinstrom stellt nämlich eine sehr artifizielle Form des Zellstress dar. Deswegen wurde die Wirkung von NO auch auf andere Formen der Eryptose getestet, beispielsweise auf die durch Ceramid induzierte Eryptose, die in vivo durch die Aktivität der Sphingomyelinasen eingeleitet wird, auf die Eryptose durch Glucosedepletion, die zu Mangel an Energie und Reduktionsäquivalenten führt, auf Eryptose durch Ionenkanalaktivität in chloridfreier Lösung und auf eryptotischen Zelltod durch osmotischen Stress in hyperosmolarer Lösung. Dabei ergab sich bestätigend, dass all diese Formen zellulären Stresses die PS-Exposition deutlich steigerten, wobei all diese Zellstressarten in der Apoptoseauslösung lediglich eine gemeinsame Endstrecke des Signallings aufweisen, während die Signalketten recht unterschiedlich sind. Wichtig ist auch zu erwähnen, dass all diese Stressformen in unterschiedlichen Lokalisationen und Situationen des Organismus anzusiedeln sind: oxidativer Stress findet sich verstärkt in der Lunge, osmotischer Stress in der Niere etc. Dennoch haben die Erythrozyten im zirkulierenden Blutstrom all diese Stationen zu passieren und finden sich all diesen Situationen ausgesetzt. Deswegen liegt die Überlegung nahe, dass es einen Regulator der Eryptose geben sollte, der sich im Gefäßsystem befindet und zumindest auf die meisten, wenn nicht sogar auf alle dieser Situationen bzw. Stressformen Effekte zeigt: diese Rolle könnte physiologisch dem Stickstoffmonoxid zukommen. Dies liegt nahe, weil die Einwirkung von NO in denselben Konzentrationen wie bei den Ionomycin-Experimenten auf jegliche getestete physiologische Stressform die Eryptoseraten signifikant senkte, teilweise bis zurück auf die Ausgangswerte der Kontrollen. In vitro konnte dadurch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von NO in physiologischen Konzentrationen die Erythrozyten vor stressinduzierter Apoptose bewahren kann.

Die Unterschiede der Eryptoseauslösung durch die verschiedenen Stressoren bei diesen Experimenten wurde nochmals durch die verschiedenen Effekte der Stressoren auf den Forward scatter der Erythrozyten unterstrichen. Denn obwohl alle Stressformen die Annexin-V-Bindung vervielfachten und somit Eryptose auslösten, war diese in unterschiedlicher Weise von Zellschrumpfung begleitet. Ceramid bewirkte keine signifikante Zellschrumpfung, folglich hatte NO hierbei auch keine Wirkung auf den Forward scatter. Obwohl allerdings die Inkubation in allen Stresslösungen eine deutliche Schrumpfung zur Folge hatte, wirkte NO auf Glucosestress deutlich stärker protektiv als auf hyperosmolaren Stress und Stress

durch Chloriddepletion. Diese Beobachtungen legten nahe, dass NO auf die unterschiedlichen Signalwege der stressvermittelten Eryptose unterschiedlich intensiv wirkt und somit mehrere unterschiedliche und bevorzugte Wirkorte, evtl. auch Wirkmechanismen im Signalling hat.

4.4 Experimente zur Aufklärung des Mechanismus

Nachdem nun das Phänomen der Eryptose-Inhibierung durch NO beschrieben war, stellte sich natürlich die Frage nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus. Bei der Gefäßrelaxation bewirkt NO über die lösliche Guanylatcyclase (sGC) eine Freisetzung von cGMP, das als second messenger das weitere Signalling vermittelt [Vaandrager and de Jonge 1996]. Hierbei kann cGMP auch die intrazelluläre Calciumkonzentration senken, deren Erhöhung bekanntlich Eryptose triggert. Das membrangängige cGMP-Analogon dibutyryl-cGMP (db-cGMP) hatte teilweise auf die stressinduzierte Eryptose eine ähnliche protektive Wirkung wie NO-Donatoren. Dabei wurde bei den Experimenten mit Ionomycin und chloridfreier Lösung, die beide über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wirken, die PS-Exposition deutlich gehemmt, während dieser signifikante protektive Effekt bei Stress durch Ceramid, hypertone Lösung und glucosefreie Lösung nicht zu verzeichnen war. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass zumindest ein Teil der protektiven Wirkung von NO auf die Apoptose auch in Erythrozyten über cGMP vermittelt wird.

In kernhaltigen Zellen aktiviert cGMP die Proteinkinase G, deren Aktivierung bekanntermaßen antiapoptotische Wirkungen auf mehrere Signalsysteme vermittelt [Das et al., 2006; Li and Billiar 1999; Nagai-Kusuhara et al., 2007]. Diese Rolle könnte der Proteinkinase G in der Erythrozytenapoptose ebenfalls zukommen.

Außerdem aktiviert cGMP in kernhaltigen Zellen die Ca^{2+} -ATPase und cGMP-abhängige Ionenkanäle, deren Aktivierung durch Ca^{2+} -Ausstrom aus der Zelle eine Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt [Vaandrager and de Jonge 1996]. Die protektive Wirkung von db-cGMP auf die Eryptose war abgesehen von sehr schwachen Effekten ausschließlich bei Stressformen, die calciumvermittelte Signalwege nutzen, signifikant zu beobachten, so dass die Vermutung nahe liegt, dass zumindest ein Teil der antiapoptotischen Wirkung von NO auf Erythrozyten daherrührt, dass über cGMP-Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase und cGMP-abhängige Ionenkanäle die intrazelluläre Calciumkonzentration gesenkt wird und so die PS-Exposition inhibiert wird.

