

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Programmierter Erythrozyten-Zelltod bei  
Bleivergiftungen und Eisenmangelanämie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Daniela Stefanie Kempe

Tübingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Wesselborg

Meinen Eltern

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin, (bovines Serum-Albumin)
CFSE	5-Carboxy-Fluorescein-Diacetate-Succinyl-Ester
CSF	Kolonie-stimulierender-Faktor
DD	Todeseffektordomäne (death domain)
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	Zelltodrezeptor (death receptor)
EDAR	Ektodermaler Dysplasinezeptor (ectodermal dysplasin receptor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
EZ	Erythrozytenzahl
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated via death domain
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FS	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
GSH	Glutathion
Hb	Hämoglobinwert
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2-ethan-sulfonsäure
Hkt	Hämatokrit
IAP	inhibitorisches Apoptose-Protein
MAK	maximal zulässige Arbeitsplatzkonzentration
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NGF	nervaler Wachstums-Faktor (nerval growth factor)

NGFR	nervaler Wachstums-Faktor-Rezeptor (nerval growth factor receptor)
NPPB	5-Nitro-2-(phenylpropylamino)benzoic acid
PAF	Plättchen-aktivierender-Faktor
PBS	gepuffertes Phosphat-Salz (phosphate buffered saline)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
RNS	Ribonukleinsäure
SA	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRADD	TNF-Rezeptor-1-assoziierte Todesdomäne (TNF-receptor-1-associated death domain)
UV	ultra violett
δ-ALA	δ-Aminolaevulinsäure

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG .....	1
1.1. Apoptose .....	1
1.1.1. Bedeutung des programmierten Zelltodes .....	1
1.1.2. Apoptose im Vergleich mit Nekrose.....	3
1.1.3. Apoptose bei kernhaltigen Zellen - Zusammenhänge und Mechanismen .....	5
1.1.4. Rolle der Caspasen .....	6
1.2. Apoptosesignalwege .....	7
1.2.1. Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion .....	8
1.2.2. Mitochondrialer Apoptoseweg .....	8
1.2.3. Apoptose durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) .....	10
1.2.4. Die Bcl-2-Proteinfamilie .....	11
1.3. Erythrozyten .....	11
1.3.1. Ausstattung und Aufgaben der roten Blutkörperchen.....	11
1.3.2. Bildung und Abbau .....	12
1.3.3. Stoffwechsel der Erythrozyten.....	14
1.3.4. Spezifische Membrantransporte.....	14
1.4. Programmierter Zelltod der Erythrozyten .....	15
1.4.1. Ca <sup>2+</sup> -abhängiger Signalweg .....	16
1.4.1.1. Aktivierung des Gardos Kanals.....	16
1.4.1.2. Aktivierung der erythrozytären Scramblase .....	17
1.4.1.3. Aktivierung von Calpain.....	17
1.4.1.4. Auswirkungen auf die Formation des Zytoskelettes .....	18
1.4.1.5. Stimulation von Phospholipasen, Proteinkinasen und Phosphatasen.....	19
1.4.2. Ca <sup>2+</sup> -unabhängiger Signalweg.....	19
1.4.3. Caspasen und andere Apoptosestimuli .....	20
1.5. Anämien.....	20
1.5.1. Klassifikation der Anämien.....	22
1.5.2. Eisenstoffwechsel im menschlichen Organismus .....	24

1.5.3. Eisenmangel - eine Volkskrankheit.....	25
1.5.4. Behandlung des Eisenmangels.....	28
1.6. Blei.....	29
1.6.1. Historie .....	29
1.6.2. Blei heute .....	30
1.6.3. Toxikokinetik.....	31
1.6.4. Chemische und physikalische Eigenschaften.....	31
1.6.5. Toxizität .....	32
1.6.5.1. Akute Vergiftung - Bleikrise .....	32
1.6.5.2. Chronische Bleivergiftungen.....	33
1.6.6. Therapie .....	34
1.7. Fragestellung der Arbeit.....	34
2. MATERIAL UND METHODEN .....	36
2.1. Erythrozyten.....	36
2.1.1. Aufbereitung von Erythrozyten .....	36
2.1.2. Analyse der Reinheit der Erythrozytenkonzentrate.....	37
2.2. Verwendete Substanzen.....	38
2.2.1. Ionomycin.....	38
2.2.2. Annexin-V-Fluos .....	38
2.2.3. Fluo 3/AM.....	39
2.2.4. Blei .....	39
2.2.5. Clotrimazol .....	39
2.2.6. CFSE .....	39
2.3. Verwendete Lösungen .....	40
2.3.1. Ringerlösung .....	40
2.3.2. Annexin-Waschpuffer.....	41
2.4. FACS-Analyse .....	41
2.4.1. Durchführung einer FACS-Analyse .....	44
2.5. Ca <sup>2+</sup> -Messungen .....	44
2.5.1. Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Messungen mit Fluo 3/AM.....	44
2.5.2. Radioaktive <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> -Messungen.....	45
2.6. Lichtmikroskopie.....	47

2.7. Patch-clamp Experimente.....	48
2.8. Tierexperimente .....	52
2.8.1. Bestimmung der Halbwertszeit von Mäuse-Erythrozyten .....	53
2.8.2. Analyse der Blutbildparameter .....	54
2.8.3. Bestimmung der Retikulozytenzahlen .....	54
2.8.4. Annexinbindung nach Inkubation in Cl <sup>-</sup> - und Glukose-freier.....	55
Lösung .....	55
2.9. Statistik .....	55
3. ERGEBNISSE .....	56
3.1. Analyse der Blutbildparameter im Tierexperiment.....	56
3.2. Forward Scatter Ergebnisse .....	59
3.3. Ca <sup>2+</sup> -Messungen .....	63
3.3.1. Fluo 3/AM.....	63
3.3.2. Radioaktive Ca <sup>2+</sup> -Messungen.....	64
3.4. Patch-Clamp-Messungen .....	65
3.5. Annexinbindung in der Durchflußzytometrie.....	72
3.6. CFSE-Essay .....	80
3.7. Lichtmikroskopie.....	82
4. DISKUSSION .....	83
4.1. Legitimation der Versuche - Überlegungen zur klinischen Relevanz .....	85
4.4.1. Veränderung des Blutbildes.....	85
4.4.2. Bleispiegel im Blut bei Intoxikation.....	85
4.2. Bedeutung von Phosphatidylserin und intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Erhöhung....	86
4.3. Annexinbindung.....	86
4.4. Bestimmung der Überlebenszeit .....	88
4.5. Ionenkanäle und Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationsänderung.....	88
4.6. Zellvolumen und Forward Scatter .....	90
4.7. Fehlerdiskussion .....	92
4.7.1. Detektion der Apoptose durch Annexinbindung .....	92
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	93
6. LITERATUR .....	95
6.1. Publikationsverzeichnis.....	95



6.2. Literaturverzeichnis .....	97
7. DANKSAGUNG .....	114
8. LEBENSLAUF .....	115



# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Apoptose

### 1.1.1. Bedeutung des programmierten Zelltodes

Täglich gehen mehrere Millionen Zellen in unserem Körper gewollt zu Grunde - das hört sich paradox an, dient aber einem überlebenswichtigen Zweck. Es gibt für diese Art Zelltod, die so genannte Apoptose, verschiedenste Gründe bzw. Ursachen. Erste experimentelle Untersuchungen zum Zelltod allgemein wurden ungefähr um 1960 begonnen. In verschiedenen Laboren konnte demonstriert werden, dass dabei biologisch kontrollierte Stoffwechselwege eine Rolle spielen. Um 1990 konnten die ersten wichtigen Komponenten des Zelltodstoffwechselweges identifiziert werden (Caspase 3, Bcl-2, und Fas) (126).

Aufgrund ihrer Wichtigkeit befindet sich die Apoptose in vielen Bereichen der Forschung schon längere Zeit im Focus des Interesses. So wurde im Jahre 2002 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin zwischen den Briten Sydney Brenner, John Sulston und dem US-Amerikaner Robert Horvitz aufgeteilt. Belohnt wurden 40 Jahre intensive Forschung am Zelltod und der Vielfalt seiner Mechanismen.

Der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) avancierten als geeignete Tiermodelle in der Apoptoseforschung. Die Untersuchungen der zugrunde liegenden Stoffwechselwege dieser Tiere erbrachte bedeutende Erkenntnisse und waren hilfreich bei der Identifikation verschiedener Apoptosemechanismen (185). Der Körper besteht aus multiplen Zellspezies, die jeweils unterschiedliche Fähigkeiten und Aufgaben haben, und in ihrer Gesamtheit den Organismus lebensfähig machen. Reparatursysteme sind rund um die Uhr aktiv, um Funktionsverluste und schnelles Altern zu vermeiden. Es existieren diverse

Sicherheitsvorkehrungen, die dann eingreifen, wenn bestimmte Prozesse aus dem Ruder zu laufen drohen, und dabei vor der Entstehung von Krankheiten schützen. Setzen diese Reparaturmechanismen aus, folgen pathologische Kaskaden.

Ein wesentlicher Baustein dieser Sicherungsmaschinerie ist der programmierte Zelltod. Apoptose ist ein hoch regulierter Prozess, der bei der Gewebhomeostase eine fundamentale Rolle spielt (64). Fast alle Zellen sind in der Lage ein Selbstmordprogramm durchzuführen und sich selbst zu zerlegen. Im ersten Moment mag sich das seltsam anhören. Die suizidale Zelle jedoch verfolgt selbst auf ihrem letzten Weg soziale Absichten. Sie verschwindet sehr koordiniert. Dadurch wird Raum für neue Zellen geschaffen und ein mögliches Gefährdungspotential, welches von alten Zellen ausgeht, wird auf subtile Weise entschärft. Zellmaterial ist wertvoll. Ressourcen werden daher nicht verschwendet, sondern dem restlichen Körper nach dem Tod zur Wiederaufbereitung zur Verfügung gestellt (10).

Durch fehlregulierte Apoptose können vielerlei Krankheiten entstehen (5). Die Erforschung und detailliertes Verständnis der verschiedenen Apoptosemechanismen wiederum bietet möglicherweise die Chance neue Medikamente entwickeln zu können. Der reibungslose Ablauf des Selbstmordprogramms ist also von eminenter physiologischer Bedeutung für die Vitalität des gesamten Organismus. Deshalb wird dem exakten Verständnis der Physiologie, genauso wie dem Wissen um potentielle Störfaktoren enorm wichtige Bedeutung zugeschrieben.

Bis vor kurzem hat sich die Apoptoseforschung hauptsächlich intensiv mit kernhaltigen Zelltypen befasst. Doch inzwischen weiß man ob der Fähigkeit anderer Zellen, Selbstmord zu begehen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen des erythrozytären Selbstmordprogramms und dessen Auswirkung auf die pathophysiologische Entstehung verschiedener Anämiekonstellationen.

### 1.1.2. Apoptose im Vergleich mit Nekrose

Es existieren im Organismus zwei verschiedene Formen des Zelltodes. Man unterscheidet die Apoptose von der Nekrose (siehe dazu Tab. 1).

Nekrose kann durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden. Meistens handelt es sich dabei um ein pathologisches Konzept, das durch extreme Änderungen der gewohnten physiologischen Bedingungen ins Rollen gebracht wird. Dazu zählen Sauerstoffmangel, Strahlung, extreme Temperaturschwankungen und verschiedene Chemikalien.

Ein ganz wesentliches Merkmal der Nekrose ist die Zellschwellung, die nach Kontakt zur Noxe initial auftritt. Daraufhin kommt es zur Destruktion der Membran, was intrazellulär gelegenen Molekülen den normalerweise unpassierbaren Weg aus der Zelle ermöglicht. Diese Mediatoren lösen Entzündungsreaktionen im benachbarten Gewebe aus und locken dabei Fresszellen (Makrophagen), die dann die verstorbenen Zellen entsorgen können, an (76; 110). Die Nekrose ist also ein passiver Mechanismus.

Im Gegensatz dazu ist der Mechanismus der Apoptose ein aktiver und komplexer Vorgang, der kontrollierbarer als die Nekrose abläuft. Auch besteht die Möglichkeit, dass nur einzelne Zellen betroffen sein können. Die Zelle reagiert mit definierten Kaskaden auf verschiedene Signale. Solche Signale sind zum Beispiel Gamma- oder UV-Strahlen (158), Chemotherapeutika (34; 193), freie Radikale und Wasserstoffperoxid, oxidativer Stress (158), Energiemangel (151), und osmotischer Schock (26; 27; 113; 114; 129; 135).

Man kann die Apoptose in drei Phasen, die nacheinander ablaufen, untergliedern: Initiation, Exekution und Termination. Zu Beginn, in der Initiationsphase, kommt es zur Zellschrumpfung, jedoch bleibt die Zelle als solche intakt. Es kommt vorerst zu keinem Defekt der Zellmembran, so kann der Stoffwechsel noch über einen langen Zeitraum aufrechterhalten werden.

In der Exekutionsphase kommt es zur Schrumpfung des Zellkerns mit Verdichtung des Chromatins. Darauf folgt die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die äußere. An der Innenseite stülpen sich Membranteile als Bläschen ab (Zeiosis), und es folgt die Kernfragmentierung mit anschließendem Abbau der DNS. Zuletzt schnüren sich „apoptotic bodies“ (Membranvesikel) ab (80).

Die Terminationsphase kommt quasi einem Recycling-Prozess gleich. Die „apoptotic bodies“ der verstorbenen Zelle werden von benachbarten Zellen oder von Makrophagen aufgrund des exponierten Phosphatidylserins erkannt. Die entsorgende Zelle besitzt Phosphatidylserinrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Auf diese Weise können die apoptotischen Zellen durch Phagozytose und lysosomalen Abbau eliminiert werden (66; 109; 162). Da keine Mediatoren vor der Phagozytose aus der sterbenden Zelle austreten können, wird die Triggerung entzündlicher Prozesse vermieden. Die Apoptose kann als physiologisch regulierter Zelltodmechanismus verstanden werden.

**Tabelle 1:** Morphologische und biochemische Kriterien der Nekrose und der Apoptose

Nekrose	Apoptose
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untergang ganzer Zellgruppen</li> <li>• Heftige inflammatorische Reaktion</li> <li>• Zellschwellung</li> <li>• Verteilung des Chromatins und Zelllyse</li> <li>• Phagozytose durch Makrophagen</li> <li>• Freisetzung lysosomaler Enzyme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untergang einzelner Zellen</li> <li>• Zellschrumpfung mit Vesikelbildung</li> <li>• Keine Inflammation</li> <li>• Phagozytose durch Makrophagen und Nachbarzellen</li> <li>• Intakte Lysosomen</li> <li>• Erhalt der zellulären Integrität</li> <li>• DNS-Fragmentierung</li> <li>• Caspasenaktivierung</li> </ul>

### 1.1.3. Apoptose bei kernhaltigen Zellen - Zusammenhänge und Mechanismen

Die Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellvermehrung und Zelluntergang ist also von größter Bedeutung für das Funktionieren unseres Organismus. Bei gesteigerter Apoptoserate können beispielsweise neurologische Krankheiten wie Morbus Alzheimer (45) oder Morbus Parkinson (181) auftreten. Ist sie vermindert, ist die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigt (161). Mehr Information beinhaltet Abbildung 1.

Die Zellen werden von verschiedenen Triggerfaktoren und Mediatoren stimuliert und unterschiedliche Signalkaskaden, bei denen am Ende der Zelltod steht, können dadurch ausgelöst werden.

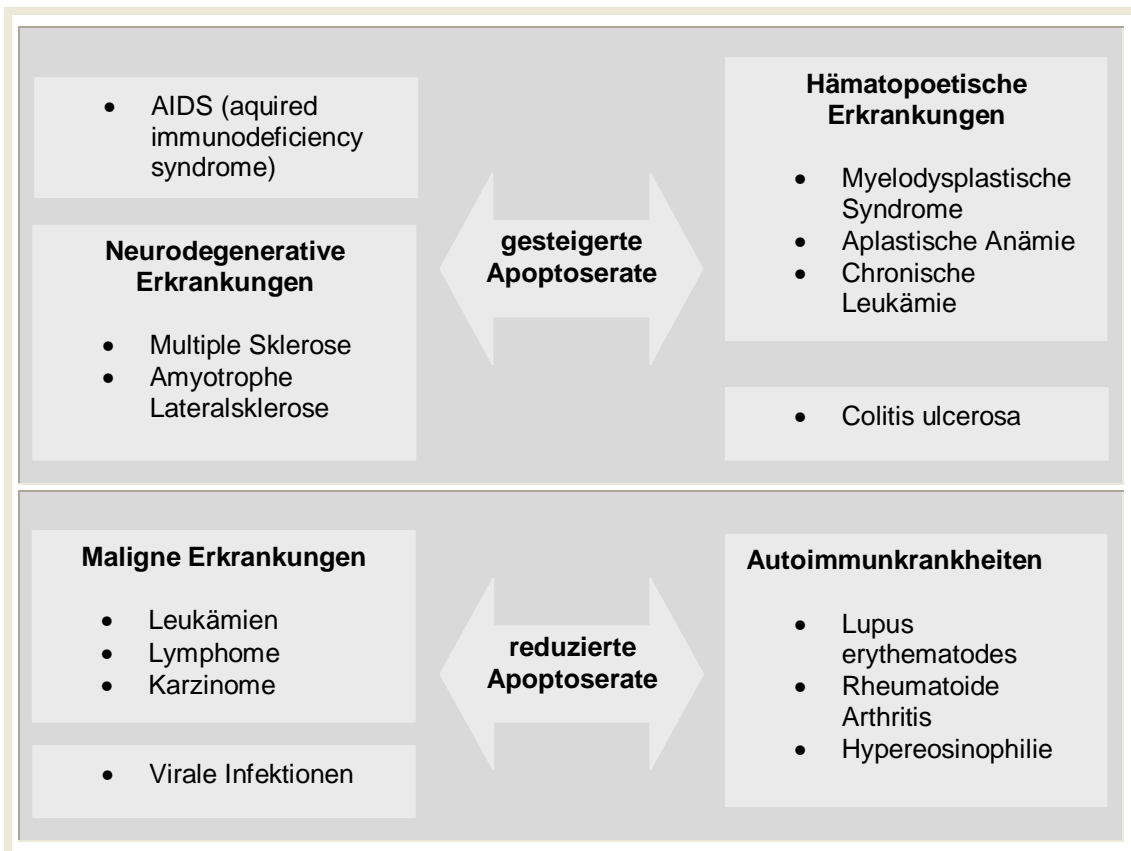


Abbildung 1: Störungen der Apoptoserate und deren Folgen (45; 161; 181; 183)

#### 1.1.4. Rolle der Caspasen

Eine entscheidende Rolle für die Einleitung und Exekution der Apoptose spielen die Caspasen (**C**ysteinyll **A**spartat-spezifische **P**roteinasen), die durch bestimmte proapoptotische Stimuli aktiviert werden. Sie forcieren den Abbau der Zelle: auf spezielle morphologische Veränderungen folgen Desintegration und Phagozytose. Caspasen machen Enzyme entweder funktionsunfähig oder führen sie in ihre aktive Form über (Procaspasen, Caspasen-aktivierte DNase), indem sie ihre Substrate anhand ihrer Aminosäuresequenz identifizieren und spalten.

Beim Menschen sind 11 verschiedene Caspasen bekannt, welche sich alle in Struktur und Aminosäuresequenz ähneln (144). Man kann sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Substrate unterscheiden und in drei verschiedene Gruppen einteilen. Die Caspasen-1, -4, -5, -13 (Gruppe I) aktivieren die Vermittlung von Zytokinen und haben so Einfluss auf Entzündungsreaktionen. Zur zweiten Gruppe gehören Caspase-3, -6, -7 und werden als Effektorcaspasen bezeichnet. Gruppe III beinhaltet Caspase-2, -8, -9, und -10 (Initiatorcaspasen). Diese sind, wie auch die Caspasen der Gruppe II, von Bedeutung für die Apoptose (143; 176).

Am Anfang der Caspasekaskaden steht ihre Aktivierung. Sie liegen nämlich als inaktive Pro-Enzymformen vor (78). Die Aktivierung kann entweder autokatalytisch oder durch Caspasen ähnlicher Spezifität erfolgen (23). Die aktivierten Caspasen spalten circa 70 Kernmatrixproteine, die dann ins Zytosol gelangen (73). Diese Prozesse führen zur Destruktion der Kernlamina, durch die der Transport aus dem Kern durch so genannte Kernporen unterbunden wird. Die DNS verliert zunehmend ihre Funktion, da neu entstandene Proteine nicht mehr an sie binden können.

Ebenfalls wird die Neusynthese von Makromolekülen, wie der RNS oder den Proteinen, inhibiert (67). Zusätzlich sind die Caspasen in der Lage anti-



apoptotische Regulatorproteine, wie beispielsweise Bcl-2, auszuschalten. Caspasen besitzen ein enormes Wirkungspotential, aufgrund dessen ihre Aktivierung und Wirkung streng kontrolliert ablaufen muss. Es existieren etliche Regulationsfaktoren, inhibitorische Proteine der Apoptose (IAP), die sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen, die ungewollt aktiviert wurden, hemmen können (57; 160).

## 1.2. Apoptosesignalwege

Es existieren drei verschiedene Signalvarianten, die Apoptose in den Zellen initiieren können.

- 1.) Aktivierung membranständiger Todesrezeptoren durch Bindung verschiedener Liganden (exogener Stimulus)
- 2.) Zellstress in Form von Hitze, Bestrahlung, Zytostatika, DNS-Schäden, oxidativen Stress und Schädigung der Mitochondrien (endogener Stimulus)
- 3.) Signalweg über das endoplasmatische Retikulum

Man vermutete lange Zeit drei voneinander unabhängige Signalkaskaden, die keinerlei Verbindungen untereinander haben. Inzwischen konnten jedoch einige Schnittpunkte festgestellt werden. Bisher ging man von Typ I Zellen (rezeptorabhängige Induktion der Apoptose) und Typ II Zellen (mitochondriale Aktivierung der Apoptose) aus (163).

Bei der Aktivierung der Caspase -3 aber treffen beide Wege aufeinander, ebenso interagieren beide mit dem proapoptotischen Protein Bid (aus der Bcl 2-Familie), das durch Caspase -8 transloziert wird und an der mitochondrialen Membran die Freisetzung von Cytochrom C induziert (128).

### **1.2.1. Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion**

Es gibt verschiedene Faktoren, die durch Bindung an bestimmte Oberflächenrezeptoren Apoptose auslösen können. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Tumornekrosefaktor (TNF). Der 1975 entdeckte Faktor wird von Makrophagen synthetisiert und ist in der Lage Tumorzellen zu zerstören (36). Die Rezeptoren, an die der TNF binden kann, werden nach ihrer Hauptfunktion benannt, nämlich Zelltodesrezeptoren („death receptors“, DR). Sie zählen zu den TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilien (164).

Die Transduktion des apoptotischen Signals findet an einer intrazellulär gelegenen Proteindomäne, der so genannten Todesdomäne, („death domain“, DD) statt (180). Nach diesem Aktivierungsschritt mit Hilfe spezieller Liganden wird ein zytoplasmatisches Adapterprotein an die Todesdomäne gebunden und veranlasst so über eine sogenannte Todeseffektordomäne („death effector domain“, DED) die Aktivierung einer Initiatorcaspase, die wiederum den Ablauf des programmierten Zelltodes einleitet (140). Beispiele für ausgiebig untersuchte Adapterproteine sind die „TNF-receptor-1-associated death domain (TRADD) (91) und die „Fas-associated via death domain“ (FADD) (41). Bisher wurden acht Todesrezeptoren identifiziert: (DR-1 (TNF-R1), DR-2 (CD95, APO-1 oder Fas), DR-3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR6, EDAR (ectodermal dysplasin receptor) und NGFR (nerval growth factor receptor, p75NTR) (1; 53; 127).

Tatsächlich sind die Todesrezeptoren auch in der Lage über bestimmte Faktoren Zellaktivierung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung auszulösen (9; 15).

### **1.2.2. Mitochondrialer Apoptoseweg**

Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zellen und liefern einen wichtigen Beitrag für deren Energieversorgung. Diese Zellorganellen verfügen über eine doppelte Membran mit innerem und äußerem Teil. Am Anfang des Mitochondrien-

induzierten Apoptoseweges reagiert die Zelle auf exogene Reize, als da beispielsweise wären Hypoxie, Hitze oder Entzug von Wachstumsfaktoren (106). Ebenfalls können bestimmte Chemikalien (193) oder Chemotherapeutika (192) direkt auf die Zelle wirken und die Apoptose einleiten. Der mitochondriale Signalweg kann aber auch auf indirektem Weg durch die Erzeugung von DNS-Schäden und darauffolgender Aktivierung des Tumorsuppressors p53 ausgelöst werden (35; 111).

Voraussetzung ist in allen Fällen die Veränderung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, die durch verschiedene Mechanismen kontrolliert wird. Eine Rolle spielen Moleküle, die Caspasen aktivieren, oder Funktionsverluste des Mitochondriums, die für das Überleben der Zelle entscheidend sind (79). Der genaue Mechanismus, der die Veränderung der Permeabilität erklärt, ist bisher noch nicht endgültig gefunden. Es gibt bislang zwei konkurrierende Erklärungsmodelle.

Eine Hypothese beschreibt den Zusammenbruch des inneren Membranpotentials nach osmotischen Veränderungen intramitochondrial, was konsekutiv zur Ausdehnung und zum Platzen der äußeren Membran führt (49). Das zweite Modell geht vom direkten Einfluss der Proteine der Bcl-2 Familie auf die äußere Mitochondrienmembran aus (79). Sicher ist jedoch, dass die Permeabilitätssteigerung der inneren Membran und der daraus resultierende Proteintransfer ins Zytosol bei der mitochondrial-gesteuerten Apoptoseentstehung eine Rolle spielen (75).

Wichtige Faktoren, die ins Zytosol gelangen sind:

1. Cytochrom C

Dieses hämhaltige Protein ist verantwortlich für den Elektronentransport zwischen innerer und äußerer Membran. Liegen Störungen in diesem Bereich vor, entstehen vermehrt Superoxidanionen, die durch Oxidation von Lipiden und Proteinen

Schäden an den Nukleinsäuren verursachen können (33; 37). Zudem ist Cytochrom C ein Cofaktor für die Aktivierung der Procaspase -9, wodurch weitere Caspasen aktiviert werden.

2. Diablo/Smac

Dieser Faktor ist ein proapoptotisches Protein, welches durch diverse Interaktionen die IAPs antagonisieren und somit die Apoptose stimulieren kann (38; 59; 186).

3. Apoptose - induzierender Faktor

Hierbei handelt es sich um ein Flavoprotein, welches auf Caspase unabhängigen Weg Chromatinkondensation, DNS-Fragmentierung und Phosphatidylserinexposition verursachen kann (96; 177).

4. Endonuklease G

Dieses Protein bindet als Nuklease an den Zellkern und löst ohne Hilfe von Caspasen DNS-Fragmentierung aus (125).

### **1.2.3. Apoptose durch das Endoplasmatische Retikulum (ER)**

Das Mitwirken des ER an der Entstehung der Apoptose ist eine neuere Entdeckung, auf die man durch das Vorhandensein einer im ER verankerten Caspase gestoßen ist (142). Kommt es durch Hypoxie, virale Infekte oder Proteinüberladung zu einer Störung der eigentlichen Aufgabe des ER, nämlich der Faltung unterschiedlicher Proteine durch Chaperone, häufen sich ungefaltete Proteinmoleküle an, die über die sog. „ER stress response“ (148) die Translationsrate weiterer Proteine hemmt. Zeitgleich erhöhen sich die Transkriptionsfaktoren für Chaperone, um die anflutenden ungefalteten Proteine beherrschen zu können. Finden sich in diesem Mechanismus Störungen ein, kommt es unweigerlich zur Induktion der Apoptose. Vermutlich ist ein initialer

Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem ER die Ursache. Der genaue Ablauf ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Anzunehmen ist die Beteiligung der beiden wesentlichen Apoptosekaskaden (178).

#### **1.2.4. Die Bcl-2-Proteinfamilie**

Die Bcl-2 Familien umfassen inzwischen 26 Mitglieder, die in zwei Untergruppen eingeteilt werden können. Zum einen in eine antiapoptotische Gruppe, in die Bcl-2 und Bcl-XL gehören, zum andern in eine proapoptotische, in die man Bax und Bid einordnen kann (40). Diese Proteine fungieren als potentielle Onkogene, aber auch als Tumorsuppressorgene. Gekennzeichnet sind alle Mitglieder durch die Anwesenheit von mindestens einem der vier konservierten Bcl-2 Homologie-Motive (BH1 bis BH4). Die BH3-Domäne ist zum Beispiel zuständig für die Ausbildung proapoptotischer Eigenschaften.

### **1.3. Erythrozyten**

#### **1.3.1. Ausstattung und Aufgaben der roten Blutkörperchen**

Den zellulären Hauptbestandteil des Blutes machen die Erythrozyten aus, deren Hauptfunktion darin besteht, O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zu transportieren. Weiterhin haben die roten Blutkörperchen Einfluss auf die pH-Regulation im Blut. Dabei spielt der rote Farbstoff, das Hämoglobin, eine wesentliche Rolle (182).

Die kernlosen Zellen haben einen Durchmesser von etwa 7,5 µm und eine Randdicke von etwa 2 µm. Sie imponieren als bikonkave Scheiben. Aufgrund ihrer Morphologie stellen Erythrozyten eine Zellspezies mit sehr ausgeprägter Verformbarkeit dar, welche selbst die Passage der kleinsten Kapillaren ermöglicht und gewährleistet. Mit fortschreitendem Alter nimmt die Flexibilität der Erythrozyten allerdings ab. Bei Schwellung nimmt der Erythrozyt eine

kugelige Form an (Sphärozyt). Durch Schrumpfung wird er zum Stechapfel (Echinozyt). Beide Formvarianten haben eine kürzere Lebensdauer (112). Die gesamte Oberfläche der Erythrozyten eines erwachsenen Menschen wird auf 3800 m<sup>2</sup> geschätzt (182).

Die Erythrozyten sind in der Lage, Sauerstoff zu binden. Dafür benötigen sie den roten Blutfarbstoff, das Hämoglobin. Ein Hämoglobinmolekül ist aus vier Untereinheiten, mit jeweils einer Proteinkette (Globin) und einem eisenhaltigen Porphyrinring (Häm), aufgebaut. Das O<sub>2</sub>-Molekül kann an das Häm binden und auf diesem Wege zu allen sauerstoffbedürftigen Zellen im Körper gelangen. Auf dem „Rückweg“ von der Peripherie zur Lunge transportieren die Erythrozyten CO<sub>2</sub>, welches dort abgeatmet werden kann.

### **1.3.2. Bildung und Abbau**

Der Körper bildet pro Sekunde ungefähr 2,4 Millionen Erythrozyten. Die Neubildung findet aus pluripotenten Stammzellen, die sich im Knochenmark befinden, statt. In der embryonalen Entwicklung übernehmen Leber und Milz diese Funktion. Die so genannten determinierten Stammzellen wandeln sich in Erythroid-determinierte Vorläuferzellen um. Diese sind Bestandteil des Proliferationspools, der alle determinierten Vorläuferzellen umfasst (colony forming unit cells). Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, z.B. Interleukin-3 oder CSF (Kolonie stimulierender Faktor), stimulieren diese Differenzierung. Die Entwicklung vom Proerythroblast über den Erythroblast zum Normoblast wird durch Erythropoetin gesteuert. Dieses Hormon wird sowohl in der fetalen Leber, als auch in den adulten Nieren synthetisiert. Sauerstoffmangel führt in der Niere zu vermehrter Erythropoetinbildung und -ausschüttung, und als Konsequenz zu gesteigerter Erythropoese. Es wurde gezeigt, dass Erythropoetin den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Erythrozyten, und somit auch die Aktivierung der Scramblase hemmt. In der Tat wird dadurch die Lebensdauer der Erythrozyten verlängert (138).

Die Normoblasten treten nach der Abstoßung ihres Zellkerns (E nukleation) ins Blut über. Sie werden nun als Normozyten bezeichnet, ein Synonym für Erythrozyten. In den ersten Tagen lassen sich in manchen Erythrozyten noch netzartige Strukturen erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ausgefällte Reste ribosomaler RNS und DNS. Man nennt diese Zellen Retikulozyten. Sie stellen eine Indikatorgröße dar, die Rückschlüsse auf das Ausmaß der Erythrozytenneubildung zulässt (182).

Die durchschnittliche Lebenszeit der Erythrozyten liegt zwischen 110 und 130 Tagen. In dieser Zeitspanne zirkulieren sie in der Blutbahn. Gealterte Zellen, die bereits deutlichen Enzym- und Flexibilitätsverlust erfahren haben, werden vom mononuklearen Phagozytensystem durch Makrophagen phagozytiert. Gestresste Erythrozyten präsentieren Phosphatidylserin auf ihrer Zelloberfläche. So haben Makrophagen, die mit speziellen Phosphatidylserinrezeptoren ausgestattet sind (65; 134) die Möglichkeit, Phosphatidylserin-präsentierende Erythrozyten umgehend zu erkennen, zu verschlingen und abzubauen. Durch diesen Mechanismus erfolgt die Elimination aus dem Blutkreislauf (24; 62).

Der Abbau der Erythrozyten findet hauptsächlich im retikuloendothelialen System von Knochenmark, Leber und Milz statt. Auf der Zelloberfläche exponiertes Phosphatidylserin ist ein schon länger bekanntes „Eat-me“-Signal für Makrophagen, das nachweislich schon bei der Erythropoese Verwendung findet. Es markiert den Nukleus nach der E nukleation und ist daher verantwortlich für seine Verspeisung und seinen Abbau (195). Die abgebauten Fragmente treten schließlich unterschiedliche Wege an. Bilirubin, ein Abbauprodukt des Hämoglobins, gelangt über die Leber und das Gallensystem in den Darm und wird dort ausgeschieden. Das Eisen und die Proteinbestandteile werden wiederverwertet (182).

### 1.3.3. Stoffwechsel der Erythrozyten

In reifen Erythrozyten sind weder Zellkern, RNS, Mitochondrien noch Ribosomen enthalten. Diese Organellen sind mit der Eukleation verloren gegangen. Die Fähigkeiten zur Zellteilung, zur Enzymsynthese und zur oxidativen Energiegewinnung sind durch diesen Verlust abhanden gekommen. Deshalb ist der Erythrozyt hauptsächlich auf die anaerobe Glykolyse angewiesen. Dabei entstehen aus Glukose Laktat und das Energieäquivalent ATP. Die Redoxäquivalente (NADPH) werden aus Glukose über den Pentosephosphatweg generiert. Das entstandene ATP dient vor allem der Erhaltung der Zellstruktur und der Aufrechterhaltung des Ionengradienten an der Membran durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (siehe dazu Kapitel 1.3.4) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

NADPH spielt eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von reduziertem Glutathion (GSH) (112). Glutathion regeneriert in reduzierter Form Thiolgruppen von Proteinen und führt zur Entgiftung von Peroxiden. Ein Mangel an Energie beeinträchtigt also über die Verminderung von NADPH (Pentosephosphatweg) den Nachschub an GSH und schwächt somit die antioxidative Abwehr der Erythrozyten (21). NADH benötigt der Erythrozyt zur Reduktion von Methämoglobin als Voraussetzung für den Sauerstofftransport (112).

### 1.3.4. Spezifische Membrantransporte

Die Erythrozyten besitzen ein Membranpotential von etwa -10 mV, wobei die Membran hauptsächlich für  $\text{Cl}^-$  leitfähig ist. Die in der Zellmembran lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sorgt für niedrige intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen, während  $\text{K}^+$  in der Zelle auf hohem Niveau gehalten wird. Die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit ist gering, während die Leitfähigkeit von  $\text{Na}^+$  physiologisch gegen Null geht. Eine Aktivierung der  $\text{K}^+$ -Kanäle führt zur Hyperpolarisation, darauf folgt ein  $\text{Cl}^-$ -Verlust, der zur Zellschrumpfung führt. Umgekehrt verstärkt eine Zunahme der



$\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit durch Depolarisation den  $\text{Cl}^-$ -Einstrom: die Zelle schwillt an. Wesentlich für den  $\text{HCO}_3^-$ -Transport ist der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (112).

#### **1.4. Programmierter Zelltod der Erythrozyten**

Es ist noch nicht lange bekannt, dass Erythrozyten in der Lage sind, eine Form der Apoptose zu durchlaufen. Bis vor wenigen Jahren noch glaubte man, Hämolyse und Nekrose seien die einzigen Todesformen der Erythrozyten. Angesichts der Tatsache, dass Erythrozyten über keinen Kern mehr verfügen, stellt man sich berechtigt die Frage, wie das Apoptoseprogramm durchgeführt werden kann. Hinzu kommt, dass andere wichtige Organellen, wie das Mitochondrium und das endoplasmatische Retikulum, beim Erythrozyten nicht vorhanden sind. Diese Organellen spielen jedoch in der Zelltodkaskade anderer Zellspezies eine wichtige Rolle.

Die These, Erythrozyten könnten keinen apoptotischen Todesmarsch durchlaufen, wurde durch eine Studie bekräftigt, in der nach Behandlung mit Staurosporin, Cycloheximid und nach Serumdeprivation bei Erythrozyten keine Apoptose auftrat. Kernhaltige Zellen dagegen zeigten klassische Apoptosezeichen (54).

Anschließende Untersuchungen führten diese Studie weiter und bereicherten den Zelltodbegriff um den programmierten Zelltod von Erythrozyten. Es wurde gezeigt, dass nach Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophoren, z.B. Ionomycin, der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten anstieg und konsekutiv die Zellen schrumpften. Dieser Vorgang führte zur Phosphatidylexposition an der Zelloberfläche. Beide beschriebenen Phänomene sind spezifisch für die Apoptose kernhaltiger Zellen (19; 30; 54).

Erythrozyten sind also in der Lage eine Art programmierten Zelltod zu begehen und somit auf bestimmte Triggerfaktoren, wie hyperosmotischen Schock (115), oxidativen Stress (61) oder Energiemangel, zu reagieren (116).

Bei erythrozytären Erkrankungen (wie z.B. Sichelzellanämie, Thalassämie, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenasemangel) findet sich nach zellulärem Stress eine erhöhte Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche. Ein Erklärungsmodell für diese Erkrankungen könnte somit eine verkürzte Lebensdauer der Zellen sein, die erniedrigte Erythrozytenzahlen und pathologische Hämatokritwerte zur Folge hat (118). Es gibt verschiedene Wege für die Erythrozyten, apoptotisch zu sterben, von denen hier zwei genauer beschrieben werden: der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalweg und die Ceramid-abhängige Signalkaskade.

#### **1.4.1. $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalweg**

Von eminenter Bedeutung hierbei ist eine Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenstroms in die Zelle durch nicht-selektive Kationenkanäle. Diese können durch oxidativen Stress (61), osmotischen Schock (92; 115), Acetylcholin (18), Membranpolarisation (42), Energiemangel (116) und Verminderung der intra- und extrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration (61; 92) geöffnet werden. Dadurch erhöht sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Diese Konzentrationsänderung bedingt weitere Veränderungen, die im Folgenden beschrieben werden.

##### **1.4.1.1. Aktivierung des Gardos Kanals**

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt zur Öffnung eines Volumen-sensitiven, einwärts-gleichgerichteten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals (KCNN4, hSK4, Gardos-Kanal) in der Membran der Erythrozyten. Die Zellmembran wird hyperpolarisiert und erleidet so einen  $\text{KCl}$ -Verlust (56; 60; 72; 81, 124; 149; 169). Wasser folgt dem osmotischen Gradienten aus der Zelle, die dadurch Volumen einbüßt und schrumpft (88; 119).

Der Gardos-Kanal ist beispielsweise an der Schrumpfung und dem Flexibilitätsverlust durch Formveränderung desoxygenerter Sichelzellen beteiligt. Diese Mechanismen sind mitunter ursächlich für die massive Erhöhung der Blutviskosität (71; 95). Der Einfluss apoptotischer Stimuli, auf die Sichelzellen nachgewiesenermaßen sensibler reagieren, verkürzt die Lebensdauer dieser Zellen (118).

#### **1.4.1.2. Aktivierung der erythrozytären Scramblase**

Die Scramblase wird ebenfalls durch den forcierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aktiviert. Die Wirkung dieses Enzyms zeichnet sich durch die unspezifische Delokalisation von Phospholipiden innerhalb des Lipidlayers der Zellmembran aus (20; 197). Daraus resultiert ein konsekutiver Zusammenbruch der Membranasymmetrie. Durch die Scramblaseaktivität wird Phosphatidylserin, welches sich normalerweise auf der Membraninnenseite befindet, auf die Außenseite der Zellmembran transloziert (19; 30; 54). Das Phosphatidylserinsignal wird von Makrophagen erkannt und führt zur Phagozytierung des Erythrozyten (16). Die Scramblase verkürzt also die Lebensdauer von Erythrozyten. Interessanterweise zeigen gealterte Zellen in der Tat erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte (102; 157).

#### **1.4.1.3. Aktivierung von Calpain**

Calpaine zählen zu den Thiol-Proteasen, eine Familie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Cystein-Endopeptidasen. Sie kommen im humanen Organismus ubiquitär vor und transduzieren extrazelluläre Signale, die durch die Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelöst werden (173). Calpaine erfüllen überaus wichtige Aufgaben. Es treten daher infolge einer Störung ihrer Funktionen bezüglich des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, Apoptose und Nekrose Krankheiten, wie z. B. M. Alzheimer, Katarakt und Muskeldystrophie, auf (174).