Die Experimente mit db-cGMP zeigen aber auch klar, dass die protektive Wirkung von NO auf Eryptose neben dem cGMP-Signalling noch über andere Signalwege vermittelt werden muss, denn der zweite Hauptmechanismus der Eryptoseinduktion ausgehend von der Ceramidbildung durch Sphingomyelinasen [Lang et al., 2004a] blieb durch db-cGMP unbeeinflusst. Erwartungsgemäß sank auch im forward scatter das Zellvolumen bei der calciuminduzierten Eryptose, während die ceramid-vermittelte Eryptose nicht von Zellschrumpfung begleitet wurde. Die Mechanismen hierfür sind unter 4.2 erklärt. Interessanterweise war allerdings db-cGMP nur im Falle der ionomycin-vermittelten PS-Exposition in der Lage, die Zellschrumpfung signifikant aufzuhalten. Diese stellt die reinste Form der calcium-gesteuerten Eryptose dar, was die Vermutung nahelegt, dass bei allen anderen Formen der Eryptoseinduktion zumindest neben Calcium noch andere Effekte involviert sind, die die ionenkanalvermittelte Zellschrumpfung überlagern.

In kernhaltigen Zellen entfaltet NO seine antiapoptotische Wirkung neben anderen Effekten, wie beschrieben, auch über die S-Nitrosylierung von Protein-Thiolgruppen an regulatorisch tätigen Enzymen [Benhar and Stamler 2005; Melino et al., 1997]. Zu den antiapoptotisch wirksamen Proteinen, die durch S-Nitrosylierung aktiviert werden, gehören z. B. das Thioredoxin, das auch maßgeblich beteiligt ist bei der Abwehr von oxidativem Stress [Haendeler et al., 2002] und das Ras, das ebenfalls an der Regulation der Apoptose teilnimmt [Zhuravliova et al., 2007]. Die vorliegenden Experimente zur Messung der Menge nitrosylierter Gruppen machten deutlich, dass durch die Behandlung mit Ionomycin der Gehalt an nitrosylierten SH-Gruppen deutlich absank, während durch zusätzliche Koinkubation mit NO-Donatoren wie Nitroprussid oder NOC-15 die Menge an nitrosylierten Gruppen unbeeinflusst blieb. Dieser Effekt korreliert mit der PS-Exposition insofern, als eine Absenkung des S-NO-Gehaltes mit einer Steigerung der PS-Exposition einhergeht. Dabei war auch bemerkenswert, dass die beiden eingesetzten Faktoren Ionomycin und NO-Donator reversibel antagonistisch wirkten und im Überschuss jeweils in der Lage waren, die Wirkungen des anderen aufzuheben.

Das antiapoptotisch wirksame Enzym Thioredoxin (Trx) erhält im Erythrozyten als Teil des Trx/Trx-Reduktase-Systems wie in vielen anderen Zellen maßgeblich das reduktive Milieu aufrecht [May et al., 2007]. Seine antiapoptotische Wirkung leitet sich daher, dass in kernhaltigen Zellen gezeigt werden konnte, dass eine verminderte Trx-Aktivität eine Erhöhung der zellulären Exposition von oxidativem Zellstress

bedeutete, dessen Einwirkung ein starker Apoptoseinduktor ist [Haendeler et al., 2002]. Da für die Aktivierung von Trx die S-Nitrosylierung am Cystein-Rest 69 notwendige Voraussetzung ist, sollte eine Verringerung der Nitrosylierungsrate gleichzeitig eine Einschränkung der reduktiven Trx-Aktivität mit sich bringen. Tatsächlich konnten wir analog zur S-NO-Abnahme bei Behandlung von Erythrozyten mit Ionomycin eine Verringerung der Trx-Aktivität messen, während die Koinkubation mit NO-Donatoren diesen Effekt weitgehend aufhob. Es konnte also gezeigt werden, dass die Trx-Regulation im Erythrozyten durch Nitrosylierung für den apoptotischen Zelltod trotz unterschiedlicher Signalwege eine vergleichbare Rolle spielt wie in kernhaltigen Zellen. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass oxidativer Stress bei der PS-Exposition und infolgedessen der Eryptoseinduktion durch Ionomycin zusätzlich zum Calciumeinstrom oder in derselben Signalkaskade Einfluss haben könnte.

Hierbei zeigte sich nämlich, dass NO die Stärke des Calciumeinstroms in den Intrazellulärraum, der durch Ionomycin ausgelöst wird, nicht signifikant beeinflussen konnte, die Calciummessung ergab unveränderte Werte für NO-behandelte und unbehandelte Zellen bei Ionomycin-Exposition. Deswegen lag nahe, dass NO downstream des Calcium-Signallings in der Eryptose-Kaskade wirkt, während die Calciumkonzentration unbeeinflusst blieb, lediglich die Weiterleitung dieses Signals wird folglich durch NO gehemmt. Diese Vermutung wurde auch durch die Beobachtung untermauert, dass NO auch die ceramidvermittelte Eryptose beeinflusst, die einem Signalling folgt, das von dem der calciuminduzierten Eryptose deutlich zu unterscheiden ist. Wahrscheinlich wirkt NO daher auf die gemeinsame Endstrecke des Signalling: den direkten letzten Schritt, der zur PS-Exposition führt, das Scrambling, durch das PS, das sich im physiologischen Zustand der Zelle nur auf der Innenseite der Membran befindet, enzymatisch aktiv auf das äußere Blatt transportiert wird.