Durch Calpaine werden Strukturproteine wie Aktin, Fodrin und Gelsolin (39) modifiziert, und es kommt zu einer Spaltung der Proteine Bid und Bax (52). Bisher sind zwei Calpain-Isoformen bekannt. Calpain I ( $\mu$ -form) ist in den Erythrozyten enthalten, darüber hinaus existiert noch das Calpain II (m-form). In der Zelle liegt die  $\mu$ -Form als inaktives Heterodimer vor. Es gliedert sich in eine schwere (80 kDa) und eine leichte (30 kDa) Untereinheit. Die schwere katalytische besteht aus vier, die leichte regulierende aus zwei Domänen (13; 196). Eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Dissoziation der Untereinheiten (104).  $\mu$ -Calpain besitzt die Fähigkeit sich selbst zu aktivieren. Durch die Mitwirkung eines Proteins, das in der Erythrozytenmembran nachweislich vorliegt, ist die Aktivierung des Calpain bereits bei physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen möglich (159). Als physiologischer Inhibitor fungiert ein Protein namens Calpastatin, das sich in der Nähe des Kerns befindet. Das Wechselspiel der beiden Antagonisten Calpain und Calpastatin hängt von deren Konzentrationsverhältnissen innerhalb der Zelle ab. Der Calpastatin-Spiegel wird durch Wachstumshormone reguliert (12).

#### **1.4.1.4. Auswirkungen auf die Formation des Zytoskelettes**

Die ausgeprägte Verformbarkeit der Erythrozyten stellt spezielle Anforderungen an die Zellmembran und das damit in Verbindung stehende Zytoskelett, die nur durch eine bestimmte Struktur gewährleistet werden können. Die Grundlage des Zytoskelettes besteht aus Spektrin, das über verschiedene Proteine in der Lipiddoppelschicht verankert wird. Wichtige Bestandteile dabei sind des weiteren Aktin, Protein 4.1, Adducin, Tropomyosin, Tropomodulin, Dematin und p55. Durch laterale Wechselwirkungen entsteht ein stabiler Komplex, der durch  $\beta$ -Spektrin, Ankyrin und Bande 3 bzw. Protein und Glycophorin C in der Lipiddoppelmembran fixiert wird (145).

Die Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst diese Konstellationen. Calmodulin ist in der Lage, die Spektrin-Aktin-Interaktionen

(Ca<sup>2+</sup>-getriggert) zu beeinflussen und so die Membranstabilität zu steuern (179). Calmodulin ist ein Ca<sup>2+</sup>-regulierendes Protein, welches die Signaltransduktion durch reversible Bindung von Zielproteinen (target proteines) steuert (194).

Ein weiterer Mechanismus, der das Zytoskelett Ca<sup>2+</sup>-abhängig moduliert, ist die Aktivierung einer Transglutaminase, die Membranproteine quervernetzen kann. Das führt zu einem Verlust an Elastizität und Flexibilität der Membran (6).

#### **1.4.1.5. Stimulation von Phospholipasen, Proteinkinasen und Phosphatasen**

Ca<sup>2+</sup>-Ionen sind darüber hinaus in der Lage Phospholipasen (3; 4; 171), Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (43; 136) aktivieren.

#### **1.4.2. Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Signalweg**

Da man die Apoptose der Erythrozyten durch bestimmte Maßnahmen (z. B. durch Ca<sup>2+</sup>-Depletion im Versuchsansatz oder durch Zugabe des Kationenkanalinhibitors Amilorid) nicht immer komplett unterbinden kann, muss noch ein weiterer Signalweg existieren.

Nach Inkubation der Erythrozyten in hypertonem Medium konnte die Bildung von Ceramid nachgewiesen werden. Die Ceramidbildung wiederum begünstigt die Aktivität der Scramblase, indem Ceramid die Sensitivität der Scramblase für Ca<sup>2+</sup> erhöht. Dies führt zu einer verstärkten Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche (116). Ceramid ist ein Sphingolipid und spielt in vielen Zellen eine bedeutende Rolle bei der Apoptoseinduktion (70; 74; 107; 147; 152). Durch die Spaltung des Membranphospholipids Sphingomyelin durch die Sphingomyelinase entsteht Ceramid.

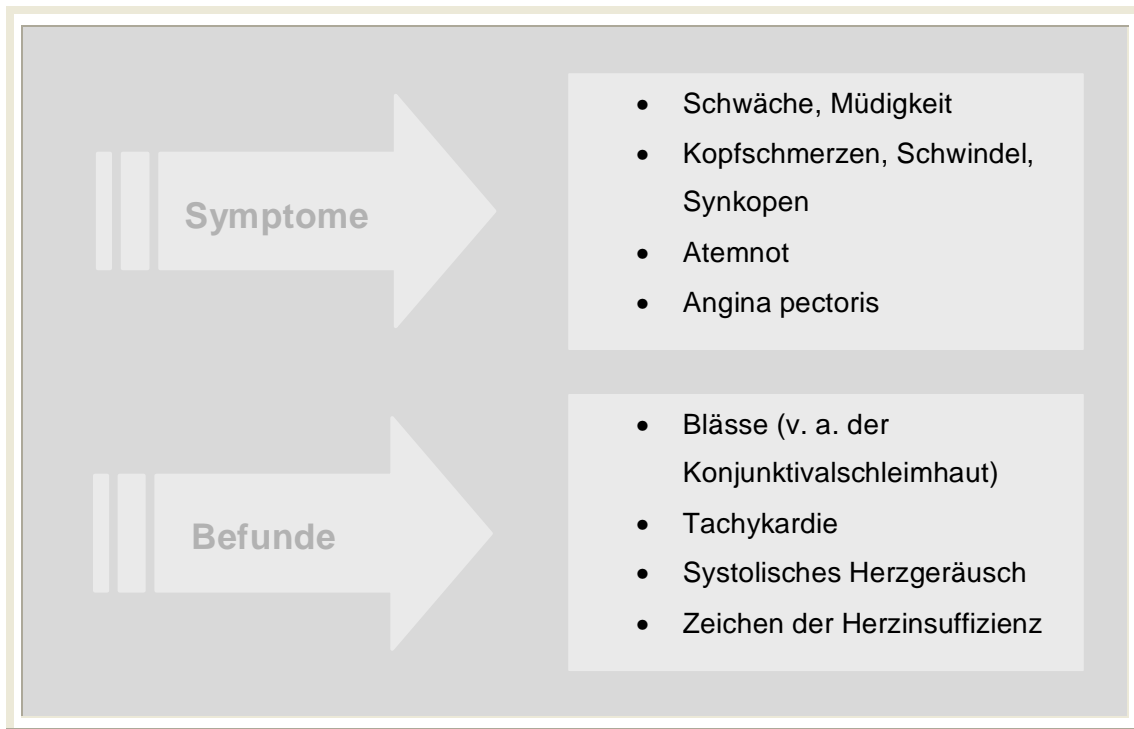
### **1.4.3. Caspasen und andere Apoptosestimuli**

Bisher stand ein Nachweis für die Aktivität von Caspasen noch aus, die Existenz der Proenzyme jedoch war bereits gesichert (19; 30; 54).

Neueste Untersuchungen jedoch weisen eine CD95/Fas-vermittelte erythrozytäre Phosphatidylserinexposition hervorgerufen mittels Caspaseaktivierung nach. Die demonstrierten Effekte wurden teilweise durch Caspase-8 und -3 verursacht. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die Aminophospholipid-Translocase der Erythrozyten, die in ihrer Aktivität nachweislich abnahm, und auf die Phosphatidylserinexposition, die gesteigert war, gerichtet (130).

### **1.5. Anämien**

Der Begriff Anämie kommt aus dem griechischen und bedeutet wörtlich übersetzt „Abwesenheit von Blut, Blutarmut“. Dabei mangelt es jedoch nicht an Blut als Flüssigkeit, sondern vielmehr ist die Sauerstofftransportkapazität des Blutes aufgrund einer verminderten Erythrozytenzahl oder einer erniedrigten Hb-Konzentration reduziert. Es handelt sich um ein sehr häufiges Krankheitsbild, welches oftmals auch als Symptom anderer Grunderkrankungen imponieren kann. Die klinischen Erscheinungen (Abb. 2) werden durch ihre pathophysiologischen Konsequenzen verständlich.



**Abbildung 2:** Klinik der Anämie, unspezifische Symptome und Befunde aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung (154)

Die verminderte Sauerstofftransportfähigkeit des Blutes führt zunächst zu kompensatorischen Maßnahmen des Kreislaufs. Dazu zählen Tachykardien, eine erhöhte Blutdruckamplitude und eventuell funktionelle Herzgeräusche. Gleichzeitig bedeutet dies eine kardiale Mehrbelastung, die in schweren Fällen in eine Herzinsuffizienz übergehen kann.

Eine milde Anämie bleibt oft asymptomatisch. Sie äußert sich gegebenenfalls durch gesteigerte Müdigkeit und Herzklopfen. Ab Hb-Werten unter 7,5 g/dl (die Normbereiche liegen zwischen 11,5 bis 16,5 g/dl bei Frauen und 13 bis 18 g/dl bei Männern) steigen jedoch das Herzzeitvolumen und die Herzfrequenz selbst bei ansonst gesunden Patienten (154).

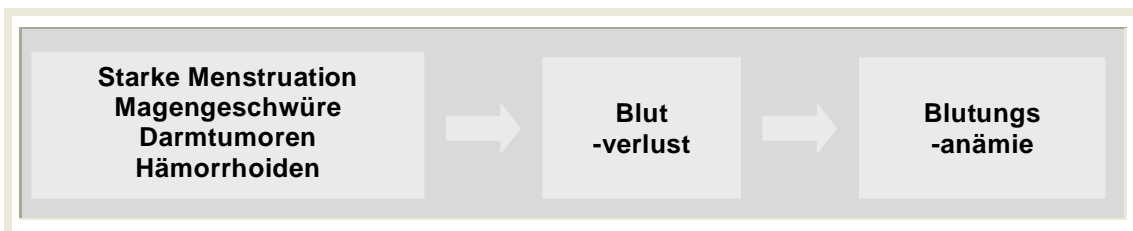
### 1.5.1. Klassifikation der Anämien

Man kann die unterschiedlichen Anämieformen morphologisch (Größe der Erythrozyten im peripheren Blut, MCV), chemisch (Hämoglobingehalt der Erythrozyten, MCH) und pathogenetisch einteilen und unterscheiden. Zusätzlich erwähnen kann man noch bestimmte Anämien, die nach ihrem Knochenmarksbefund differenziert werden (z.B. megaloblastäre Anämie, sideroblastische Anämie).

Ursachen für Anämien sind:

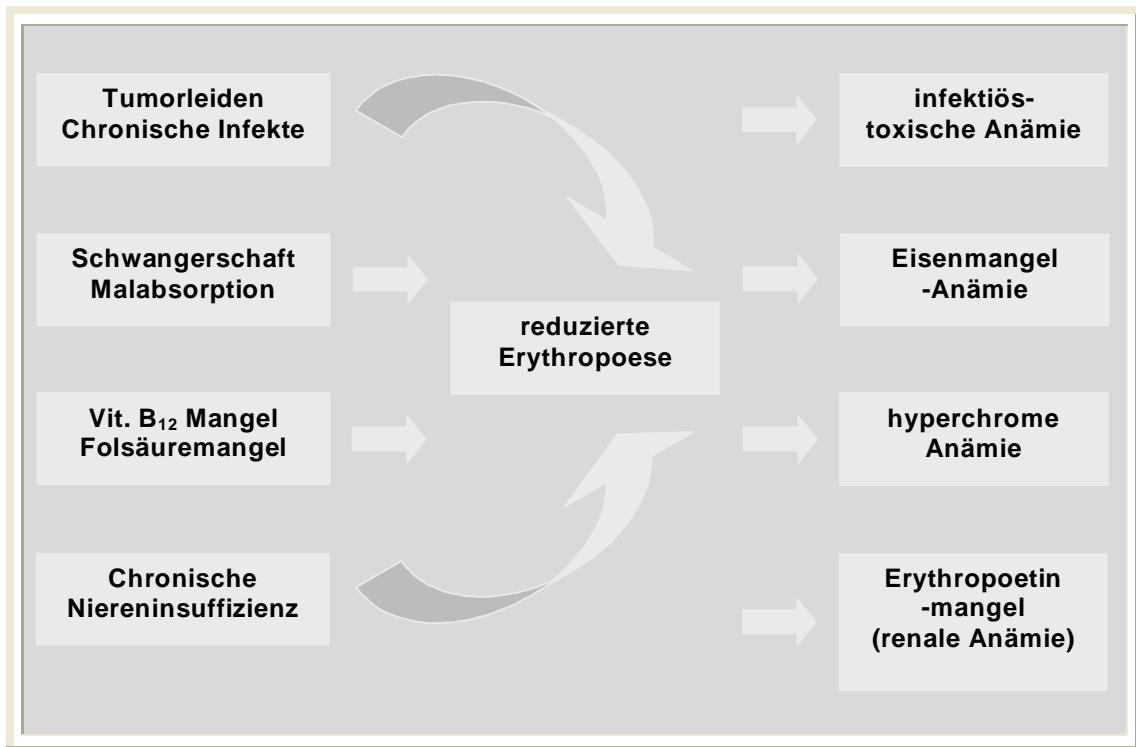
- Eisenmangel, selten Thalassämie als Ursache einer hypochromen, mikrozytären Anämie
- Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel, Folsäuremangel, chronische Lebererkrankungen können eine makrozytäre Anämie auslösen
- Akuter Blutverlust und chronische Erkrankungen (Infektion, Tumor) können ursächlich für eine normozytäre, normochrome Anämie sein.

Pathogenetisch einteilen kann man Anämien, indem man unterscheidet zwischen Bildungsstörung (Erythropoese, Abb. 4), Blutverlust (Abb. 3) und gesteigertem Abbau (Hämolyse, Abb. 5).

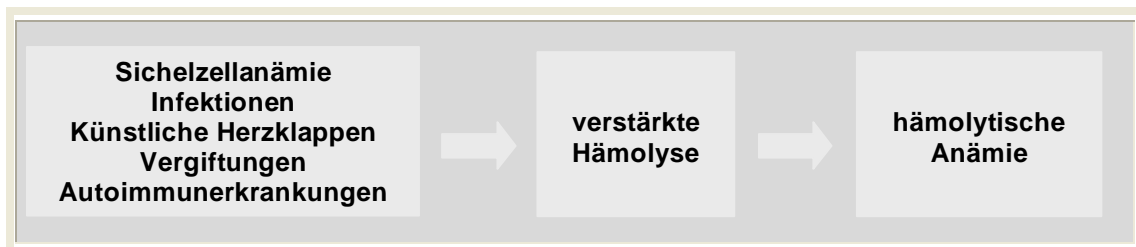


**Abbildung 3:** Blutverlust und mögliche Ursachen als häufiger Grund für eine Anämie (154)





**Abbildung 4:** Bildungsstörungen als Grund für eine Anämie (154)



**Abbildung 5:** Anämien können verursacht werden durch Hämolyse (154)

Das Blutbild ist häufig ausschlaggebend für die Differenzierung der unterschiedlichen Anämieformen. So findet man erniedrigtes Eisen und Ferritin bei der Eisenmangelanämie, erhöhte Retikulozytenzahlen bei hämolytischer Anämie und nach Blutverlusten. Bei der renalen Anämie sind die Retikulozyten erniedrigt und bei Vitamin B<sub>12</sub>- oder Folsäuremangel normal (87). Typus, Ausprägungsgrad und Symptomatik der Anämie entscheiden über die Behandlungsstrategie. Eine renale Anämie wird mit Erythropoetingabe behandelt (55). Blutungsanämien kann man mit Bluttransfusionen

entgegenwirken. Ein Vit. B<sub>12</sub>-Mangel wird durch Gabe eines Vitaminpräparates substituiert.

### **1.5.2. Eisenstoffwechsel im menschlichen Organismus**

Das Gesamtkörpereisen des Erwachsenen beträgt 3,5 - 5 g, der normale tägliche Eisenverlust nur 1 mg (während der Menstruation 2 mg). Man sollte hierbei erwähnen, dass kein physiologischer Ausscheidungsmechanismus existiert. Eisen wird lediglich durch Verlust (Haut, Darm, Harnwege) abgeschilfterter Zellen eliminiert. Die durchschnittliche Aufnahme liegt bei ca. 1,5 mg pro Tag bei einem mittleren Nahrungseisengehalt von 10 - 20 mg (pro Tag) (154).

Dabei gliedert sich der Eisengehalt in

- Hämeisen (70%)
- Depoteisen (18%): intrazelluläre Speicherung von Hämosiderin und Ferritin
- Funktionseisen (12%): Myoglobin und eisenhaltige Enzyme
- Transporteisen (0,1%): an Transferrin gebundenes Eisen.

Der Organismus hat zwei Mechanismen zur Verfügung, die den Eisenbedarf bei physiologischen Bedingungen sicherstellen. Zum einen kann durch Makrophagen freigesetztes Hämeisen und Funktionseisen wieder in Form von Ferritin oder Hämosiderin gespeichert werden, oder direkt an Transferrin gebunden erneut dem Organismus zur Verfügung gestellt werden (87). Aus der Häm-Wiederverwertung durch Erythrozyten verzehrende Makrophagen stammt der mengenmäßig größere Teil des Eisens, welcher zur Erythropoese weiter verwendet wird (16).

Zum andern kann neues Eisen über den Verdauungstrakt aufgenommen werden. Eisen wird nur in zweiwertiger Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) im Duodenum und oberen Dünndarm resorbiert. Im Magen wird das in der Nahrung vorkommende dreiwertige Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) durch die Magensäure aus der Nahrung freigesetzt und zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Anazidität des Magens, sowie morphologische Veränderungen der Dünndarmmukosa (z.B. ein Mangel an Transportprotein), bewirken eine Reduktion der Eisenresorption. Die Bioverfügbarkeit des Nahrungseisens beträgt jedoch  $< 10\%$  und kann bei Eisenmangel auf bis zu  $25\%$  ansteigen (87). Im Blut wird Eisen an Transferrin (ein  $\beta_1$ -Globulin) gebunden transportiert. Daher nimmt der Transferrinspiegel bei Eisenmangel zu. Bei anderen Anämieursachen (Infekt, Tumor) sinkt er.

Im Körper wird Eisen an Ferritin gebunden gespeichert. Das Serumferritin ist ein wichtiger diagnostischer Marker des Eisenmangels (44). Es besteht aus einer Proteinschale (Apo-ferritin) und einem Kern aus Ferri-hydroxyd-Phosphat-Micellen. Es schützt die Zellen vor der toxischen Wirkung ionisierten Eisens. Ferritin korreliert mit den im Körper vorhandenen Eisenvorräten, und ist daher bei einer Eisenmangelanämie erniedrigt. Bei beginnendem Eisenmangel ist meistens Ferritin als erster Parameter vermindert.

Ein Überschuss an Eisen schlägt sich als Hämosiderinablagerungen nieder. Dabei handelt es sich um Lysosomen, die durch zelluläre Autophagie denaturierter Ferritinpartikel entstehen. Sie sind gehäuft in Makrophagen und Leberparenchymzellen zu finden (87).

### **1.5.3. Eisenmangel - eine Volkskrankheit**

Eisenmangel ist eine weit verbreitete Funktionsstörung, die bei weltweit 500 - 600 Millionen Menschen zur Entstehung einer Anämie führt. In Europa sind etwa  $10\%$ , in den Entwicklungsländern  $> 50\%$  der Frauen im gebärfähigen Alter betroffen. Weltweit leiden ca.  $25\%$  der Bevölkerung an Eisenmangel.

Dabei ist die Eisenmangelanämie die häufigste Anämieform (ca. 80 % aller Anämien) (87). Hauptursachen dafür können unzureichende Ernährung, Malresorption, gesteigerter Eisenbedarf (Gravidität, Stillzeit, Wachstum) und Blutungen jedweder Art sein. Der Eisenmangel erschwert die Hämoglobinsynthese und folglich auch die Bildung von funktionsfähigen Erythrozyten mit ausreichendem Hämoglobingehalt. Die Abnahme der Sauerstofftransportfähigkeit des Blutes führt zum Versorgungsmangel im Gewebe.

Man kann die Erkrankung in drei verschiedene Stadien einteilen:

1. Prälatenter Eisenmangel

Dieser liegt vor, wenn die physiologischen Speicher entleert sind. Reaktiv ist das Ferritin und der Eisengehalt im Knochenmark erniedrigt. An weiteren Parametern im Blutbild lässt das Defizit sich meist noch nicht feststellen.

2. Latenter Eisenmangel

Zusätzlich zum Ferritin haben hier auch das Serumeisen und die Transferrinsättigung abgenommen. Die freie Eisenbindungskapazität ist dagegen erhöht. Der Prozentsatz der hypochromen Erythrozyten im Blut liegt bei > 10 %.