Die Messung der Scrambling-Aktivität ergab, dass Ionomycin die enzymatische Aktivität des Scrambling-Apparates signifikant steigerte, während NO-Zugabe diese Wirkung aufhob. Das Scrambling von PS, ob aktiv oder akzidentell, steht immer im Gleichgewicht mit dem aktiven PS-Transport nach innen, der durch das Enzym Flippase vermittelt wird, so dass das exponierte PS normalerweise gering ist. Deswegen wurde bei unseren Experimenten eine Methode gewählt, mit der ausgeschlossen werden konnte, dass der beobachtete Effekt auf eine Wirkung auf

die Flippase zurückzuführen sein könnte [Frasch et al., 2000]. Auf Grund dessen konnte die Aussage, dass Ionomycin die Scrambling-Aktivität steigert und NO diese senkt, eindeutig getroffen werden. Auch konnte neben den Effekten auf das cGMP-System und das Enzym Trx eine direkte inhibitorische Wirkung von NO auf die Eryptose nachgewiesen und der Wirkort genau lokalisiert werden, wobei die genauen Mechanismen hierbei noch geklärt werden müssen, zumal der genaue molekulare Charakter des Scrambling-Apparates selbst noch weitgehend ungeklärt ist.

4.5 In vivo-Experimente

Nach der Beobachtung der beschriebenen Phänomene und Mechanismen in vitro wurde die Relevanz dieser Ergebnisse in vivo überprüft. Deswegen wurden die Erythrozyten von knockout-Mäusen, die nicht über eine funktionsfähige endotheliale NO-Synthase (eNOS) verfügten, mit denen von gesunden Wildtyp-Mäusen verglichen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass in den KO-Mäusen die NO-Konzentration im peripheren Blut zu vernachlässigen ist, so dass praktisch Blutkreisläufe mit und ohne NO-Einwirkung verglichen wurden. Dabei zeigte sich, dass die Erythrozyten, die keinen Kontakt zu NO hatten, in den KO-Mäusen deutlich schneller aus dem peripheren Blutstrom ausgesondert werden als die in Wildtyp-Mäusen, die NO synthetisieren. In vivo findet diese Ausselektion nicht durch Hämolyse, sondern durch Abbau in der Milz statt, wie unter 1.3.3 erwähnt. Da die Inkubationszeit der Erythrozyten höchstens 48 Stunden betrug, spielte auch die Seneszenz keine nennswerte Rolle, so dass als einziger bekannter Mechanismus für diese Ausselektion die Induktion von Eryptose in Frage kam. Als Bestätigung dieser Aussage kann auch gewertet werden, dass sich in der Milz der KO-Tiere vermehrt ausselektierte Erythrozyten fanden, um dort abgebaut zu werden. Dabei war diese gesteigerte Eryptose sowohl bei Zellen, die mit Ionomycin-Behandlung Calciumstress erfuhren, als auch bei komplett ungestressten Zellen nachweisbar.

Die in vivo-Experimente verdeutlichen folglich, dass Erythrozyten in Abwesenheit von NO anfälliger für zellulären Stress sind. Allerdings ist ihre Lebensdauer selbst im physiologischen Zustand ohne jeglichen externen Stress ohne NO-Kontakt signifikant verkürzt. Deswegen scheint NO ein wichtiger Faktor für das Überleben von Erythrozyten zu sein.

4.6 Relevanz der Ergebnisse

Die PS-Exposition an der Zelloberfläche, die unter Stress ausgelöst wird, begünstigt beziehungsweise induziert die Bindung an PS-Rezeptoren auf Makrophagen [Fadok et al., 2000]. Die PS-exponierenden Zellen werden anschließend von Makrophagen aufgenommen und abgebaut [Boas et al., 1998]. Zumindest theoretisch verringert somit die PS-Exposition die Lebensdauer der Erythrozyten, was sich klinisch in einer hämolytischen Anämie manifestieren kann. Die beobachteten Ergebnisse dieser Studie haben hohe Relevanz auf verschiedenen Gebieten: Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Lebensdauer von Erythrozyten sowohl im physiologischen Zustand als auch unter Stress in Abwesenheit von NO deutlich abnimmt. Mit der Regulation des erythrozytären Überlebens konnte eine wichtige neue physiologische Funktion von NO identifiziert werden, die zum Verständnis dieses Signalmoleküls und seiner regulatorischen Mechanismen und Signalwege beiträgt.

Neben dieser grundlagenorientierten Betrachtungsweise könnten die gefundenen Erkenntnisse aus dieser Studie auch klinische Relevanz haben. Für NO konnte eine protektive Wirkung bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse gezeigt werden; das Molekül hat hierbei, wie unter 1.4.2 aufgeführt, multiple Wirkungen auf Endothel-, Muskel- und Blutzellen, die das Risiko für ischämische Geschehen und Atherosklerose senken [Massoudy et al., 1999]. Neben diesen Effekten könnte auch die antiapoptotische Wirkung auf Erythrozyten und somit die Verbesserung der Sauerstoffversorgung der peripheren Gewebe durch Sicherstellung der O₂-Transportkapazität bei der positiven Beeinflussung kardiovaskulärer Erkrankungen durch NO einen zusätzlichen wichtigen Faktor darstellen.