3. Manifester Eisenmangel

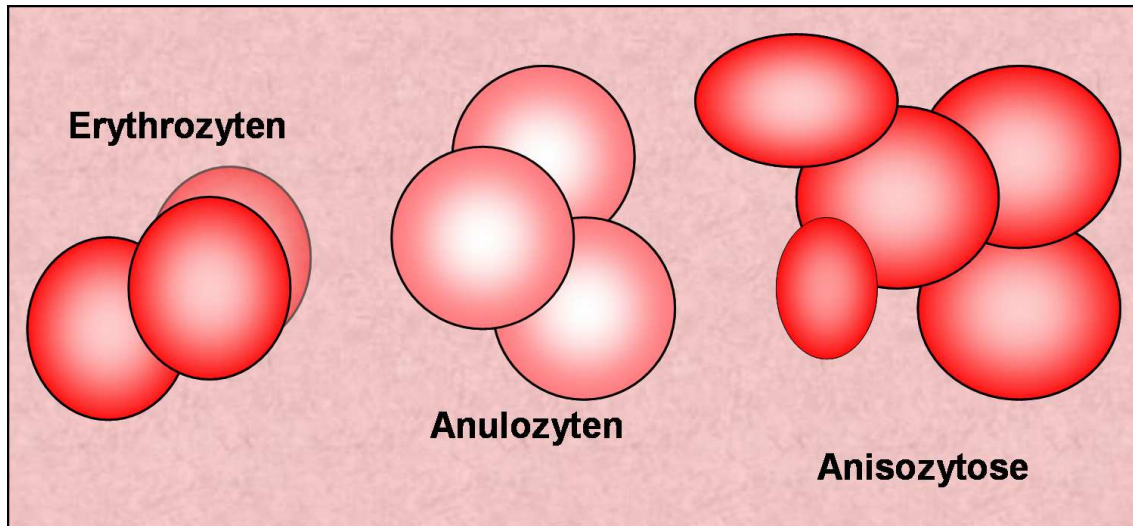
Als solchen bezeichnet man die fortgeschrittene Störung, wenn sich zu den oben genannten Charakteristika des latenten Eisenmangels eine hypochrome mikrozytäre Anämie (Hb unter 28 pg) gesellt (85; 87).

**Tabelle 2:** Normwerte und mögliche pathologische Veränderungen im Blutbild bei einer Eisenmangelanämie (m= männlich, w= weiblich, MCV= mittleres korpuskuläres Volumen, MCH= mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, ▼= kleiner als der Normbereich) (154)

Parameter	Normwerte	Eisenmangelanämie
	m / w	
Hämatokrit	33-43 / 39-49 %	▼
Hämoglobin	12-15 / 13,6-17,2 g/dl	▼
Erythrozytenzahl	3,5-5,0 x 10 <sup>12</sup> /l	▼
MCV	80 - 99 fl	< 80 fl
MCH	27 - 34 pg	▼
Serumeisen	11,6 - 31,3 µmol/dl	< 5,4 µmol/dl
Ferritin	20 - 250 µg/l	< 10 (w)/< 30 (m) µg/l
Transferrin	2 - 3,8 g/l	> 3,8 g/l

Die Morphologie der Erythrozyten kann sich bei manifestem Eisenmangel verändern.

Es können Anisozyten im Blutaussstrich beobachtet werden (Abb. 6). Damit ist gemeint, dass die Zellen sich untereinander in ihrer Struktur nicht alle gleichen. Als eine weitere Auffälligkeit können Anulozyten (Abb. 6) entstehen. Diese sind, aufgrund des verminderten Hämoglobingehalts, ringförmig und zentral abgeblasst.



**Abbildung 6:** Morphologisches Bild von einer Anisozytose und Anulozyten

Neben den Veränderungen im Blut können als klinische Symptome Rillenbildung der Nägel, diffuser Haarausfall, Mundwinkelrhagaden, Zungenbrennen und Dysphagie auftreten (87).

Untersuchungen an Kindern ergaben Entwicklungsstörungen, vor allem bezüglich der Sprachfähigkeiten bei vorliegender Eisenmangelanämie (89).

#### **1.5.4. Behandlung des Eisenmangels**

Mittel der Wahl bei der Behandlung des Eisenmangels sollte die Therapie durch orale Eisensubstitution sein (44). Es wird die Gabe von Fe(II) 100 - 200 mg pro Tag für 3 - 6 Monate empfohlen. Nach einer Woche sollten bei erfolgreicher Therapie die Retikulozyten und der Hämoglobinwert ansteigen. Man muss zusätzlich eventuelle Blutungen als Ursache einer mikrozytären hypochromen Anämie ausschließen, um ein Scheitern der Substitutionstherapie zu vermeiden. Gründe für mögliche Blutverluste können beispielsweise Ulzerationen sein. Auch an maligne Prozesse muss gedacht werden. Daher ist eine abklärende Diagnostik anzuraten.

Eine parenterale Eisensubstitution ist bei oraler Eisenintoleranz, Eisenmalabsorption (44), entzündlichen Darmerkrankungen, Malabsorptionssyndromen und bei realer Anämie mit Erythropoetinbehandlung zulässig. Man verabreicht stets nur dreiwertiges Eisen, z.B. Fe(III)Glukonat (maximale Einzeldosis 62,5 mg). Es empfiehlt sich, das Eisen als Kurzinfusion (z.B. in 100 - 250 ml NaCl 0,9 %) zu applizieren. Dabei verwendet werden Eisen-Dextran, Eisen-Glukonat oder Eisen-Sucrose (44). Kontraindiziert ist die Eisensubstitution bei normalen, im Rahmen einer Entzündungs-, Infekt- oder Tumoranämie, oder erhöhten Ferritinwerten, die bei Häm siderose oder Hämochromatose auftreten.

Zu erwähnen sind noch die unerwünschten Nebenwirkungen einer Substitutionstherapie:

- Schwarzfärbung des Stuhls
- Gastrointestinale Beschwerden (die Einnahme während den Mahlzeiten wird empfohlen)
- Bei parenteraler Gabe kommt es häufig zu Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, auch ist hier die Gefahr einer Überdosierung gegeben.

## **1.6. Blei**

### **1.6.1. Historie**

Blei ist eines der zehn Metalle des Altertums. Durch archäologische Funde weiß man, dass Blei intensiv von der damaligen Bevölkerung genutzt wurde (58). Schon die alten Ägypter glasierten um 5000 v. Chr. Töpfe mit Blei. Auf Zypern und Rhodos förderten die Griechen Bleierze und die Römer stellten Wasserleitungen und andere Gegenstände aus dem Schwermetall her (156).

Bleioxid wurde zur Süßung saurem Wein beigemischt und dadurch als „Bleizucker“ bekannt. Bleiacetat im Wein führte im Mittelalter im Reutlinger Raum zu Vergiftungen und brachte die Bezeichnung „Reutlinger Krankheit“ hervor (156).

Der deutsche Name Blei geht auf das indogermanische Wort „bhlei“ (glänzen, leuchten) zurück (156). Das chemische Symbol Pb (Plumbum, von plumbeus = bleiern, stumpf) wurde seinerseits von J.J. Berzelius im Jahre 1814 vorgeschlagen. Bleivergiftungen sind schon seit mehreren tausend Jahren bekannt und spielen auch heutzutage noch immer eine Rolle (172).

### **1.6.2. Blei heute**

Heute befindet sich 40 % des Bleibedarfs in Batterien, der Rest wird in Anstrichfarben (z.B. Mennige oder Bleiweiß), Schießblei, Wäge- und Ballastgewichten, sowie als Abschirmschutz vor hochenergetischer Strahlung z.B. in Röntgengeräten, verarbeitet. Die bedeutendste Verbindung ist sicher das Tetraethylblei, ein Antiklopfmittel in Benzinmotoren. Blei gelangt somit in die Abgase, wird von Mensch und Umwelt aufgenommen und kann deshalb zu beeinträchtigenden Gesundheitsstörungen führen. Es wurden deshalb Motoren und Kraftstoffe entwickelt, die auch ohne Blei eine hohe Leistungsfähigkeit aufbringen können (153).

Zusätzlich sind gesetzliche Einschränkungen und Grenzwerte für die Verwendung von Blei erlassen worden. Für Trinkwasser gilt nach der Trinkwasserverordnung ein Grenzwert von 0,025 mg Blei/L, für Mineralwasser 0,05 mg/L und für Wein nach der Weinverordnung 0,25 mg/L. Seit April 2002 gelten folgende Höchstgehalte von Blei in verschiedenen Lebensmitteln: Fisch und Getreide dürfen bis zu 0,2 mg/kg; Fleisch, Gemüse und Obst beispielsweise 0,1 mg/kg enthalten (156).



### 1.6.3. Toxikokinetik

Blei wird durch Einatmen bleihaltiger Stäube (Resorptionsquote 40 - 50 %) in der Lunge resorbiert. Im Magen-Darm-Trakt können bis zu 10 % aufgenommen werden (bei Kindern bis zu 50 %) (146). Nach der Aufnahme wird  $Pb^{2+}$ , hauptsächlich an Hämoglobin gebunden, innerhalb kurzer Zeit im ganzen Körper verteilt. Es kann in Knochen und in Zähnen schwer lösliche Bleiphosphatverbindungen eingehen und dort über viele Jahre gespeichert werden (Bleidepothalbwertszeit ~ 30 Jahre). Deshalb befindet sich ca. 90 % des im Organismus vorhandenen Bleis als Bleiphosphat im Skelett. Dabei verlaufen Einbau und Mobilisation fast analog zum  $Ca^{2+}$ . Das bedeutet, bei Stress, Azidose oder Fieber ist eine schnelle Lösung aus dem Knochen möglich.

Im Blut zirkuliert nur etwa 1 % des  $Pb^{2+}$ , davon ist ungefähr 90 % an die Erythrozyten gebunden. Es finden sich bei einer Bleivergiftung im Plasma durchaus Konzentrationen freier Ionen im Bereich von 0,1  $\mu M$  (46; 86; 175).

Für Europäer sind Normwerte für den Bleigehalt im Blut (0,3  $\mu g/ml$ ), Harn (0,03  $\mu g/ml$ ), Gehirn (0,1 mg/kg) und Knochen (20 mg/kg) festgelegt worden (153). Die Elimination geschieht über die Niere (75 %), fäkal (15 %). Über Haare, Nägel und Schweiß können bis zu 10 % ausgeschieden werden.

Ein verlässliches Kriterium für Blei-Gefährdung ist der Spiegel im Blut. Der Leitwert (MAK-Werte-Liste 2005) liegt bei 400  $\mu g Pb/L$  Blut (156).

### 1.6.4. Chemische und physikalische Eigenschaften

Blei ist ein metallisches Element der vierten Hauptgruppe und steht im Periodensystem auf Platz 82. Frische Schnittflächen imponieren bläulich glänzend.

Aufgrund seiner Weichheit lässt sich Papier durch Blei dunkel anfärben. Daher war es früher in Bleistiften enthalten. Die heute verwendeten Bleistifte enthalten Gemische aus Graphit. Die Elastizität des Schwermetalls ist sehr gering, die Dehnbarkeit dagegen groß (Zugfestigkeit 1-2 kg/mm<sup>2</sup> Querschnitt) (156).

Wie viele mehrwertige Schwermetalle, neigt es zur Komplexbildung und bindet so an katalytische Zentren von Enzymen, wobei es häufig zur Enzyminhibition kommt (98).

### **1.6.5. Toxizität**

Man kann differenzieren zwischen akuter und chronischer Bleivergiftung. Da anorganische Bleiverbindungen relativ schlecht im Darm resorbiert werden können, ist die akute Bleikrise seltener.

#### **1.6.5.1. Akute Vergiftung - Bleikrise**

Die ersten Krankheitssymptome treten bei Konzentrationen im Gesamtblut ab 1 µg Pb/ml auf. Es kommt zu charakteristischen Koliken und Spasmen im Gastrointestinaltrakt. Zusätzlich sind neurologische Symptome (Schlaflosigkeit, Apathie, Stupor, Aggressivität u. a.), Bleienzephalopathie (mit motorischen und sensorischen Störungen) und Bleilähmung der Arme, bis hin zum Tode beschrieben (146; 153).

Blei ist zudem plazentagängig. Daher werden mögliche Risiken für die gesunde Entwicklung des Fetus diskutiert (17; 166). Es kann zu Fehl- oder Frühgeburten kommen. Problematische Schwangerschaften (charakterisiert durch Anämie, arterielle Hypertonie, Übelkeit) und erniedrigtes Geburtsgewicht können mit erhöhten Bleispiegeln im Blut der Schwangeren assoziiert sein (99).

### 1.6.5.2. Chronische Bleivergiftungen

Chronische Bleivergiftungen treten wesentlich häufiger auf und sind aufgrund der meist schleichenden Symptomatik besonders anfänglich schwer zu diagnostizieren. Die regelmäßige Aufnahme geringer Mengen Blei schädigt vor allem drei Organsysteme: die glatte Muskulatur, das motorische Nervensystem und die Erythropoese. Die pathophysiologischen Mechanismen sind bisher jedoch nur bei der Erythropoese geklärt.

Klinische Erscheinungen sind ein subikterisches Kolorit, charakteristischer Bleisaum an der Gingiva (Zahnfleisch), welche auf eine Reaktion von  $Pb^{2+}$  mit  $H_2S$  der Bakterien im Mundraum zurückzuführen ist (98), Appetitlosigkeit und Anämiezeichen (153). Des Weiteren sind noch reduzierte Lernfähigkeit bei Kindern (155) und verminderte Fruchtbarkeit bei Männern durch Schädigung der Spermien beschrieben (141).

Glatte Muskulatur:

Die Auswirkungen einer Bleiintoxikation führen meistens zu spastischen Obstipationen und imponieren als schmerzhafte Koliken. Die Symptome sind oft unspezifisch und können klinisch mit einem Gastroduodenalulkus verwechselt werden (189). Bei diffusen abdominalen Schmerzen sollte deshalb auch an eine Bleiintoxikation gedacht werden (172). Schäden an der Gefäßmuskulatur können im Bereich des Urogenitaltrakts zu Schrumpfnieren führen. Auch neurologische Symptome (Kopfschmerzen, Müdigkeit, usw.) lassen sich dadurch erklären. Spasmen an der Netzhaut können zur Erblindung führen (146).

Motorisches Nervensystem:

Es kommt zur Degeneration motorischer Nerven, vorwiegend an den oberen Extremitäten. Charakteristisch ist die Lähmung des N. ulnaris, die klinisch durch Fallhand- und Pfötchenstellung der Hand auffällt.

Erythropoese:

$Pb^{2+}$  hemmt die  $\delta$ -Aminolevulinsäure-Dehydratase. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von  $\delta$ -Aminolaevulinsäure ( $\delta$ -ALA) zum Porphobilinogen. Im Harn ist deshalb die  $\delta$ -ALA erhöht und kann als wichtiger diagnostischer Parameter hinzugezogen werden. Werte über  $0,3 \mu\text{g/ml}$  Harn deuten auf eine Bleiintoxikation hin. Dunkelfärbung des Urins und subikterische Haut sind Zeichen für die Inhibition von Korpoporphyrin III. Der Einbau von Eisen in Protoporphyrin IX wird durch Hemmung der Ferrochelatase unterbunden und als Grund für die Entstehung einer hypochromen Anämie diskutiert (153). Es ist bekannt, dass der Hämatokritwert bei erhöhten Blutbleispiegeln abnehmen kann (69). Im Blutaussstrich ist die basophile Tüpfelung charakteristisch und bekannt. Sie tritt im Gefolge einer Anämie bei erhöhten Bleiblutspiegeln auf (166).

#### **1.6.6. Therapie**

Die Bleivergiftung wird mit Chelatbildnern, wie z. B. Ca-Na<sub>2</sub>-Ethyldiamintetraessigsäure (Ca-Na<sub>2</sub>-EDTA), Penicillamin und Dicalcitol, therapiert. Dabei handelt es sich um wirkungsvolle Antidote, die mit ionisiertem, gelöstem Blei Komplexe bilden und durch symptomatische Maßnahmen ergänzt werden können (98).

Bei der Intoxikation mit Tetraethylblei sind Chelatbildner jedoch ungeeignet, es bleibt nur die symptomatische Therapie.

#### **1.7. Fragestellung der Arbeit**

Es ist noch nicht lange bekannt, dass geschädigte Erythrozyten den Membranbaustein Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche exponieren. Dadurch

können sie mit Hilfe spezifischer Rezeptoren rasch von Makrophagen verschlungen und somit aus dem Kreislauf eliminiert werden (19; 29; 30; 54).

Es wurde bereits beschrieben, dass im Verlaufe einer Bleiintoxikation, ebenso wie bei der hypochromen Eisenmangelanämie, der Hämatokrit sinkt und die Erythrozytenzahl abnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht ein Erklärungsmodell zur Entstehung von Anämien zu entwickeln.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und verschiedenen tierexperimentellen Versuchsansätzen wurden Daten akquiriert, und der Einfluss einer erhöhten Bleiaufnahme oder einer Eisenmangel-Diät auf den programmierten Zelltod der Erythrozyten untersucht. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht somit, die pathophysiologischen Mechanismen der Anämie besser verstehen und eventuelle Zusammenhänge mit der erythrozytären Apoptose aufdecken zu können.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Erythrozyten

#### 2.1.1. Aufbereitung von Erythrozyten

Für die Versuche wurden uns freundlicherweise Blutkonzentrate von gesunden Probanden, die sich freiwillig zur Blutspende entschlossen hatten, zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft und genehmigt. Die Erythrozytenkonzentrate erhielten wir von der Blutbank der Universität Tübingen. Für die Herstellung von 500 ml Erythrozytenkonzentrat wurde ein „OptiPure RC quadruple blood pack set“ mit einem Leukozytenfilter von Baxter (Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Bei diesem Herstellungsvorgang wurden 500 ml Blut automatisch mit 70 ml des CPD-Puffers gemischt (Tab. 3). Durch 10-minütige Zentrifugation bei 4795 g und 22°C wurden die einzelnen Blutkomponenten separiert und durch ein Abpressmanöver auf die entsprechenden Blutbeutel verteilt. Dabei wurden die Erythrozyten mit SAG-M stabilisierender Lösung versetzt (Tab. 4) und durch einen integrierten Leukozytenfilter gepresst. Um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten wurden die Experimente in isotoner Kochsalzlösung und bei 37°C durchgeführt. Die gereinigten Erythrozytenkonzentrate wurden bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des CDP-Puffers

Substanz	Konzentration (mg/ml)
Zitronensäure	3,27
Natriumcitrat	26,3
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	2,5
Dextrosemonohydrat	25,5

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der SAG-M Lösung

Substanz	Konzentration (mg/ml)
NaCl	8,77
Dextrosemonohydrat	9
Adenin	0,17
Mannitol	5,25

### 2.1.2. Analyse der Reinheit der Erythrozytenkonzentrate

Die im Konzentrat enthaltene Menge an Thrombozyten wurde durch ein Blutanalysegerät (CellDyn3000; Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) automatisch gezählt. Ein bewährtes Zählermedium ist in der Lage, aufgrund der unterschiedlichen optischen und elektrischen Beschaffenheiten der Zellen, diese zu erkennen. Den Ergebnissen zufolge hat das Erythrozytenkonzentrat einen Anteil von  $2,4 \pm 0,2$  % ( $n=22$ ) der ursprünglichen Thrombozytenanzahl im Vollblut. Zusätzlich wurde die Zahl der Blutplättchen durch Zuhilfenahme einer Thiazolorange-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt (103). Dabei wurde eine Reti-Count-Lösung (Thiazole orange) von Becton Dickinson verwendet. Den Anweisungen des Herstellers gemäß wurden die Experimente an einem FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die Zellzahl im Thrombozyten-Gate der entsprechenden Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) gegen die Thiazolorange-Fluoreszenz-Intensität (FL-1H) aufgetragen und mit dem entsprechenden Softwareprogramm (Cellquest™) ausgewertet. Ebenso durch Durchflusszytometrie bestimmt wurde der Anteil der Leukozyten. Dabei wurde ein Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe eines TrueCount Kits der Firma Becton Dickinson (Heidelberg,

Deutschland) wurde die interne Normalisierung erzielt. Bei den Messungen ergaben sich Werte für die Leukozytenzahl von  $0,012 \pm 0,001$  % (n=22) des normalen Anteils im Vollblut. Die Erythrozytenkonzentrate waren somit praktisch nahezu frei von Leukozyten. Zusätzlich wurde die Anzahl der verschiedenen Blutzellen mittels eines elektronischen Hämatologie-Teilchenzählers (MDM 905, Medical Diagnostics Marx, Butzbach, Deutschland) bestimmt.

## **2.2. Verwendete Substanzen**

### **2.2.1. Ionomycin**

Der Calcium-Ionophor Ionomycin, ein Produkt der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland), wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Konzentrationen von  $0,01 \mu\text{M}$  bis  $1 \mu\text{M}$  eingesetzt.

### **2.2.2. Annexin-V-Fluos**

Der Verlust der Symmetrie der Membranphospholipide ist ein bekanntes Merkmal der Apoptose (7; 48; 66). Dabei kommt es zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (188). Dieser Mechanismus wird bei der durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen ausgenutzt. Durch die Anfärbung der Proben mit Annexin-V-Fluos können apoptotische Zellen nachgewiesen und quantifiziert werden (90; 108; 187). Annexin-V ist ein antikoagulierendes Protein, welches in der Lage ist, bevorzugt an anionische Phospholipide zu binden. Dieser Mechanismus ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Zu Phosphatidylserin existiert eine hohe Affinität (7).

Um die Annexinmenge, die eine Bindung eingegangen ist, quantifizieren zu können, wird es mit dem Fluochrom Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) chemisch gekoppelt. In den durchgeführten Experimenten wurde ein Produkt der Firma



Roche (Penzberg, Deutschland) verwendet. Im vorgefertigten Waschpuffer (s. Tab. 6) wurde es im Verhältnis 1:50 verdünnt.