Neben der verbesserten O₂-Versorgung kommt noch ein weiterer Faktor hinzu, der Ischämien begünstigt und der durch NO verhindert wird. PS-exponierende Zellen können nämlich an Rezeptoren der Gefäßwand binden. Apoptotische Erythrozyten adhärieren dann an der Gefäßwand und können dadurch das Lumen der feinen Kapillaren einengen bzw. verlegen, wodurch die Mikrozirkulation behindert und das Auftreten ischämischer Geschehen begünstigt wird [Andrews and Low 1999; Clossé et al., 1999; Gallagher et al., 2003]. Außerdem wird hierdurch Hämostase ausgelöst [Andrews and Low 1999]. Das geschieht dadurch, dass PS-Exposition die Bindung von Prothrombinase und Tenase begünstigt und so zur Bildung von Thrombin und zur Koagulation beiträgt [Chung et al., 2007; Zwaal et al., 2005]. Eine solche verstärkte Bindung von Erythrozyten konnte schon im Nierenmark von Mäusen nach

Ischämien nachgewiesen werden [Lang et al., 2004b]. NO könnte in dieser Situation Eryptose verhindern und dadurch die Erythrozyten an der Adhärenz an die Gefäßwand hindern, wodurch das Risiko des Gefäßverschlusses, der bei der Atherosklerose die Gefahr für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse darstellt, verringern.

Deswegen könnte die Wirkung von NO auf die Erythrozytenapoptose mit ein Faktor sein, warum die NO-Konzentration des Blutes ein prognostisch wichtiger kardiovaskulärer Risikoindikator ist.

4.7 Ausblick

Mit dem Signalmolekül NO konnte ein potenter Regulator der erythrozytären Apoptose gefunden werden, dessen physiologische Funktion sich unter anderem in einer Inhibition der Eryptose manifestiert. Ferner konnten einige Mechanismen seiner Wirkungsweise und molekularen Schaltstellen der zu Grunde liegenden Signalwege identifiziert bzw. charakterisiert werden.

Dennoch bleiben noch einige Schritte des genauen Signallings zu klären, damit ein lückenloses Bild der Reaktionsfolge entsteht. Außerdem sollte weiterhin daran gearbeitet werden, die weitere Rolle der Nitrosylierung in Erythrozyten aufzuklären. Schließlich ist sehr wenig über dieses Phänomen in roten Blutkörperchen bekannt, obwohl nahe liegt, dass einige weitere Proteine außer Trx durch Nitrosylierung reguliert werden und dadurch bestimmte Signalketten aktiviert bzw. inhibiert werden. Des Weiteren stellen Erythrozyten ein gutes Modell für die caspasenunabhängige Apoptose dar, das sich auf kernhaltige Zellen in vielerlei Hinsicht anwenden lässt. Das Arbeiten mit Erythrozyten vereinfacht die Charakterisierung dieser Form der Apoptose, da die Signalwege, die im Erythrozyten vorkommen, sehr viel weniger komplex sind als in kernhaltigen Zellen. Da die Wirkung von NO auf die caspasenunabhängige Apoptose nun in Erythrozyten gezeigt wurde, ist ferner interessant, ob NO auch in kernhaltigen Zellen einen Einfluss auf die calciuminduzierte Apoptose nimmt und gegebenenfalls wie.

Neben diesen grundlagenorientierten Betrachtungen kann weiterhin der therapeutische Effekt von NO in vivo zusätzlich zu den schon bekannten Indikationen aufgeklärt werden. NO könnte ein geeignetes Medikament sein, um das Auftreten hämolytischer Anämien wirkungsvoll zu unterbinden, die mit vielen Erkrankungen wie

dem Morbus Wilson [Lang et al., 2007] oder dem atypischen hämolytisch-urämischen Syndrom [Lang et al., 2005b] einhergehen.

5 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) kann bekanntermaßen in kernhaltigen Zellen die Induktion von Apoptose durch S-Nitrosylierung von Protein-Thiolgruppen inhibieren. Dieses Signalmolekül kann von Erythrozyten produziert und in ihnen gespeichert werden. Erythrozyten selbst können eine Form des Zelltodes erfahren, die der Apoptose kernhaltiger Zellen ähnlich ist, die Eryptose. Diese Eryptose wird unter anderem durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und/oder durch die Bildung von Ceramid vermittelt und ist durch Phosphatidylserin-(PS)-Exposition auf der Zelloberfläche und durch Zellschrumpfung charakterisiert.

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Frage, ob NO die Mechanismen, die zur Eryptose führen, und so das Apoptoseverhalten der Erythrozyten ebenfalls beeinflussen kann. Hierzu wurden die PS-Exposition durch Annexin-V-Bindung und das Zellvolumen im Forward scatter durchflusszytomerisch bestimmt. Der Calcium-Ionophor Ionomycin erhöhte in einer Konzentration von 0,1 μM die zytosolische Calcium-Konzentration und löste dadurch Annexin-V-Bindung und Zellschrumpfung aus. Diese Annexin-V-Bindung und die Abnahme des forward scatter, nicht hingegen die Erhöhung der Calciumkonzentration, konnten durch die Zugabe von NO-Donatoren wie z. B. Nitroprussid in Konzentrationen von 1 nM bis 1 μM und NOC-15 (100 μM) inhibiert werden. Höhere Konzentrationen von Nitroprussid (0,1 und 1 mM) lösten allerdings selbst Eryptose aus. Glucosedepletion, C₆-Ceramid (3 μM), hypertone (850 mOsm) und chloridfreie Lösung verursachten ebenfalls Annexin-V-Bindung, wobei NO alle diese Effekte signifikant hemmen konnte. Dibutyryl-cGMP (1 mM) schwächte die calcium-, aber nicht die ceramidvermittelte Annexin-V-Bindung ab. Ionomycin-Behandlung der Zellen verringerte den Grad an S-nitrosylierten Protein-Thiolgruppen und die Thioredoxin-Aktivität. Auch diese Effekte waren durch Zugabe von NO-Donatoren reversibel.