### **2.2.3. Fluo 3/AM**

Das membrangängige fluoreszierende Fluo 3/AM wird von der Firma Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) hergestellt. Im Gegensatz zu anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Farbstoffen fluoresziert Fluo 3/AM erst nach Hydrolyse durch zelluläre Esterasen und anschließende Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Diese Eigenschaften machen die Bestimmung von ausschließlich intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen möglich.

### **2.2.4. Blei**

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Sigma) wurde in destilliertem Wasser gelöst (Stammlösung 10 mM) und in Konzentrationen von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  zum Einsatz gebracht.

### **2.2.5. Clotrimazol**

Clotrimazol (Sigma) ist ein Inhibitor des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals (47). Die Substanz wurde in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

### **2.2.6. CFSE**

5-Carboxy-Fluorescein Diacetate Succinyl-Ester (Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland) ist ein permanenter fluoreszierender Marker, der für die Halblebenszeitmessungen von Erythrozyten verwendet werden kann.

## 2.3. Verwendete Lösungen

### 2.3.1. Ringerlösung

Die Ringerlösung (s. Tab. 5) war die physiologische Matrix, in der die meisten Versuche durchgeführt wurden. Als Puffer diente N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2-ethan-sulfonsäure (HEPES). Die Lösung wurde mit Natronlauge (NaOH) auf pH 7,4 eingestellt. Die Osmolarität wurde mit Hilfe eines VAPRO 5520 Dampfdruck-Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) überprüft und war für 300 mOsm berechnet.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Ringerlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO <sub>4</sub>	1
HEPES	32
Glukose	5
CaCl <sub>2</sub>	1
NaOH	nach Bedarf

### 2.3.2. Annexin-Waschpuffer

Nach Inkubation der Erythrozyten bei verschiedenen Bedingungen wurden die Zellen für den Färbeporgang in einem speziellen Waschpuffer (s.Tab. 6) gewaschen, um die Annexinbindung zu ermöglichen. Nach Inkubation mit dem Annexinfarbstoff wurden die Proben auch mit diesem Puffer verdünnt (1:50). Ebenfalls pH-regulierend wirksam waren HEPES und NaOH, der Waschpuffer wurde auf den pH 7,4 eingestellt.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	140
CaCl <sub>2</sub>	5
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

### 2.4. FACS-Analyse

FACS-Analyse bedeutet ausgeschrieben „Fluorescence Activated Cell Sorting“-Analyse und ist eine Entwicklung der Firma Becton Dickinson. Die Abkürzung ist aber inzwischen ein geläufiger Begriff und steht allgemein für Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Zählung bestimmter Partikel und darüber hinaus, je nach Versuchsansatz, lässt sie Rückschlüsse auf bestimmte Eigenschaften der untersuchten Teilchen zu.

Das Prinzip beruht auf der Messung von Streulicht, das in einem Flüssigkeitsstrom, in dem sich die zu untersuchenden Teilchen nacheinander bewegen, erzeugt wird. Die Teilchen müssen durch eine dünne Messkammer und verursachen auf diese Weise, je nach Größe und Struktur, Streulicht, wenn

sie von einem Laserstrahl getroffen werden. Das FACS-Gerät kann das entstehende Streulicht in verschiedenen Winkeln messen und somit verschiedene Informationen über Beschaffenheit und Volumen der gemessenen Teilchen liefern. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) wird meistens in einem Winkel von  $0,7^\circ$  -  $10^\circ$  und das Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter, SSC) im  $90^\circ$ -Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen. Die Größe des Forward Scatters hängt vor allem von der Größe der Teilchen ab, während der Side-Scatter auch von der Binnenstruktur der Zelle und der Membranfaltung bestimmt wird (32).

Größtenteils erfasst man durch die FACS-Analyse jedoch vor allem unterschiedliche Zellspezies, die sich durch eine spezifische Präsentation von Rezeptoren oder Antigenen an der Zelloberfläche, Enzymaktivitäten oder DNS-Gehalt auszeichnen. Man benötigt spezifische Fluochrome. Die Zellen werden hierfür mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert. Somit können quantitative Aussagen sowohl über Oberflächenmoleküle, als auch über intrazelluläre Proteine getroffen werden (133).

Ein klassisches Durchflusszytometer funktioniert in der Regel folgendermaßen. Es existieren drei funktionelle Einheiten, bestehend aus einer Lichtquelle, einem hydraulischen System und einem Computer. Die Lichtquelle, meistens ein Laser, besitzt eine Messkammer mit optischer Einheit. Die Hydraulik organisiert die Passage der zu messenden Teilchen, während der Computer die elektrischen Signale auswerten kann. Werden die Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffes von dem monochromatischen Laserstrahl getroffen, erlangen die Elektronen kurzzeitig ein höheres Energieniveau, das sie schnell wieder verlassen, während sie durch den Sprung auf das alte Niveau Energie in Form von Photonen abgeben. Die Strahlung dieser Photonen wird von einem sogenannten Photomultiplier (ein Photonendetektor) erfasst und in einen elektronischen Impuls umgewandelt. Dieses Signal ist linear zur entstandenen Menge an Strahlung und deshalb auch proportional zur Menge des

gebundenen Antikörpers (133). Die Messungen werden graphisch in einem „Dot Plot Histogramm“ dargestellt, jeder abgebildete Punkt korreliert hierbei mit einem Messwert.

Im Physiologischen Institut der Universität Tübingen wird ein FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Gerät enthält einen luftgekühlten Argonlaser der Wellenlänge 488 nm (blau) und einen zusätzlichen Diodenlaser, der Farben im roten Spektralbereich (635 nm) messbar macht. Die Ausstattung macht die Erfassung von vier unterschiedlichen Farben möglich. Die Flussgeschwindigkeit durch die Messkammer beträgt 6 m/s. Um die unterschiedlichen Wellenlängen des emittierenden Lichtes bestimmen zu können, werden Interferenzfilter verwendet. Dadurch werden die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren jeweils verschiedenen Kanälen zugeteilt. In der Regel sind das für 515 - 545 nm (grün) der Fluoreszenzkanal „FL1“, für 564 - 606 nm (gelb) „FL2“, für >670 nm (rot) „FL3“ und für Wellenlängen von 653 - 669 nm (rot) „FL4“ (167).

Die Datenerfassung und anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Macintosh-Computers, der mit der Cell Quest Research Software ausgestattet war. Das Zellvolumen der gemessenen Erythrozyten wurde durch die Messung des Forward Scatters (FSC) quantifiziert. Der Forward Scatter zeigt für Erythrozyten eine gute Übereinstimmung mit der Volumenbestimmung mittels manueller Hämatokrit-Messung zum Nachweis der Phosphatidylserinexposition (138).

Die Intensität des Fluochroms Annexin-V-Fluos (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 530 nm), das als Farbstoff bei den Experimenten diente, wurde in FL1 gemessen. Die FSC-Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Dabei wurden 20 000 Zellen pro Probe durch das Gerät erfasst und gemessen.

### **2.4.1. Durchführung einer FACS-Analyse**

Nach Inkubation der Proben bei 37°C im Brutschrank wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in 1 ml Annexin-Waschpuffer in einer Zentrifuge (Sorvall RT 6000B, Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland) 5 min bei 3600 rpm zentrifugiert. Danach folgte der Vorgang des Anfärbens mit Annexin-V-Fluos. Dafür wurde das Annexin-V-Fluos im Verhältnis 1:50 im Annexin-Waschpuffer gelöst, und 100 µl der Färbelösung auf das Erythrozytenpellet gegeben und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf schloss sich ein Verdünnungsvorgang der Proben mit Annexin-Waschpuffer im Verhältnis von 1:5 an, um sie danach am FACS-Calibur (Becton Dickinson) vermessen zu können (FL1, FSC).

## **2.5. Ca<sup>2+</sup>-Messungen**

### **2.5.1. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen mit Fluo 3/AM**

Mit Hilfe der FACS-Analyse kann auch die Menge des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> ermittelt werden. Dazu wurde die Methode nach Andrews gewählt (8). Die Zellen werden bei dieser Anwendung mit dem Fluo 3/AM Farbstoff (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) angereichert.

- Inkubation von 1 ml einer Erythrozytensuspension (0,16 % Hämatokrit verdünnt in Ringerlösung) mit 2 µl einer Fluo 3/AM Stammlösung (2,0 mM in Dimethylsulfoxid DMSO) bei 37°C für 15 min unter Schütteln und Lichtausschluss.
- Anschließend wurden erneut 2 µl der Fluo 3/AM-Stammlösung in die Proben pipettiert und nochmals 25 min lang inkubiert.
- Die mit Fluo 3/AM angereicherten Erythrozyten wurden dann bei 22°C für 5 min zentrifugiert (1000 g) und anschließend zweimal mit Ringerlösung,

die 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA) enthielt (Sigma), danach einmal mit Ringerlösung gewaschen.

- Für die Messung am FACS-Gerät wurden die Fluo 3/AM beladenen Erythrozyten in 1 ml Ringerlösung (0,16 % Hämatokrit) resuspendiert und eine Probe als Positivkontrolle mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin (1  $\mu\text{M}$ ; Sigma) versetzt und bei 37°C inkubiert.
- Zuletzt wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fluoreszenzintensität im Kanal FL1 bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

### 2.5.2. Radioaktive $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Messungen

Um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Erythrozyten zu messen, wurden Versuche mit radioaktivem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt. Die dazu verwendete Methode wurde aus der Literatur entnommen (119; 184) und für Mauserythrozyten im Labor etabliert.

Versuchsdurchführung:

- Die Erythrozyten wurden 4-mal durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g gewaschen und anschließend im Verhältnis 1:5 in einer Calcium-bindenden Lösung A (pH 7,5; s. Tab. 7) resuspendiert, um extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zu entfernen.
- Danach wurde das Zellpellett 2-mal in Lösung B (pH 7,5) gewaschen (bei 2000 g für 5 min). Dieser Arbeitsschritt diente der Elimination des in Lösung A enthaltenen EGTA (Lösung B, s. Tab. 8).
- Schließlich wurden die Erythrozyten auf einen Hämatokrit von 10 % mit Lösung C (pH 7,5; s. Tab. 9) verdünnt und für 20 min bei 37 °C vorinkubiert.
- Als nächstes wurde das radioaktive  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  unter Verwendung einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung hinzugegeben. Die spezifische Aktivität betrug  $10^7$  cpm/ $\mu\text{mol}$ , so dass eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht wurde.

- Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden jeweils 100  $\mu$ l Zellsuspension zu 0,7 ml der 4°C kalten Lösung C gegeben und 0,2 mM  $\text{CoCl}_2$  hinzugefügt.
- Anschließend wurden die Proben für 30 s bei 10.000 g und 4°C in einer Tischzentrifuge der Firma Eppendorf zentrifugiert und das entstandene Pellett zweimal in jeweils 1 ml der Lösung C gewaschen.
- Nach Absaugen des Überstandes wurden durch Zugabe von jeweils 0,7 ml einer 6 %igen Trichloressigsäure die Erythrozyten lysiert und die Proteine denaturiert.
- Erneut wurden die Proben für 10 min bei 14.000 g zentrifugiert und dann die Radioaktivität des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  im Überstand mit einem  $\beta$ -Szintillationszähler der Firma Wallac (Freiburg, Deutschland) gemessen.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Lösung A

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	70
KCL	80
$\text{MgCl}_2$	0,2
EGTA	0,1
HEPES	10

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Lösung B

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	70
KCL	80
$\text{MgCl}_2$	10
HEPES	0,2



**Tabelle 9:** Zusammensetzung der Lösung C

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	70
KCL	80
MgCl <sub>2</sub>	0,2
Inosin	10
Na-ortho-Vanadat	1
HEPES	10

## 2.6. Lichtmikroskopie

Der Effekt von Blei auf die Annexinbindung bei Erythrozyten wurde zusätzlich mit der Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (191). Nach 24-stündiger Bleiexposition in aufsteigenden Konzentrationen (0; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{M}$  in Ringer-Lösung) wurden die Erythrozyten für 20 min in Annexin-Waschpuffer inkubiert (im Verhältnis 1:50), zentrifugiert, resuspendiert und bei 37°C für 10 min in einer modifizierten Ringerlösung (s. Tab. 10) erneut inkubiert.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Ringerlösung für die Lichtmikroskopie

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	145
KCl	5
Glukose	5
CaCl <sub>2</sub>	1,6
MgCl <sub>2</sub>	0,8
HEPES-NaOH	5

Danach wurden 10 µl der Suspension auf einen Glasobjektträger aufgetropft, um dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (440/480-nm Exzitation, 535/50-nm Emissionswellenlänge, Q505LP Beamsplitter, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland; kombiniert mit einem Nikon Mikroskop, Düsseldorf, Deutschland) analysiert. Die digitalen Bilder wurden mit einem Digitalbildkamera-System (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland), welches mit der Metaview-Software ausgestattet war, aufgenommen.

## **2.7. Patch-clamp Experimente**

Die Patch-clamp-Versuche wurden in einem „Whole-cell-voltage-clamp-setting“ durchgeführt (61). Es wurden Experimente mit menschlichen und tierischen Zellen mit teilweise unterschiedlichen Konditionen durchgeführt. Die Methoden, die bei den Erythrozyten der Mäuse angewendet wurden und sich von denen mit humanen Erythrozyten unterscheiden, sind in eckige Klammern gesetzt [ ... ].

Bei den Versuchen wurden Borosilikatglaskapillaren (8 - 12 MΩ Spitzenwiderstand; GC 150 TF-10, Clark Medical Instruments, Pangbourne, UK) verwendet. Diese Kapillaren wurden auf einem Mikroprozessor getriebenen DMZ Puller (Zeitz, Augsburg, Deutschland) hergestellt und mit einem MS 314 elektrischen Mikromanipulator (MW, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) kombiniert, eingesetzt. Die Kapillaren wurden durch einen chlorierten Silberdraht mit einem EPC-9 Verstärker (Heka, Lambrecht, Deutschland) verbunden und die Ströme unter Verwendung einer Pulse Software (Heka) und eines ITC-16 Interface (Instrutech, Port Washington, N.Y, USA) aufgenommen (61). Der Widerstand der Mikroelektroden wurde stets überprüft.

Die Erythrozyten wurden bei den beschriebenen Experimenten bei Raumtemperatur auf ein Haltemembranpotenzial ( $V_h$ ) von -10 mV [-30 mV] eingestellt und 400 ms lange Pulse von -100 mV bis +100 mV [-100 mV bis

+80 mV] in Schritten von 20 mV appliziert. Die Ganzzellströme wurden ohne Filterung aufgenommen (Akquisitionsrate 5 kHz [1 kHz]). Die Ergebnisse wurden durch Mittelwertbildung der gemessenen Ströme zwischen 350 und 375 ms jedes Rechteckpulses analysiert. Die Spannungen beziehen sich auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran im Vergleich zum Extrazellulärraum. Offset-Potentiale zwischen Bad- und Pipettenlösung und zwischen Badlösung und Salzbrücke (gefüllt mit NaCl) wurden nach Barry und Lynch (14) berechnet und die Daten entsprechend korrigiert. Einwärts gerichtete Ströme, definiert als Bewegung positiver Ladung von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, werden als negative Ströme bezeichnet und in den Abbildungen als Abweichungen nach unten dargestellt.

[Die Zusammensetzung der Pipettenlösung (pH 7,4) für die Experimente mit den Mauserythrozyten sind in Tabelle 11 aufgezeigt.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der Pipettenlösung für die Tierexperimente

Substanz	Konzentration (mM)
Kalium-d-Glukonat	140
NaCl	10
MgATP	1
MgCl <sub>2</sub>	1
EGTA	1
HEPES	5
NaOH	nach Bedarf

Die zu Kontrollzwecken verwendete NaCl-haltige Badlösung enthielt folgende Substanzen (s. Tab. 12).

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der NaCl-haltigen Kontrolllösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	115
MgCl <sub>2</sub>	10
CaCl <sub>2</sub>	5
HEPES	20
NaOH	nach Bedarf

Nach Erreichen der Ganzzell-Konfiguration wurde folgende Lösung in das Bad appliziert (s. Tab. 13).

**Tabelle 13:** Zusammensetzung der zu applizierenden Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
Na-Glukonat	140
CaCl <sub>2</sub>	1
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

Bei den vorstehenden Experimenten wurden die roten Blutkörperchen der anämischen und der gesunden Tiere verglichen.]

Nach Erhalten der Ganzzell-Konfiguration wurde für die Versuche mit humanen Erythrozyten und Blei die Standard-NaCl-Badlösung mit Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1-10 µM) angereichert und durch schnelle Perfusion in die Patch-clamp Kammer gegeben. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> wurde in destilliertem Wasser gelöst und eine

Stammlösung von 10 mM hergestellt. Die Lösungen, welche für die Versuche mit Blei verwendet wurden, unterschieden sich von den bereits beschriebenen. In den Tabellen 14, 15 und 16 wird die Zusammensetzung aufgeführt.

**Tabelle 14:** Zusammensetzung der Pipettenlösung für die Experimente mit Blei

Substanz	Konzentration (mM)
K-Glukonat	80
KCl	60
MgATP	1
MgCl <sub>2</sub>	1
EGTA	3
CaCl <sub>2</sub>	2
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

**Tabelle 15:** Zusammensetzung des Na-Bades

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	115
MgCl <sub>2</sub>	10
CaCl <sub>2</sub>	5
HEPES	20
NaOH	nach Bedarf

**Tabelle 16:** Zusammensetzung des KCl-Bades

Substanz	Konzentration (mM)
KCl	140
CaCl <sub>2</sub>	1
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

## 2.8. Tierexperimente

Die Tierexperimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von den örtlichen zuständigen Behörden (Antragsnummer PY 8/03) überprüft.

Mäusen vom Typ C57BL/6 (männl, 4 Monate alt) wurde entweder eine Kontrolldiät (Inhalt: Eisen 180 mg/kg Futter, Protein: 17 %, Fett: 5 %, hergestellt von Altromin, Lage, Deutschland) oder eine eisenarme Diät (Eisengehalt: < 10 mg/kg Futter, ansonsten identisch mit der Kontrolldiät (für weitere Information: Altromin C1038) über zehn Wochen gefüttert.

Die Erythrozyten wurden durch retroorbitale venöse Punktion mit Hilfe einer Na-Heparin-beschichteten Einmal-Kapillarpipette (75 µl, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland) gewonnen. Die Versuche wurden bei 37°C in Ringerlösung (s. Tabelle 5) durchgeführt. Die Osmolarität wurde für bestimmte Experimente durch Zugabe von Sucrose (400 mM) erhöht, bei anderen Versuchsansätzen wurden NaCl, KCl und CaCl<sub>2</sub> durch die entsprechenden Glukonatsalze ersetzt. Um die Energiedepletion zu untersuchen, wurde in den entsprechenden Lösungen auf die Glukose verzichtet.

Die Annexin-Messung wurde mit den Erythrozyten der Mäuse äquivalent zu den bereits beschriebenen durchgeführt. Einzig die Inkubationszeiten unterschieden sich. Diese entsprach bei den Mäuseerythrozyten in den Versuchsansätzen lediglich zwölf Stunden.

### **2.8.1. Bestimmung der Halbwertszeit von Mäuseerythrozyten**

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um feststellen zu können, ob die geschädigten Zellen tatsächlich schneller aus dem Blutkreislauf eliminiert werden, als gesunde. Das Prinzip soll nun kurz erklärt werden. Wir entnahmen gesunden und kranken Tieren (normo- und hypochrome Stoffwechsellage) Blut, färbten die Erythrozyten mit einem langlebigen Farbstoff an und injizierten sie unbehandelten Mäusen (C57BL/6). Daraufhin folgten regelmäßige Blutentnahmen, um den prozentualen Anteil der CFSE-gefärbten Erythrozyten im Blut am FACS-Calibur bestimmen zu können. Im Folgenden wird die Methode detailliert dargestellt:

- den Tieren wurde durch retroorbitale venöse Punktion ~200 µl Blut mit einer Kapillarpipette in ein EDTA-Blutabnehmeröhrchen (1 ml) entnommen
- Aufbereitung der Erythrozyten durch Zentrifugation in Ringerlösung (800 µl) (5 min, 3600 rpm; in einer Sorvall RT 6000B Zentrifuge, Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
- Anfärbung mit Carbofluoreszein-Diacetat Succinimidyl-Ester (CFSE; Molecular Probes, Leiden, Niederlande), wofür die Erythrozyten für weitere 10 min bei 37°C in einer phosphatgepufferten Saline-Lösung (PBS), die CFSE (50 µM) enthielt, inkubiert wurden
- das nicht gebundene CFSE in der Lösung wurde durch Waschen mit Ringerlösung (siehe oben) entfernt
- das Pellet der fluoreszierenden Erythrozyten wurde in vorgewärmtem PBS wieder in Lösung gebracht und so über die Schwanzvene den gesunden C57BL/6 Tieren (weibl, 4-monatig, Charles River) injiziert

- die Kontroll-Blutabnahmen erfolgten, ebenfalls durch periorbitale Punktion, in einwöchigem Abstand
- für die Messung am FACS-Calibur wurde der Inhalt einer entnommenen Kapillare in 500 µl PBS verdünnt und dann gemessen

### **2.8.2. Analyse der Blutbildparameter**

Die Dichte der Erythrozyten, mittleres korpuskuläres Zellvolumen, Hämatokrit, Thrombozytenzahl, Leukozyten, Hämoglobin und mittleres korpuskuläres Hämoglobin wurden mit Hilfe eines elektronischen Hämatologie-Partikel-Zählers (Typ MDM 905) von Medical Diagnostics Marx (Butzbach, Deutschland), der mit einer photometrischen Einheit ausgestattet war, bestimmt.