Die Aussonderung von Erythrozyten in der Milz und aus dem zirkulierenden Blutstrom und somit die Lebensdauer der Zellen waren in eNOS-Knockout-Mäusen gegenüber Wildtyp-Kontrollmäusen signifikant erhöht.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass NO an der Regulation von erythrozytärem Überleben und Zelltod beteiligt ist. Diese Effekte vermittelt es teilweise über einen cGMP-abhängigen Signalweg, durch eine Erhöhung der Protein-S-Nitrosylierung und durch eine Thioredoxin-Aktivierung nach ionomycinvermitteltem Stress.

6 Literatur

Akel A, Hermle T, Niemoeller OM, Kempe DS, Lang PA, Attanasio P, Podolski M, Wieder T, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol* 2006;532:11-17.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.

Ameisen JC: Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. *AIDS* 1994;8:1197-1213.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923-4928.

Andrews DA, Low PS: Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol* 1999;6:76-82.

Andrews DA, Yang L, Low PS: Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood* 2002;100:3392-3399.

Angus JA, Cocks TM: The half-life of endothelium-derived relaxing factor released from bovine aortic endothelial cells in culture. *J Physiol* 1987;388:71-81.

Antonini E, Ioppolo C, Giardina B, Brunori M: Chemical modifications of SH groups intraerythrocytic hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;74:1647-1655.

Arese P, Turrini F, Schwarzer E: Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133-146.

Armato U, Romano F, Andreis PG, Paccagnella L, Marchesini C: Growth stimulation and apoptosis induced in cultures of neonatal rat liver cells by repeated exposures to epidermal growth factor/urogastrone with or without associated pancreatic hormones. *Cell Tissue Res* 1986;245:471-480.

Bao X, Cui J, Wu Y, Han X, Gao C, Hua Z, Shen P: The roles of endogenous reactive oxygen species and nitric oxide in triptolide-induced apoptotic cell death in macrophages. *J Mol Med* 2007;85:85-98.

Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE: Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:1-18.

Benhar M, Stamler JS: A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nat Cell Biol* 2005;7:645-646.

Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S: Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:1197-1206.

Berlin NI: Determination of red blood cell life span. *JAMA* 1964;188:375-378.

Bilmen S, Aksu TA, Gumuslu S, Korgun DK, Canatan D: Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2001;303:83-86.

Birka C, Lang PA, Kempe DS, Hoefling L, Tanneur V, Duranton C, Nammi S, Henke G, Myssina S, Krikov M, Huber SM, Wieder T, Lang F: Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch* 2004;448:471-477.

Black RA, Kronheim SR, Merriam JE, March CJ, Hopp TP: A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J Biol Chem* 1989;264:5323-5326.

Boas FE, Forman L, Beutler E: Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3077-3081.

Bosman GJ, Willekens FL, Werre JM: Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005a;16:1-8.

Bosman GJ, Willekens FL, Werre JM: Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005b;16:1-8.

Bossi D, Giardina B: Red cell physiology. *Mol Aspects Med* 1996;17:117-128.

Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Godecke A, Mulsch A, Busse R: Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 2000;35:231-236.

Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC: Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001;8:1143-1156.

Brenner S: The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974;77:71-94.

Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL: Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993;92:520-526.

Carter MJ: Carbonic anhydrase: isoenzymes, properties, distribution, and functional significance. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972;47:465-513.

Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, .: Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992;256:97-100.

Chen LY, Mehta JL: Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:57-61.

Chung SM, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Lee MY, Jung YS, Chung JH: Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:414-421.

Clarke PG, Clarke S: Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 1996;193:81-99.

Clementi E, Sciorati C, Nistico G: Growth factor-induced Ca²⁺ responses are differentially modulated by nitric oxide via activation of a cyclic GMP-dependent pathway. *Mol Pharmacol* 1995;48:1068-1077.

Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR: Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br J Haematol* 1999;107:300-302.

Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16.

Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, Darley-Usmar VM, Kerby JD, Lang JD, Jr., Kraus D, Ho C, Gladwin MT, Patel RP: Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood* 2006;107:566-574.

Curtin JF, Cotter TG: Apoptosis: Historical perspectives. *Essays Biochem* 2003;39:1-10.

Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219.

Darzynkiewicz Z, Li X, Bedner E: Use of flow and laser-scanning cytometry in analysis of cell death. *Methods Cell Biol* 2001a;66:69-109.

Darzynkiewicz Z, Smolewski P, Bedner E: Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Clin Lab Med* 2001b;21:857-873.

Das A, Smolenski A, Lohmann SM, Kukreja RC: Cyclic GMP-dependent protein kinase alpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte. *J Biol Chem* 2006;281:38644-38652.

Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN: Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 2005;106:734-739.

Dekkers DW, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RF: Comparison between Ca²⁺-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem J* 2002;362:741-747.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM: Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997a;185:601-607.

Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM: Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997b;81:970-976.

Dimmeler S, Zeiher AM: Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997;1:275-281.

Dimmeler S, Zeiher AM: Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 1999;6:964-968.

Duan S, Chen C: S-nitrosylation/denitrosylation and apoptosis of immune cells. *Cell Mol Immunol* 2007;4:353-358.

Duranton C, Huber SM, Lang F: Oxidation induces a Cl⁻-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 2002;539:847-855.

Eisele K, Lang PA, Kempe DS, Klarl BA, Niemoller O, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;210:116-122.

Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817-829.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR: Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-698.

Fadeel B: Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:269-275.

Fadeel B, Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005;258:479-517.

Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM: The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998;5:551-562.

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM: A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405:85-90.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992a;148:2207-2216.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992b;148:2207-2216.

Forstermann U, Trogisch G, Busse R: Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Eur J Pharmacol* 1984;106:639-643.

Frago LM, Leon Y, de la Rosa EJ, Gomez-Munoz A, Varela-Nieto I: Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 5):549-556.

Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL: Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000;275:23065-23073.

Gallagher PG, Chang SH, Rettig MP, Neely JE, Hillery CA, Smith BD, Low PS: Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis. *Blood* 2003;101:4625-4627.

Giraldez RR, Panda A, Xia Y, Sanders SP, Zweier JL: Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1997;272:21420-21426.

Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchrist D, Wang H, Chan C: H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 21):3209-3220.

Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.

Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH: The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984;308:645-647.

Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S: A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing* 2006;3:5.

Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S: Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol* 2002;4:743-749.

Head DJ, Lee ZE, Poole J, Avent ND: Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *Br J Haematol* 2005a;129:130-137.

Head DJ, Lee ZE, Swallah MM, Avent ND: Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability in vitro. *Br J Haematol* 2005b;130:788-790.

Hoffmann J, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S: TNFalpha and oxLDL reduce protein S-nitrosylation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:41383-41387.

Huber SM, Gamper N, Lang F: Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 2001;441:551-558.

Hutchinson PJ, Palmer RM, Moncada S: Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur J Pharmacol* 1987;141:445-451.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G: Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:181-189.

Ignarro LJ, Napoli C: Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6:281-287.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC: Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;88:347-354.

Kabelitz D, Pechhold K, Bender A, Wesselborg S, Wesch D, Friese K, Janssen O: Activation and activation-driven death of human gamma/delta T cells. *Immunol Rev* 1991;120:71-88.

Kaestner L, Bernhardt I: Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry* 2002;55:71-74.

Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR: Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med* 2000;135:444-451.

Katsumi H, Nishikawa M, Hashida M: Development of nitric oxide donors for the treatment of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007;5:204-208.

Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA: "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* 1996;268:281-293.

Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, Friedrich B, Dreischer P, Wolz C, Schumacher U, Peschel A, Gotz F, Doring G, Wieder T, Gulbins E, Lang F: Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med* 2006a;

Kempe DS, Lang PA, Duranton C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T, Lang F: Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J* 2006b;20:368-370.

Kempe DS, Lang PA, Eisele K, Klarl BA, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C396-C402.

Kerr JF: A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965;90:419-435.

Kerr JF: History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182:471-474.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

Kiefer CR, Snyder LM: Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000;7:113-116.

Kilbourn RG, Griffith OW: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:827-831.

Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F: Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C244-C253.

Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, Kelm M: Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006;107:2943-2951.

Krammer PH: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-795.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409:198-201.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619-642.

Kuypers FA, de JK: The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2004;50:147-158.

Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T: Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 2006a;8:1183-1192.

Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T: Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 2006b;187:191-198.

Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F: Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem* 2005a;15:195-202.

Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM: Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2003a;10:249-256.

Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F, Wieder T: Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2004a;11:231-243.

Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F, Durantou C: Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004b;286:F1046-F1053.

Lang KS, Myssina S, Tanneur V, Wieder T, Huber SM, Lang F, Durantou C: Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003b;367:391-396.

Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Wieder T: Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:365-372.

Lang PA, Beringer O, Nicolay JP, Amon O, Kempe DS, Hermle T, Attanasio P, Akel A, Schafer R, Friedrich B, Risler T, Baur M, Olbricht CJ, Zimmerhackl LB, Zipfel PF, Wieder T, Lang F: Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med* 2006c;84:378-388.

Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, Niemoeller OM, Dreischer P, Eisele K, Klarl BA, Gulbins E, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem* 2006d;18:151-164.

Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM: Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003c;285:C1553-C1560.

Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, Niemoeller OM, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F, Durantou C: Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005c;372:228-235.

Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klarl BA, Myssina S, Jendrossek V, Ishii S, Shimizu T, Waidmann M, Hessler G, Huber SM, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 2005d;118:1233-1243.

Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rubben H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Haussinger D, Gulbins E, Lang F: Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2007;13:164-170.

Lee JM, Bernstein A: Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:149-161.

Li J, Billiar TR: The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes. *Cell Death Differ* 1999;6:952-955.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.

Liew FY: Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp* 1995a;195:234-239.

Liew FY: Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr Opin Immunol* 1995b;7:396-399.

Lipton SA, Singel DJ, Stamler JS: Nitric oxide in the central nervous system. *Prog Brain Res* 1994;103:359-364.

Loo DT, Rillema JR: Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 1998;57:251-264.

Lutz HU: Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2004;50:107-116.

Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J: Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005;280:39460-39467.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS: Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999;284:651-654.

Massoudy P, Zahler S, Barankay A, Becker BF, Richter JA, Meisner H: Sodium nitroprusside during coronary artery bypass grafting: evidence for an antiinflammatory action. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1059-1064.

Matarrese P, Straface E, Pietraforte D, Gambardella L, Vona R, Maccaglia A, Minetti M, Malorni W: Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J* 2005;19:416-418.

Mavelli I, Ciriolo MR, Rossi L, Meloni T, Forteleoni G, De Flora A, Benatti U, Morelli A, Rotilio G: Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur J Biochem* 1984;139:13-18.

May JM, Qu ZC, Nelson DJ: Uptake and reduction of alpha-lipoic acid by human erythrocytes. *Clin Biochem* 2007;40:1135-1142.

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A: S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 1997;388:432-433.

Melino G, Knight RA, Green DR: Publications in cell death: the golden age. *Cell Death Differ* 2001;8:1-3.

Messmer UK, Pfeilschifter J: New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 2000;22:878-881.

- Minta A, Kao JP, Tsien RY: Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 1989;264:8171-8178.
- Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T, Lang F: Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2750-2757.
- Myssina S, Lang PA, Kempe DS, Kaiser S, Huber SM, Wieder T, Lang F: Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca²⁺-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:241-248.
- Nagai-Kusuhara A, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Negi A, Seigel GM: cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells. *Exp Eye Res* 2007;84:152-162.
- Nakamura T, Staub NC: Synergism in the kinetic reactions of O₂ and CO₂ with human red blood cells. *J Physiol* 1964;173:161-177.
- Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ: Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15:265-279.
- Nicolay JP, Gatz S, Liebig G, Gulbins E, Lang F: Amyloid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 2007;19:175-184.
- Nicolay JP, Schneider J, Niemoeller OM, Artunc F, Portero-Otin M, Haik G, Jr., Thornalley PJ, Schleicher E, Wieder T, Lang F: Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem* 2006;18:223-232.
- Niemoeller OM, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T, Sobiesiak M, Wieder T, Lang F: Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2006;374:41-49.
- Orrenius S: Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 2004;149:19-23.
- Paakkari I, Lindsberg P: Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 1995;27:369-377.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
- Pant HC, Virmani M, Gallant PE: Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:372-377.
- Pauling L, Coryell CD: The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1936;22:210-216.
- Perutz MF: Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect* 1969;63:213-261.

Polenakovic M, Sikole A: Is erythropoietin a survival factor for red blood cells?. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1178-1182.

Reed JC: Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:111-121.

Rice L, Alfrey CP: The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:245-250.

Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S: Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:6823-6826.

Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S: Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 1999;6:495-496.

Saraste A, Pulkki K: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:528-537.

Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y: In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* 1985;260:5131-5138.

Seigneuret M, Devaux PF: ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3751-3755.

Shi YF, Szalay MG, Paskar L, Sahai BM, Boyer M, Singh B, Green DR: Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 1990;144:3326-3333.

Sulston JE: Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1976;275:287-297.

Sulston JE, Brenner S: The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974;77:95-104.

Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG: Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:418-430.

Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.

Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.

Vaandrager AB, de Jonge HR: Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* 1996;157:23-30.

Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P: Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:487-497.

Vaux DL, Weissman IL, Kim SK: Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992;258:1955-1957.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.

C. Vogt, Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*), Jens und Gasmann, Solothurn 1842.

von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Starck L, Graupner V, Dorken B, Daniel PT: Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:4009-4019.

Wassell J: Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab* 2000;46:547-552.

Willekens FL, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, Bos HJ, Bosman GJ, van den Bos AG, Verkleij AJ, Werre JM: Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* 2003;101:747-751.

Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, van den Bos AG, Bosman GJ, van Berkel TJ: Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 2005;105:2141-2145.

William M, Vien J, Hamilton E, Garcia A, Bundgaard H, Clarke RJ, Rasmussen HH: The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na⁺-K⁺ pump in isolated rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* 2005;565:815-825.

Woodcock J: Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life* 2006;58:462-466.

Woon LA, Holland JW, Kable EP, Roufogalis BD: Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 1999;25:313-320.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.

Zeigler MM, Doseff AI, Galloway MF, Opalek JM, Nowicki PT, Zweier JL, Sen CK, Marsh CB: Presentation of nitric oxide regulates monocyte survival through effects on caspase-9 and caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2003;278:12894-12902.

Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S: Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:644-651.

Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ: Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase. *Blood* 2002;99:4030-4038.

Zhuravliova E, Barbakadze T, Narmania N, Ramsden J, Mikeladze D: Inhibition of nitric oxide synthase and farnesyltransferase change the activities of several transcription factors. *J Mol Neurosci* 2007;31:281-287.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:971-988.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Florian Lang für die Vergabe des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die immerzu engagierte und freundliche Betreuung und das immer offene Ohr
- PD Dr. Thomas Wieder für die ebenso engagierte und freundliche Mitbetreuung dieser Arbeit, für zahlreiche Ratschläge, Hilfestellungen und Anregungen
- Meinen Laborkollegen Gerd Liebig, Olivier Niemoeller, Saisudha Koka und Mehrdad Ghashghaeinia für die hervorragende Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die harmonische Atmosphäre im Labor
- Frau PD Dr. Judith Haendeler für die freundliche und angenehme Kooperation
- Lejla Subasic für die Hilfe bei allen Fragen rund ums Schreiben
- Allen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes, die zum Gelingen und der guten Arbeitsatmosphäre dieser Arbeit beigetragen haben
- meinen Eltern, die mich immer unterstützten und mir das Studium der Biochemie und der Humanmedizin ermöglichten
- meinem Bruder Nils für die immer enge Rückkopplung, die vielen Hilfestellungen und das immer offene Ohr
- Katharina Finke und allen meinen Freunden für Rückhalt und Unterstützung während meines Studiums und speziell dieser Doktorarbeit

7.2 Lebenslauf

Jan P. Nicolay

Persönliche Daten

Geburtsdatum 24. April 1981

Geburtsort Lahr/Schwarzwald

Nationalität deutsch

Ausbildung

1987 bis 1991	Besuch der Grundschule in Lahr/Schwarzwald
1991 bis 2000	Besuch des Scheffel-Gymnasiums in Lahr/Schwarzwald
Juni 2000	Abitur (Endnote 1,0)
Sept. 2000 bis Mai. 2001	Zivildienst, Klinikum Lahr
Okt. 2001 bis Februar 2004	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
Februar 2004	Vordiplom in Biochemie (Endnote sehr gut)
April 2004 bis Okt. 2007	Biochemiestudium an der Universität Tübingen
April 2004 bis März 2005	Studium der Medizin an der Universität Tübingen
März 2005	Physikum im Fach Medizin (Endnote gut)
März 2005 bis heute	Medizinstudium an der Universität Tübingen
Okt. 2007	Diplom in Biochemie (Endnote sehr gut)
Feb 2008 bis Jan 2009	Praktisches Jahr im Fach Medizin
Juni 2009	Ärztliche Prüfung (Endnote gut)

Doktorarbeit

2006-2008 Physiologisches Institut der Universität Tübingen bei Prof. Lang

Praktische Erfahrungen

Juli 2000	Praktikum am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm/Potsdam
Okt. 2003 bis Juli 2005	Wissenschaftliche Hilfskraft am Interfakultären Institut für Biochemie in Tübingen
Februar 2004 bis März 2004	Molekularbiologisches Praktikum am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen
März 2006	Einmonatige Famulatur an der Pitié-Salpêtrière in Paris im Bereich Kardiologie
August 2006	Famulatur am Universitätsklinikum Tübingen im Bereich Anästhesie

Feb 2008 – Jun 2008	Erstes Tertial des Praktischen Jahres, Universitätsklinikum Tübingen (Chirurgie)
Jun 2008 – Okt 2008	Zweites Tertial des Praktischen Jahres, Universitätsspital Zürich / Schweiz (Innere Medizin)
Okt 2008 – Jan 2009	Drittes Tertial des Praktischen Jahres, Mount Sinai Medical Center, New York City / USA (Neurologie)

Stipendien

Förderstipendium des Fonds der Chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie e.V. (2001-2003)

Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes (seit 2002)

Stipendium der E-Fellows.net Stiftung der Wirtschaft (seit 2001)

Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (ab 2006)

Aktivitäten

Mitglied des Akademischen Chors „Camerata Vocalis“ (seit 2006)

Mitglied des Wettkampfteams der Universität Tübingen im Schwimmen (seit 2001)

Engagement als stv. Vorsitzender des Förderverein Chemie-Olympiade e.V. (2003-2005)

Sprachen

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (fließend)

Französisch

Latein

7.3 Publikationen

Nicolay JP, Gatz S, Lang F, Lang UE.

Lithium-induced suicidal erythrocyte death.

Journal of Psychopharmacology. 2009; 0:0269881109102631v1

Koka S, Lang C, Niemoeller OM, Boini KM, Nicolay JP, Huber SM, Lang F.

Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice.

Cell Physiol Biochem. 2008;21(5-6):481-8.

Föllner M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F, Feil R.

Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 6;105(18):6771-6.

Nicolay JP, Liebig G, Niemoeller OM, Koka S, Ghashghaeinia M, Wieder T, Haendeler J, Busse R, Lang F.

Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide.

Pflugers Arch. 2008 May;456(2):293-305.

Nicolay JP, Bentzen PJ, Ghashghaeinia M, Wieder T, Lang F.

Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by amiodarone.

Cell Physiol Biochem. 2007;20(6):1043-50.

Schneider J, Nicolay JP, Föllner M, Wieder T, Lang F.

Suicidal erythrocyte death following cellular K⁺ loss.

Cell Physiol Biochem. 2007;20(1-4):35-44.

Nicolay JP, Gatz S, Liebig G, Gulbins E, Lang F.

Amyloid induced suicidal erythrocyte death.

Cell Physiol Biochem. 2007;19(1-4):175-84.

Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rübber H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Häussinger D, Gulbins E, Lang F.

Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide.

Nat Med. 2007 Feb;13(2):164-70.

Nicolay JP, Schneider J, Niemoeller OM, Artunc F, Portero-Otin M, Haik G Jr, Thornalley PJ, Schleicher E, Wieder T, Lang F.

Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal.

Cell Physiol Biochem. 2006;18(4-5):223-32.

Lang PA, Beringer O, Nicolay JP, Amon O, Kempe DS, Hermle T, Attanasio P, Akel A, Schäfer R, Friedrich B, Risler T, Baur M, Olbricht CJ, Zimmerhackl LB, Zipfel PF, Wieder T, Lang F.

Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome.

J Mol Med. 2006 May;84(5):378-88.