### **2.8.3. Bestimmung der Retikulozytenzahlen**

Um die Retikulozyten der Mäuse bestimmen zu können, wählten wir folgende Methode. Nach retroorbitaler Blutentnahme wurden 5 µl Vollblut zu 1 ml Reti-Count (Thiazole Orange), hergestellt von Becton Dickinson, gegeben. Die Proben wurden 30 min lang lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die FACS-Analysen nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und die Intensität des Thiazole-Orange (im FL-1 Kanal) wurden an einem FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson gemessen. Schließlich wurden die Reti-Count-gefärbten Zellen bestimmt und die relative Anzahl an Retikulozyten als prozentualer Anteil der gezählten Erythrozytenpopulation berechnet. Die Berechnungen von den FSC versus SSC dot plots bewältigte die CellQuest Software.



#### **2.8.4. Annexinbindung nach Inkubation in Cl<sup>-</sup>- und Glukose-freier Lösung**

Die Versuche unterschieden sich nur in der Inkubationszeit von den Experimenten mit humanen Zellen. Für alle Bedingungen, also für Energiedepletion, Cl<sup>-</sup>-Wegnahme und hypertones Umfeld, betrug die Dauer 12 Stunden. Die Annexinanfärbung wurde, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, durchgeführt.

#### **2.9. Statistik**

Aus den gemessenen Daten wurde das arithmetische Mittel sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Dabei gibt „n“ die Anzahl voneinander unabhängiger Messungen an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des gepaarten oder ungepaarten t-Tests beim Vergleich von zwei Experimenten, bzw. mit dem ANOVA-Test (Analysis of Variance) beim Vergleich mehrerer Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden nur p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

### 3. ERGEBNISSE

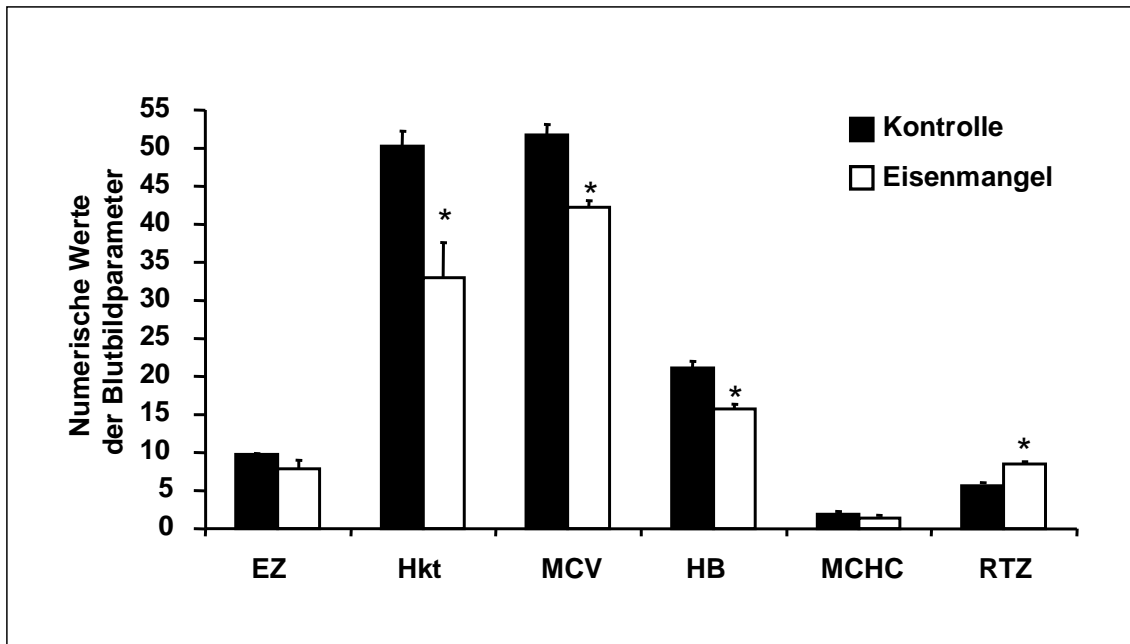
#### 3.1. Analyse der Blutbildparameter im Tierexperiment

Experimente mit C57/BL6 Mäusen fungierten als Modell für die humane Eisenmangelanämie. Diese wurde durch Fütterung von ausschließlich eisenarmer Diät induziert (< 10 mg Eisen pro kg Futter). Als Kontrolle dienten Tiere, die eine Kontrolldiät (180 mg Eisen pro kg Futter) gefüttert bekamen. In der Tat führte die diätetische Futtermaßnahme kombiniert mit regelmäßigen Blutentnahmen zu folgenden Blutbildveränderungen:

- Abnahme des Hämoglobingehalt (MCH)
- Abnahme des Hämatokrits (Hkt)
- Abnahme des mittleren korpuskulären Volumens (MCV)

Die Abnahme der Blutwerte im peripheren Blut der eisenarm ernährten Mäuse war statistisch signifikant im Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrolltiere (Abb. 7).

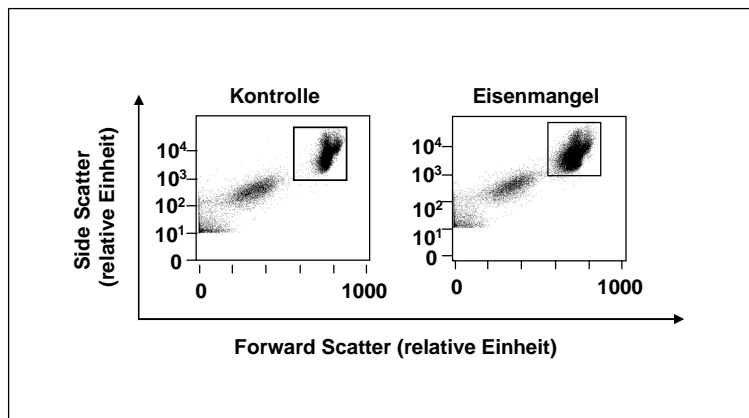
Das MCV nahm, signifikant von  $51,8 \pm 1,4$  fl (n=8) bei den Kontrollen auf  $45,8 \pm 1,0$  fl (n=8) bei den anämischen Mäusen ab. Die Hämoglobinkonzentration (Hb) im Blut sank bei den Kontrollen von  $21,1 \pm 0,9$  g/dl (n=8) auf  $15,8 \pm 0,7$  g/dl (n=8) bei den eisenarm ernährten Tieren. Der Hämatokrit (Hkt) wurde in den Messungen der Kontrollzellen von  $50,3 \pm 1,9$  % (n=8) auf  $33,0 \pm 4,7$  % (n=8) bei den Eisenmangelmäusen reduziert, während sich die Retikulozytenzahl (RTZ) von  $5,7 \pm 0,2$  % (n=8) bei den Kontrolltieren auf  $8,5 \pm 0,2$  % (n=4) bei den eisenarm ernährten Mäusen signifikant erhöhte. Die Retikulozyten wurden mittels Durchflusszytometrie detektiert (Abb. 7; 8; 9).



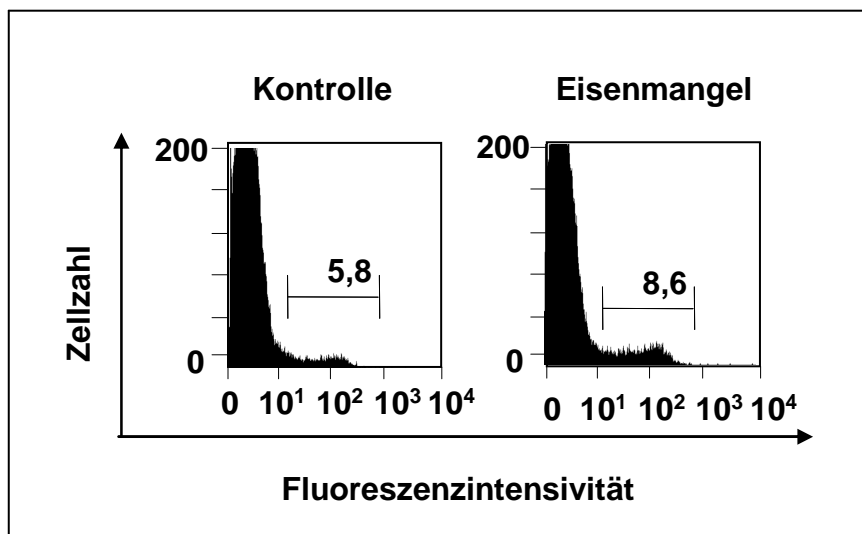
**Abbildung 7:** Analyse der Blutbildparameter

Die pathologischen Veränderungen im Blutbild der eisenarm ernährten Mäuse (weiße Balken) sind gegen die Werte der Kontrollgruppe (schwarze Balken) aufgetragen. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der numerischen Werte (EZ = Erythrozyten in  $10^6$  Zellen/ $\mu$ l, Hkt = Hämatokrit in %, MCV = mittleres korpuskuläres Volumen in fl, HB = Hämoglobin in /ml, MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration in pg/Erythrozyt, RTZ = Retikulozyten in %) wurden gebildet und als Diagramm veranschaulicht. \* markiert jew. den signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (ungepaarter t-Test;  $p \leq 0,05$ ).

Wir konnten eine tendenzielle Abnahme der roten Blutkörperchen und des mittleren korpuskulären Hämoglobingehalts (MCHC) feststellen, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 7). Die gemessenen Werte entsprechen erwarteten Befunden einer mikrozytären, hypochromen Anämie, die klassische Folgeerkrankung eines manifesten Eisenmangels (ausgenommen die Erhöhung der Retikulozytenzahl).



**Abbildung 8:** Forward / Side Scatter-Analyse des peripheren Blutes in der Durchflusszytometrie. Die Kästchen markieren die Erythrozytenpopulation, während die kleinen Thrombozyten klar abgrenzbar bei niedrigeren Forward Scatter-Werten erscheinen.

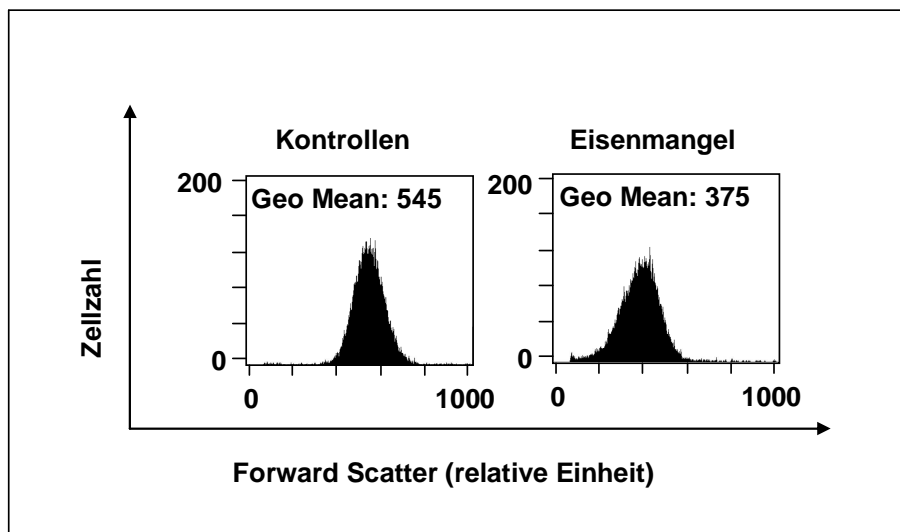


**Abbildung 9:** Retikulozytenbestimmung mit Hilfe von Thiazole-Orange

In den Histogrammen ist auf Seiten der Kontrollen die Anzahl Thiazole-Orange-positiver Zellen deutlich geringer. Die Menge der positiven Zellen ist äquivalent für die Anzahl der Retikulozyten. Im rechten Bild sind folglich mehr Retikulozyten vorhanden.

### 3.2. Forward Scatter Ergebnisse

Das Zellvolumen eisenreicher und eisenarmer Erythrozyten wurde nach Durchführung von FACS-Analysen verglichen. Diese zeigten, dass die Erythrozyten der eisenarm ernährten Tiere signifikant kleiner waren als die der Kontrollgruppe (Abb. 10). Die Analyse der Forward Scatter-Werte (FSC) wurde als Vergleichsparameter herangezogen.

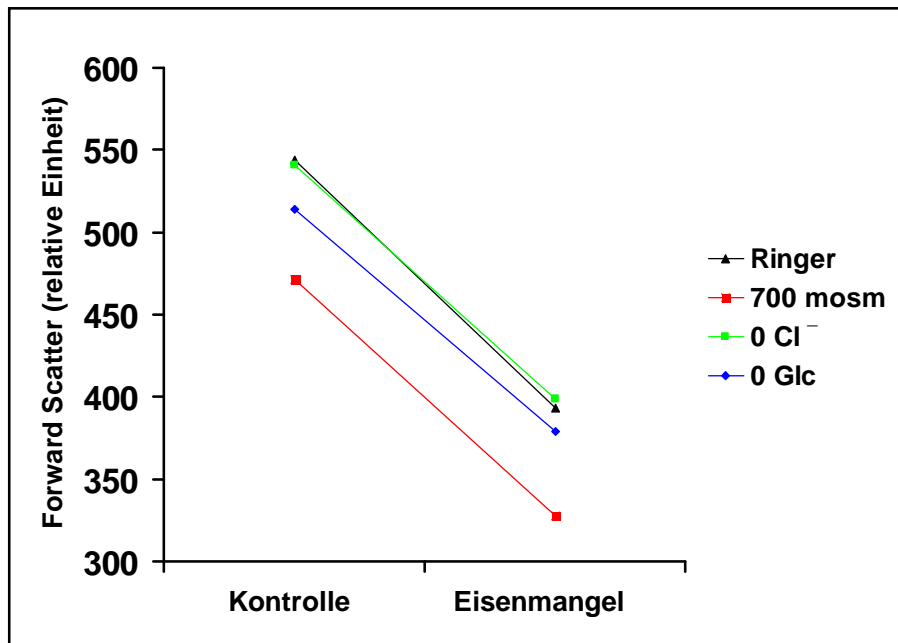


**Abbildung 10:** Histogramme des Forward Scatters

Abgebildet sind die Forward Scatter-Histogramme der beiden Gruppen gemessen nach 12-stündiger Inkubation in Ringerlösung.

Der Forward Scatter der nicht gestressten Erythrozyten erreichte Werte bis  $544 \pm 2$  bei den Kontrolltieren, die Werte der Eisenmangeltiere lagen dagegen bei  $393 \pm 6$  (jew.  $n=8$ ). Der Forward Scatter nahm in beiden Gruppen deutlich ab, nach osmotischem Schock (bis  $471 \pm 4$  bei den Kontrollen und bis  $328 \pm 7$  (jew.  $n=8$ ) bei den anämischen Mäusen), nach Energiemangel durch Glukosedepletion (bis  $514 \pm 3$  ( $n=8$ )) bei den Kontrollen und bis  $379 \pm 7$  ( $n=8$ ) bei den behandelten Tieren). Die Vergleichswerte zwischen Kontrollgruppe und Eisenmangelmäusen erreichten statistische Signifikanz bei allen Bedingungen. Die Erythrozyten der anämischen Tiere waren stets kleiner als die der

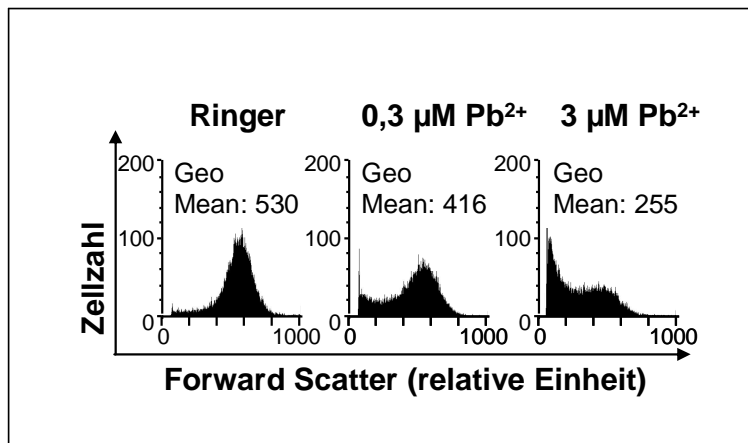
Kontrollgruppe (Abb. 11). Die Forward Scatter-Daten bestätigten somit die Werte aus der konventionellen Blutbildanalyse (Erniedrigung des MCV).



**Abbildung 11:** Forward Scatter der Erythrozyten nach zellulärem Stress

Es wurde der arithmetische Mittelwert der Ergebnisse gebildet (n=8). Der Unterschied der Zellvolumina zwischen beiden Gruppen Kontrolle und Eisenmangel war in den jeweils verschiedenen Lösungen signifikant. ( $p < 0,05$ ; ANOVA, zweifaktorielles Modell).

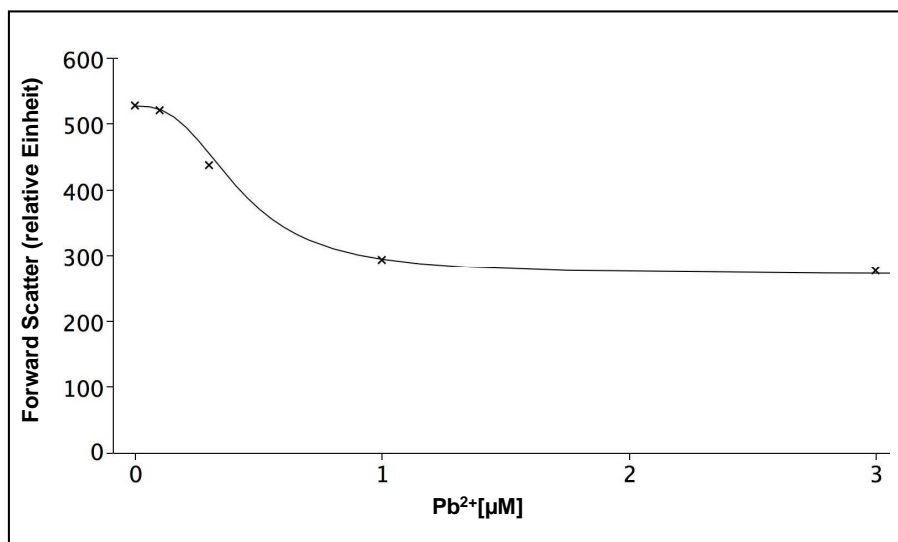
Auch Bleiexposition führte zu deutlich reduzierten Zellvolumina (die Experimente wurden mit humanen Erythrozyten durchgeführt). Dies konnte durch die Auswertung der Forward Scatter am FACS demonstriert werden. Die Erythrozyten waren nach 24-stündiger Inkubation mit Blei signifikant kleiner als die der Kontrollen (Abb. 12). Nach 24-stündiger Inkubation mit Blei (1  $\mu\text{M}$ ) nahm der FSC von  $527,7 \pm 13,0$  auf  $276,8 \pm 10,7$  (jew. n=10) ab.



**Abbildung 12:** Histogramme des Forward Scatters nach Bleiexposition

Zu sehen sind die FSC nach Inkubation mit Blei 0 - 3 µM, 24h. Die Abnahme des Geo Mean geht mit der Abnahme des Zellvolumens einher.

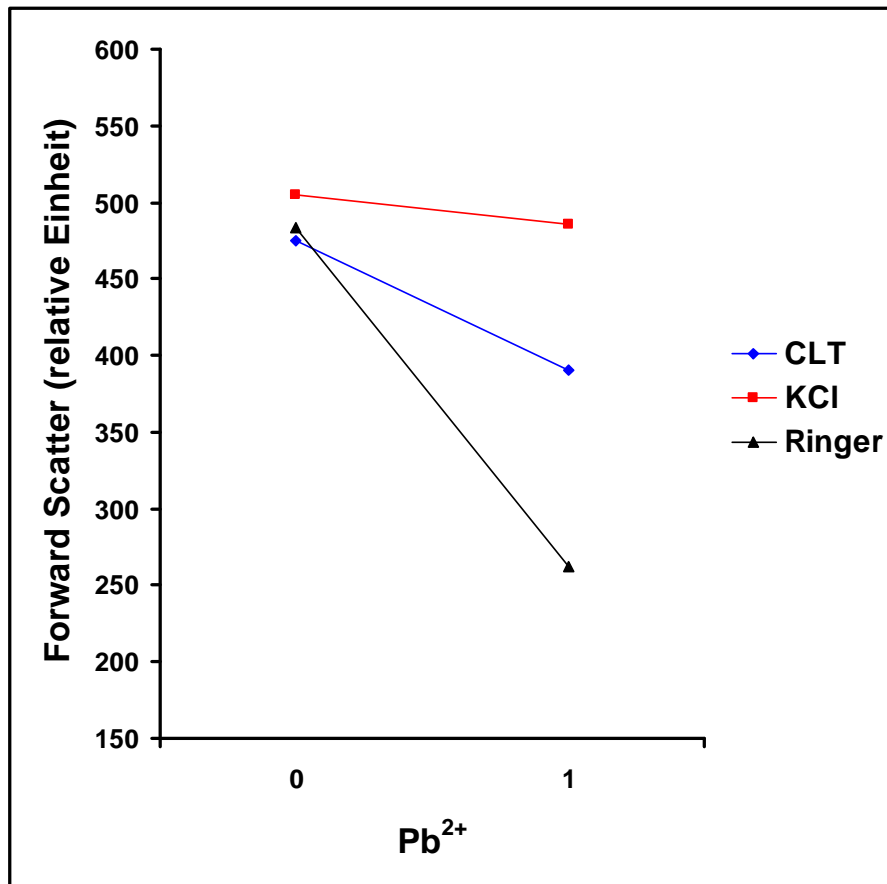
Durch die Berechnung einer Dosiswirkungskurve konnte die Halbmaximalkonzentration ( $D_{50}$ ) eruiert werden (Abb. 13). Diese lag bei ca. 0,43 µM Blei.



**Abbildung 13:** Dosiswirkungskurve der Bleiwirkung auf den Forward Scatter

Aufgetragen sind die FSC-Ergebnisse (x) nach 24-stündiger Bleiexposition mit aufsteigenden Konzentrationen (arithmetischer Mittelwert,  $n=8-10$ ). Die Kurvenanpassung erfolgte durch Berechnung einer Hill-Funktion (Maximalwert  $A=527,24$ ; asymptotischer Wert  $B=271,16$ ; Steigungsparameter  $c=2,68$ ; Halbmaximalkonzentration  $D_{50}=0,43$ ).

Der Effekt von Blei auf den Forward Scatter und damit auf das Zellvolumen ließ sich durch eine Konzentration von 125 mM  $K^+$  extrazellulär, ebenso wie durch die Zugabe von Clotrimazol (2  $\mu$ M), signifikant verringern (Abb. 14). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von  $K^+$ -Kanälen bei der Blei-induzierten Erythrozytenschumpfung hin.



**Abbildung 14:** Extrazelluläres  $K^+$  (150 mM) und Clotrimazol (2  $\mu$ M) hemmen die Blei-induzierte Volumenabnahme.

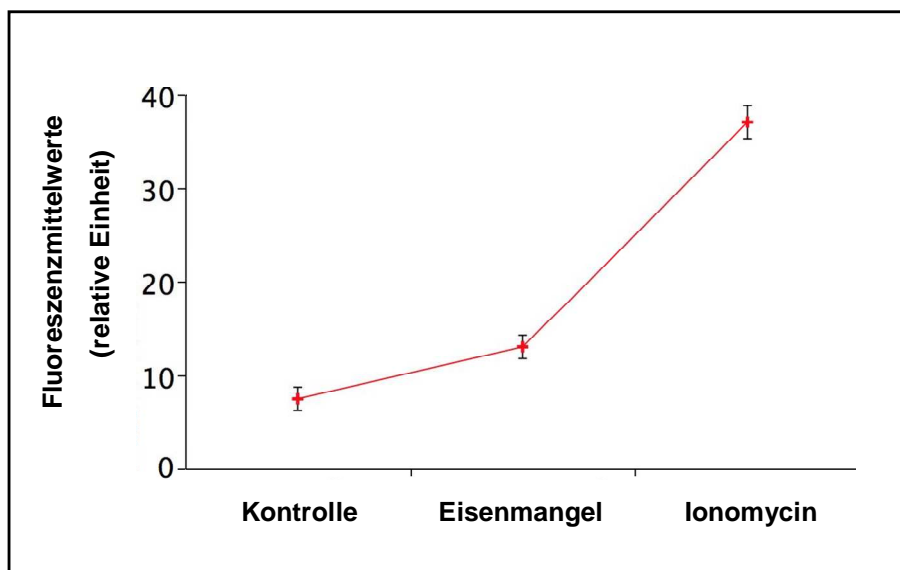
Darstellung (arithmetisches Mittel) der Hemmung des Blei-Effektes durch Clotrimazol (CLT) und hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen (KCl). Die Symbole demonstrieren die Größe der Zellen in Ringerlösung (▲), Ringerlösung mit CLT (●) und KCl-Lösung (■) (jew. links,  $Pb^{2+}$  0  $\mu$ M) und deren Volumenabnahme durch die Zugabe von Blei (jew. rechts,  $Pb^{2+}$  1  $\mu$ M). Hier wird der inhibitorische Effekt von CLT und KCl deutlich, betrachtet man die geringere Volumenabnahme der Erythrozyten in diesen beiden Lösungen im Vergleich zum Ringermedium. ( $p < 0,05$ , ANOVA).



### 3.3. Ca<sup>2+</sup>-Messungen

#### 3.3.1. Fluo 3/AM

Da die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Aktivität entscheidende Bedeutung bei der Regulation der erythrozytären Apoptose einnimmt, haben wir den Einfluss von Eisenmangel und Blei auf das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> gemessen. Die Messungen, bei denen, mit Ca<sup>2+</sup>-sensitivem Fluo 3/AM-Fluoreszenzfarbstoff beladene, Zellen im FACS analysiert werden, zeigten, dass die Erythrozyten der an Eisenmangel erkrankten Mäuse, verglichen mit den Kontrolltieren, eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aufwiesen. Die durchschnittliche Fluoreszenz war von  $7,5 \pm 0,5$  (n=4) bei den Kontrollzellen auf  $13,0 \pm 0,5$  (n=4) bei den anämischen Mäusen signifikant erhöht (Abb. 15).

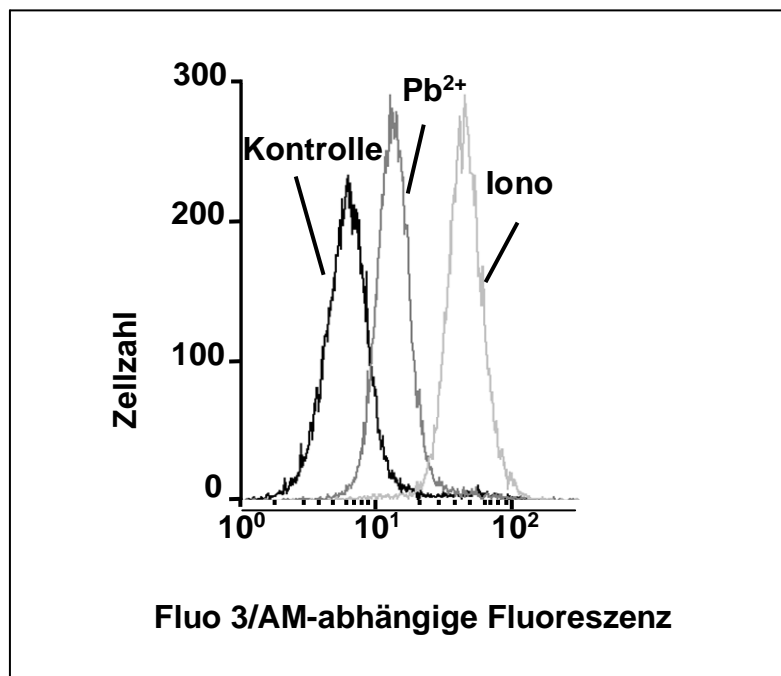


**Abbildung 15:** Fluo 3/AM-Fluoreszenz

Zu sehen sind die arithmetischen Mittelwerte (95% Konfidenzintervall der Kontrollen von 6,9 - 8,0; bei Eisenmangel von 12,5 bis 13,5; bei Ionomycin von 36,3 bis 37,8; n=2-4) der Fluo 3/AM-Fluoreszenz, die bei den Eisenmangelerythrozyten und nach Ionomycinbehandlung erhöht sind. ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Das Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin (1µm) fungierte als Positivkontrolle und führte zu einer deutlichen Zunahme der Fluo 3/AM-Fluoreszenz ( $37,1 \pm 0,2$ ).

Der, durch Blei induzierte zelluläre Volumenverlust, führt zu einer Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen nicht selektiven Kationenkanals (92). Um diese Aktivität näher zu charakterisieren, wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsveränderungen nach Bleiexposition ( $1 \mu\text{M Pb}^{2+}$ , 30 min) mit Hilfe der Fluo 3/AM-Fluoreszenz gemessen. Zwischen in Ringer- und Blei-inkubierten Erythrozyten zeigten sich dabei deutliche Unterschiede (Abb. 16). Die Behandlung der Erythrozyten führte zu einer Erhöhung der Fluo 3/AM-Fluoreszenz, welche die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestätigte. Analog zu den Versuchen mit den Eisenmangelerythrozyten wurde Ionomycin als Positivkontrolle eingesetzt.

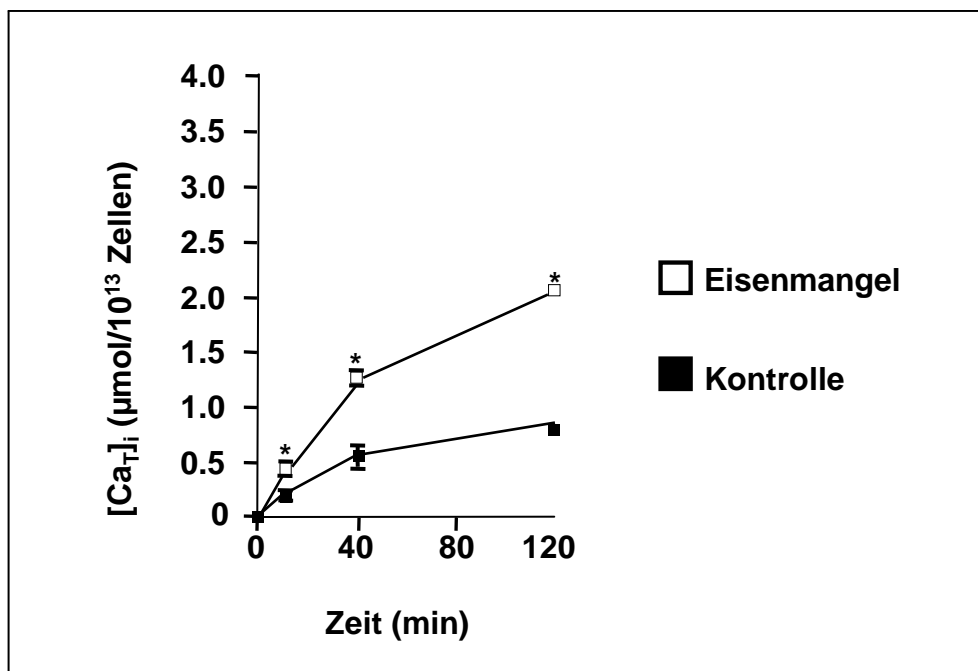


**Abbildung 16:** Fluo 3/AM-abhängige Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  
Darstellung der Histogramme Fluo 3/AM-angereicherter Erythrozyten in Ringer mit oder ohne  $\text{Pb}^{2+}$  und in Anwesenheit von Ionomycin.

### 3.3.2. Radioaktive $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen

Tracer-flux-Messungen wurden durchgeführt um herauszufinden, ob die erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität durch eine Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme hervorgerufen wird. In Abbildung 17 kann man erkennen, dass die zeitabhängige Aufnahme des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  der eisenarmen Zellen im Vergleich zu den

Kontrollerythrozyten um  $\sim 2,4$  verstärkt war. Die maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung nach der Behandlung mit Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ) war zwischen den Erythrozyten der Eisenmangelmäuse und den Kontrollerythrozyten nicht signifikant verschieden (Daten sind nicht gezeigt). Das lässt darauf schließen, dass das höhere Level des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  bei den eisenarm ernährten Mäuseerythrozyten zumindest teilweise durch eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bedingt wird.



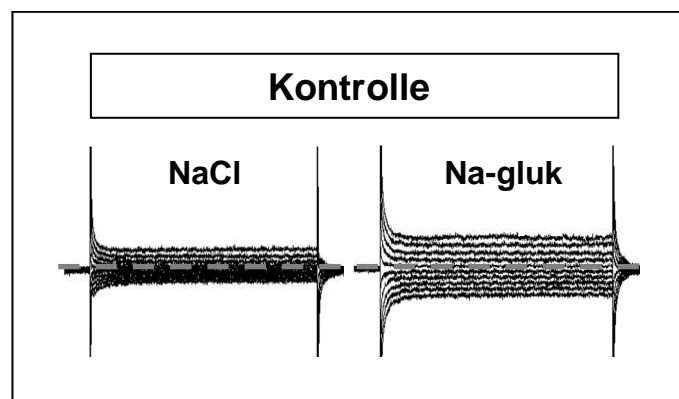
**Abbildung 17:** Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme von Eisenmangelerythrozyten  
Mittelwerte ( $\pm$  SEM,  $n=4$ ) des zeitabhängigen  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Erythrozyten der jeweiligen Gruppe (Kontrolle: schwarze Quadrate, Eisenmangel: weiße Quadrate). \* markiert die signifikante Erhöhung des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms im Vergleich zur Kontrollgruppe (ungepaarter t-Test;  $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. Patch-Clamp-Messungen

Um den Ursprung der gesteigerten Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in die hypochromen Erythrozyten genauer erklären zu können, wurde die Aktivität des  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen unselektiven Kationenkanals in den Zellen durch die Patch-Clamp

Methode analysiert (für Details siehe im Literaturverzeichnis 61). Dabei angewendet wurde die „whole-cell“-Technik (Ganzzellmethode).

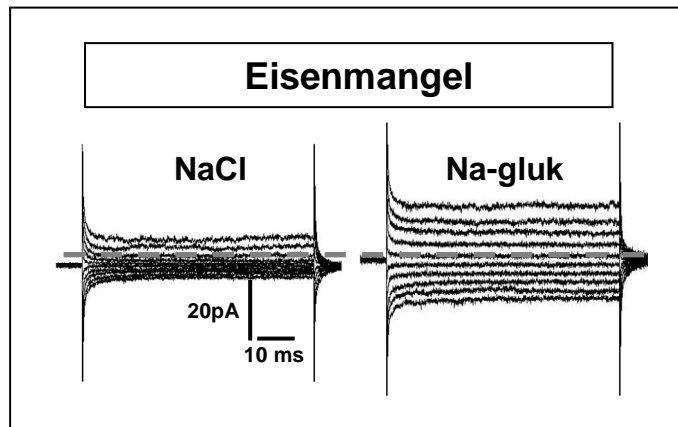
In den Kontrollzellen, sowie in den eisenarmen Zellen, war die spontane Leitfähigkeit, die durch eine Kalium-Glukonatpipettenlösung, kombiniert mit einer NaCl-Badlösung, aufgenommen wurde, sowohl in den Kontroll- als auch in den hypochromen Zellen, sehr niedrig. Die Unterschiede zwischen den Zelltypen waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 18; 19; 20; jeweils linkes Diagramm (NaCl)).



**Abbildung 18:**

Originale Ganz-Zell-Ströme einer Kontrollzelle, einmal mit NaCl- (links) und Na-Glukonat-Badlösung (rechts). Die gestrichelte Linie markiert den Nullwert des pA-Stromes.

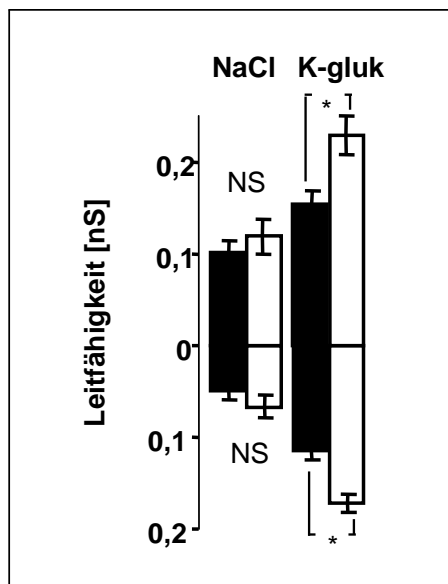
Durch den Austausch des NaCl-Bades durch eine Cl<sup>-</sup>-freie Lösung (Substitution durch Na-Glukonat) erhöhten sich die Ein- und die Auswärtsströme deutlich bei beiden Erythrozytengruppen, ohne die Umkehrpotentiale zu beeinflussen (Abb. 18, 19). Die entsprechenden Strom-Spannungs-Kurven sind in Abbildung 21 A und B zu sehen.



**Abbildung 19:** Originale Ganz-Zell-Ströme einer hypochromen Zelle

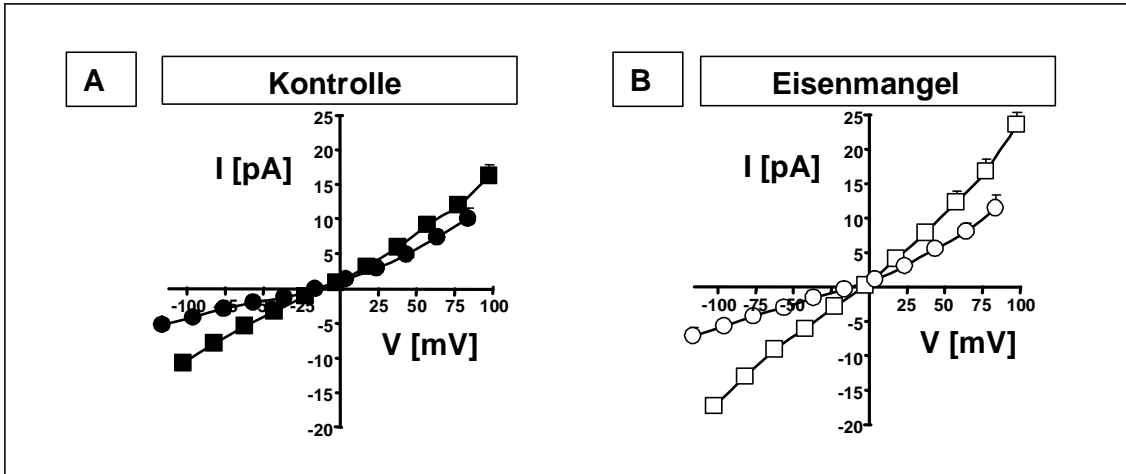
Verglichen mit Kontrollzellen (s. Abb.18) nimmt bei den Eisenmangelerythrozyten die Aktivität der Leitfähigkeit im Na-Glukonat-Bad deutlich zu. Die gestrichelte Linie markiert den Nullwert des pA-Stromes.

Die Leitfähigkeit war  $50 \pm 9$  pS für die Kontrollzellen und  $66 \pm 11$  pS für die hypochromen Erythrozyten (Abb. 20).



**Abbildung 20:**

Die mittlere Leitfähigkeit  $\pm$  SEM der Zellen wurde bei Potentialen von -100 bis +100 mV gemessen. Die schwarzen Balken stellen die Kontrollzellen (n=6), die weißen die Eisenmangelzellen (n=5) dar (gepaarter t-Test, \* steht für  $p < 0,05$ ).

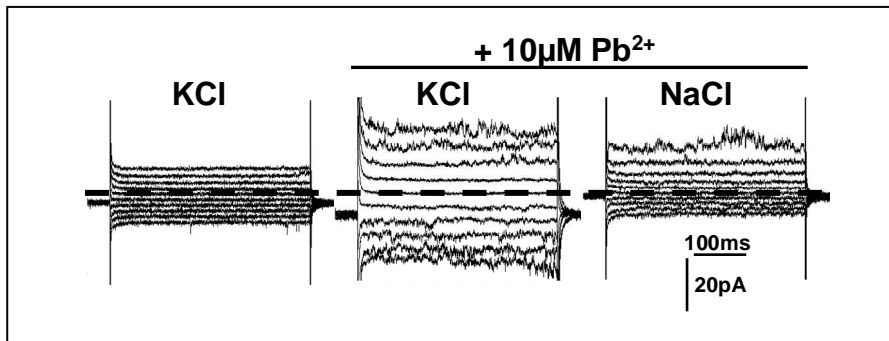


**Abbildung 21 A, B:** gemittelte Stromspannungsbeziehung

Die schwarzen Symbole stehen für die Kontroll- (A, n=6), die weißen für die Eisenmangelerythrozyten (B, n=5). Die Zellen wurden mit K-Glukonat in der Pipette und NaCl (Kreise) oder Na-Glukonat (Quadrate) in der Badlösung gemessen.

Interessanterweise induzierte die Cl<sup>-</sup>-Wegnahme eine ausgeprägte Zunahme des Einwärtsstroms bei den hypochromen Zellen verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 21 A, B). Die Leitfähigkeit erreichte  $172 \pm 9$  pS (n=5) in den hypochromen Erythrozyten, in den Kontrollzellen nur  $114 \pm 9$  pS (n=6). Dieser Unterschied war signifikant verschieden. Die Gesamtheit dieser Ergebnisse spricht für eine Zunahme der Leitfähigkeit des nicht-selektiven Kationen-Kanals in den eisenarm ernährten Mäusen.

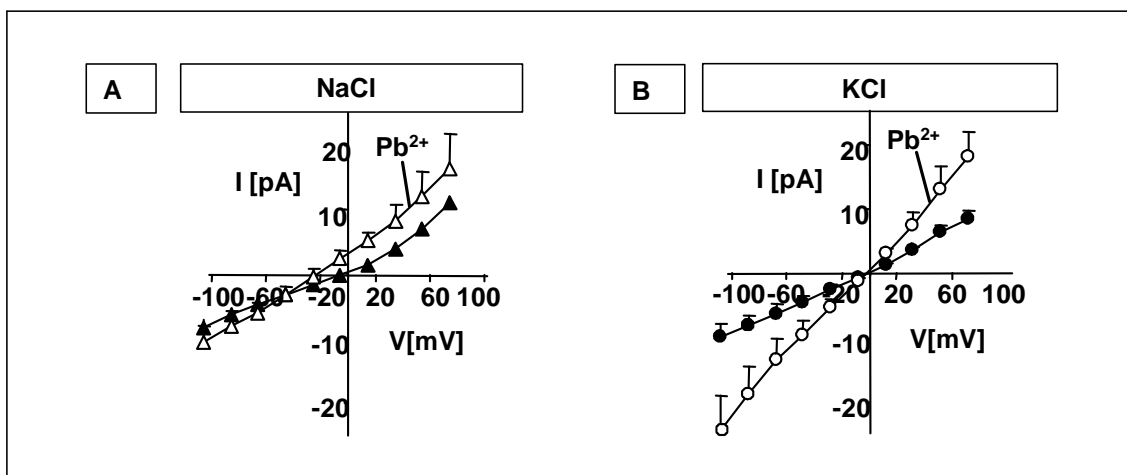
Auch die Wirkung von Blei auf die Membranleitfähigkeit wurde mit der Patch-Clamp-Technik getestet. Die Erythrozyten wurden für die Ganzzell-Technik 24h lang mit Pb<sup>2+</sup> (1  $\mu$ M) behandelt. Ein Gigaohmlevel, welches für die Bestimmung der Widerstände notwendig gewesen wäre, konnte jedoch nicht erreicht werden (n=25). Deshalb wurde Blei direkt zur Ganzzell-Konfiguration gegeben. Unbehandelte humane Erythrozyten zeigten Ganzzellströme zwischen -10 und +10 pA bei -100 und +80 mV bei der Aufzeichnung mit der KCl-K<sup>+</sup>-Glukonat Pipette und NaCl- oder KCl-Badlösung (Abb. 22; 23 und 24; jew. schwarze Symbole).



**Abbildung 22:**

Originale Ganzzellstromspuren vor (links) und nach (mittig, rechts) Bleibehandlung mit KCl (mittig) oder NaCl (rechts) in der Badlösung. Das Membranpotential wurde auf -30 mV eingestellt. Zusätzlich wurden von -100 mV bis +80 mV Pulse von je 20 mV appliziert. Die gestrichelte Linie veranschaulicht den Nullwert des pA-Stromes.

Die gemessenen Ströme lagen im Spektrum der zu erwartenden Grundstromaktivität bei einem Dichtungswiderstand von 10 GΩ und zeigten eine sehr niedrige Spontanaktivität der Kanäle.



**Abbildung 23 A, B:** Blei-induzierte Aktivierung von K<sup>+</sup>-selektiven Strömen

Dargestellt ist das Verhältnis zwischen Stromamplitude und Spannung gemessen mit einer K<sup>+</sup>-Glukonat- und KCl-Pipettenlösung in einer NaCl- (Abb. 23 A) und einer KCl-Badlösung (Abb. 23 B). Während des Versuchsablaufs wurden 10 µM Pb<sup>2+</sup> in die Badlösungen gegeben. Die schwarzen Symbole (Dreiecke in A, Kreise in B) demonstrieren die Ergebnisse vor der Bleizugabe, die weißen stehen jeweils für die durch Blei beeinflussten Werte. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (n= 5 bis 8) angegeben.

Die Umkehrpotentiale ( $E_{rev}$ ) des Ganzzellstromes in nicht stimulierten Zellen waren bei  $-6 \pm 2$  mV und  $-3 \pm 2$  mV ( $n=8$ ) bei der Messung mit NaCl- (Abb. 23 A, schwarze Dreiecke) bzw. KCl-Badlösung (Abb. 23 B, schwarze Kreise). Die Ganzzellströme änderten sich nicht spontan oder durch den Austausch von NaCl durch KCl.

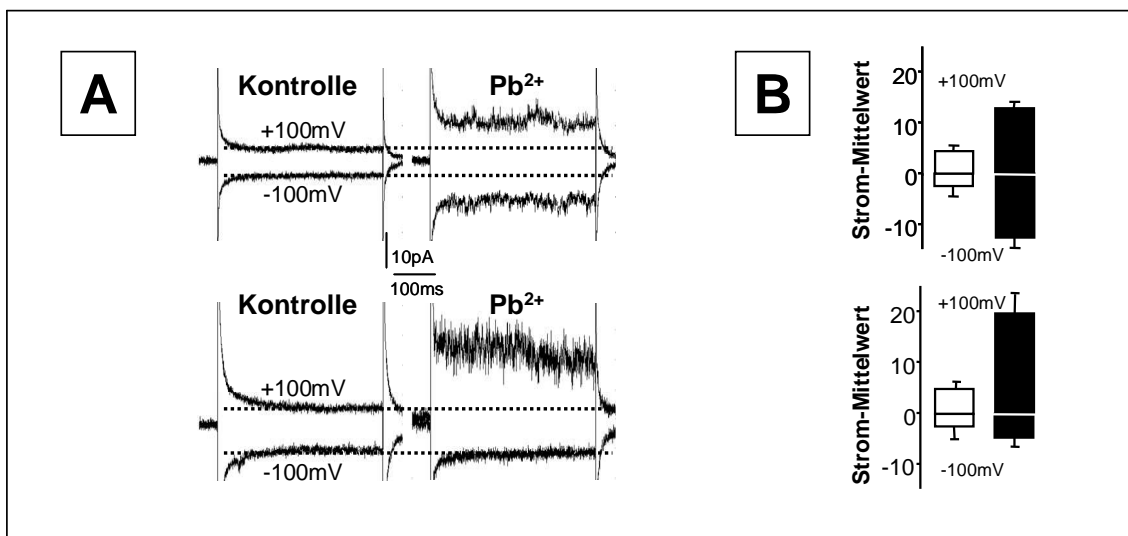
Ebenso wurden die Ganzzellströme innerhalb von 30 min nach Zugabe von Blei (1 oder 3  $\mu$ M) ( $n=5$ ) nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung der Blei-Konzentration auf 10  $\mu$ M zu einer deutlichen Zunahme der Ganzzellströme. Nach 15-minütiger Inkubation stimulierten 10  $\mu$ M Blei die Einwärtsströme ( $2,6 \pm 0,3$ -fach;  $n=8$ ) und die Auswärtsströme ( $2,2 \pm 0,3$ -fach;  $n=8$ ) signifikant ( $p \leq 0,02$ ; t-Test) bei der Messung mit einer KCl-Badlösung

Der Austausch von KCl durch NaCl in der Badlösung erniedrigte den Einwärtsstrom der durch Blei (10  $\mu$ M) stimulierten Zellen auf das Niveau un behandelter Zellen (Abb. 22 rechts, Abb. 23 A) und führte zu einer signifikanten Verschiebung des  $E_{rev}$  von  $-3 \pm 1$  mV (Abb. 23 B, weiße Kreise;  $n=5$ ) auf  $-27 \pm 5$  mV (Abb. 23 A, weiße Dreiecke) ( $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ , t-Test). Der Austausch beider Badlösungen führte zu geringeren Einwärtsströmen und zu einer Verschiebung von  $E_{rev}$  in Richtung  $K^+$ -Gleichgewichtspotential und deutete auf die  $K^+$ -Selektivität des  $Pb^{2+}$ -induzierten Stroms hin. In der NaCl-Badlösung trat kein signifikanter  $Pb^{2+}$ -stimulierter Einwärtsstrom bei Spannungen, die negativer als -50 mV waren (Abb. 23 A) auf. Das schließt eine Stimulation starker  $Na^+$ -selektiver, nichtselektiver, Kationen-selektiver oder Anionen-selektiver Einwärtsströme durch Blei aus.

Im „On-Cell-Modus“ erhöhte  $Pb^{2+}$  (10  $\mu$ M) die makroskopischen Einwärts- und Auswärtsströme während der Aufzeichnung mit der  $K^+$ -haltigen Pipettenlösung (Abb. 24 A, B). Mit NaCl in der Pipettenlösung wurden nur die Auswärtsströme beeinflusst (Abb. 24 A, B, unten). Das kann als weiteres Indiz für die  $K^+$ -Selektivität des  $Pb^{2+}$ -stimulierten Stromes gedeutet werden.



Die durch  $\text{Pb}^{2+}$  stimulierte Ganzzell-Stromfraktion in der  $\text{K}^+$ -Badlösung belief sich auf  $-15 \pm 4$  und  $+10 \pm 3$  pA ( $n=8$ ) bei  $-100$  und  $+80$  mV (Abb. 23, Unterschiede zwischen den Symbolen). Im „On-Cell-Modus“ führte der Effekt zu folgenden Ergebnissen: die Blei-stimulierten Ein- und Auswärtsströme (bei Aufnahme durch die  $\text{K}^+$ -Pipette) lagen bei  $+8,6 \pm 2,2$  und  $-9,0 \pm 2,2$  pA ( $n=4$ ) bei  $+100$  und  $-100$  mV (Abb. 24 B).

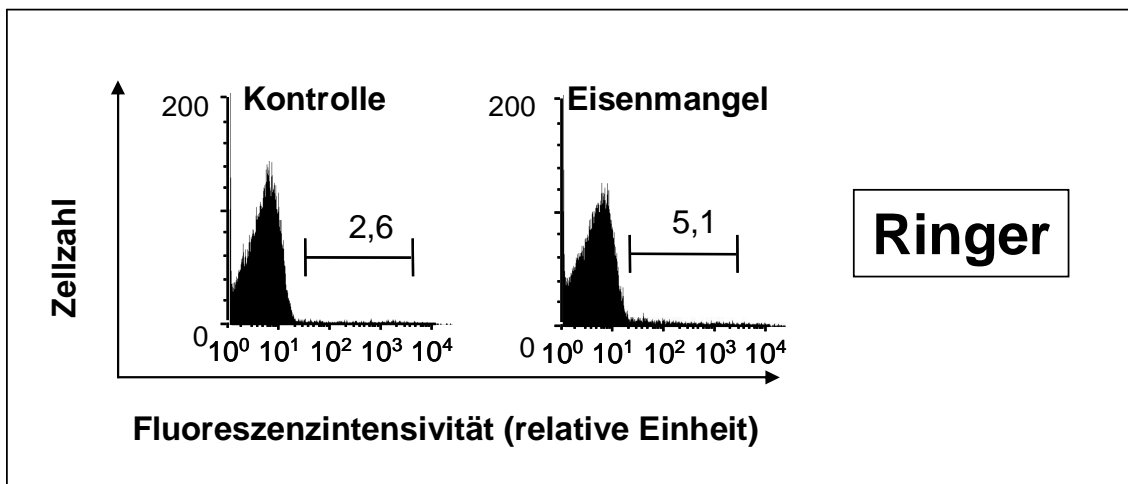


**Abbildung 24 A, B:** Makroskopische Stromspuren (A) und gemittelte Ströme (B)

Die Messungen wurden bei  $-100$  mV und  $+100$  mV im On-Cell-Modus durchgeführt. Gemessen wurde, zum einen vor einer Bleizugabe (in Abb. 24 A linke Spuren, in Abb. 24 B weiße Balken) und nach  $\sim 10$ - $15$  min nach Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Blei (in Abb. 24 A rechte Spuren, in Abb. 24 B schwarze Balken) in die NaCl-Badlösung. Die Pipettenlösung enthielt entweder  $\text{K}^+$  (in A und B jew. die oberen Schaubilder) oder  $\text{Na}^+$  (in A und B jew. die unteren Schaubilder). Für Abb. 24 B wurden die gemittelten Ströme  $\pm$  SEM ( $n=3$ - $4$ ) berechnet.

### 3.5. Annexinbindung in der Durchflusszytometrie

Da eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität mit einer zellulären Schrumpfung und mit einer verstärkten Annexinbindung einhergeht, werden die Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Tatsächlich war die Zahl der ungestressten, nur in Ringerlösungen inkubierten, annexinpositiven Erythrozyten signifikant um 54 % ( $n=24$ ) in den Eisenmangelmäusen verglichen zu den entsprechenden Kontrolltieren erhöht (Abb. 25, 26 A).



**Abbildung 25:** Original-Histogramme der Annexinbindung in Ringerlösung

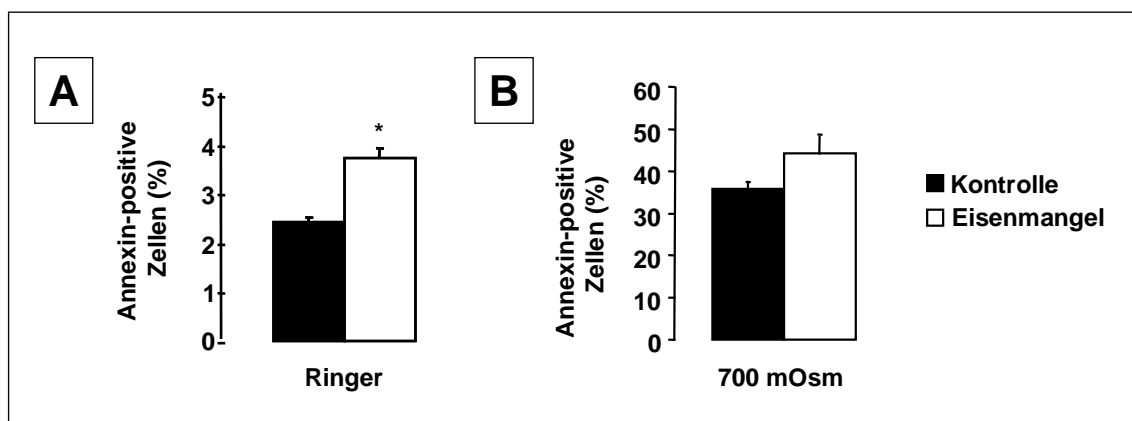
Die Zahlen über den Markern zeigen eine erhöhte Annexinbindung bei den Eisenmangelmäusen (5,1) nach Inkubation in Ringerlösung im Vergleich zu den Kontrollerythrozyten (2,6) an.

Erythrozyten beider Gruppen nach 12h Inkubation in Ringerlösung. Die Zahlen über den Markern entsprechen dem prozentualen Anteil annexinpositiver Zellen.

Eine Doppelfärbung der Erythrozyten mit Thiazole-Orange kombiniert mit Annexin-V (Alexa Flour®568) zeigte, dass die erhöhte Annexinbindung nicht durch eine Vermehrung der mitochondrienhaltigen Retikulozyten zustande kam. In diesen Experimenten war die Zahl der annexinbindenden thiazole-orange-

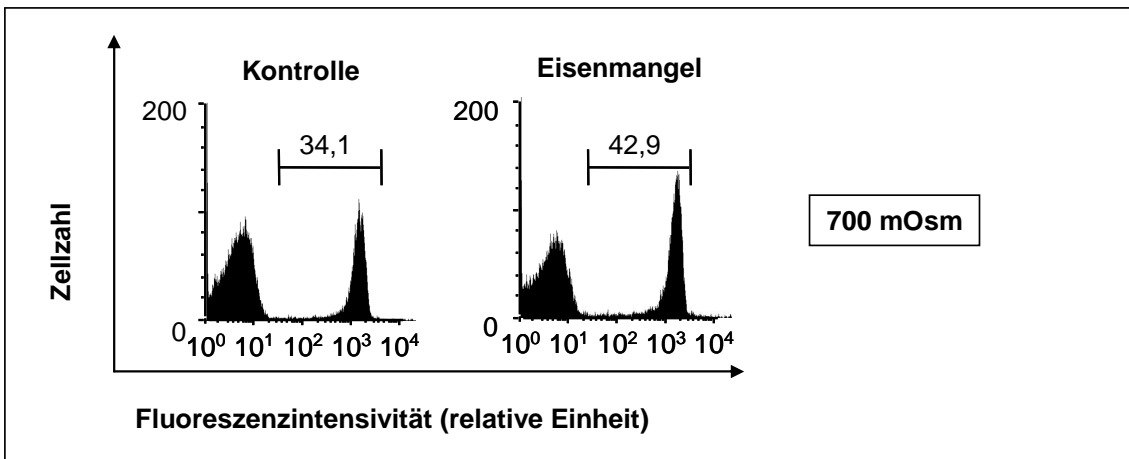
negativen, also ausgereiften Erythrozyten um  $56 \pm 19 \%$  ( $n=10$ ) bei den eisenarm ernährten Mäusen verglichen zu den Kontrolltieren erhöht.

Die folgenden Versuche bei hyperosmotischen Bedingungen ließen die Erythrozyten beider Gruppen verstärkt annexinpositiv erscheinen. Die Werte reichten von  $2,4 \pm 0,2 \%$  bis  $35,8 \pm 1,7 \%$  (jew.  $n=8$ ) bei den Kontrolltieren und von  $3,9 \pm 0,3 \%$  bis  $44,2 \pm 4,6 \%$  (jew.  $n=8$ ) bei den anämischen Mäusen. Der Prozentsatz der annexinbindenden Zellen nach hyperosmotischer Behandlung scheint bei den Mäusen mit eisenarmer Kost größer zu sein als bei der Kontrollgruppe. Letztendlich zeigten sich keine signifikanten Differenzen (Abb. 26 B; 27).



**Abbildung 26 A, B:** Mittelwerte der annexinpositiven Erythrozyten

Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=24$ ) der fluoreszierenden Zellen nach 12-stündiger Inkubation in Ringerlösung (A) und hyperosmolarer (700 mOsm) Umgebungslösung (B). \* markiert die Signifikanz des Unterschiedes der Fluoreszenzzunahme (ungepaarter t-Test,  $p < 0,001$ ) bei den anämischen (symbolisiert durch den weißen Balken) versus den gesunden Zellen (dargestellt durch den schwarzen Balken).

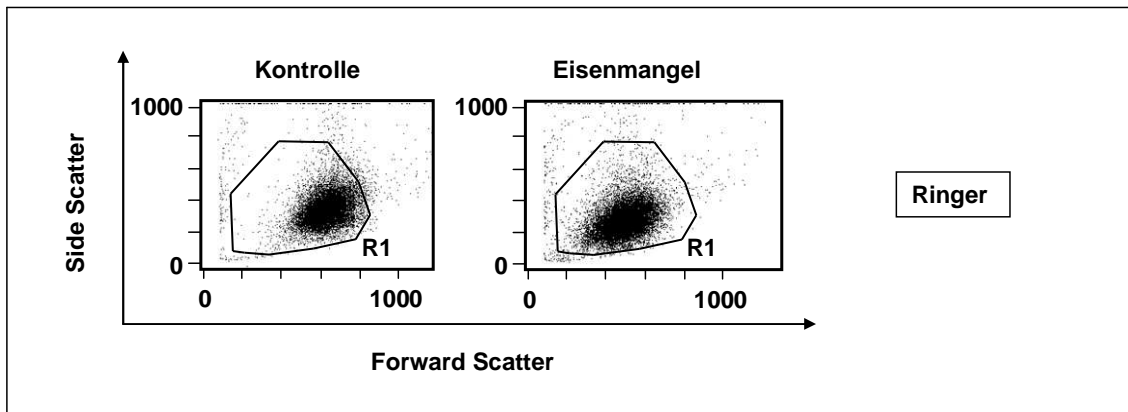


**Abbildung 27:** Annexinbindung bei 700 mOsm

Diese Abbildung zeigt repräsentative Histogramme annexinbindender Erythrozyten nach 12-stündiger Inkubation bei hyperosmolaren Bedingungen (700 mOsm der extrazellulären Inkubationslösung). Die Zahlen über den Markern entsprechen jeweils der Menge der annexinpositiven Zellen. Zu erkennen ist die deutliche Zunahme der Menge an fluoreszierenden Zellen in der Gruppe der Eisenmangelerythrozyten (linkes Histogramm).

Um ausschließen zu können, die Rechtsverschiebung der Annexin-Fluoreszenzkurve bestünde aufgrund einer stressinduzierten Zellaggregation, wurde eine Kombinationsanalyse aus Forward und Side Scatter durchgeführt. In den zwei dimensional Histogrammen, die man nach einer durchflusszytometrischen Messung erhielt, konnte keine Population der hypochromen Erythrozyten außerhalb des festgelegten Bereiches festgestellt werden (Abb. 28).

Die gezählten Populationen von R1 der Kontroll- und der eisenarmen Zellen beinhalteten 97,8 bzw. 97,5 % der gesamten Population. Bei diesen Versuchen war die Phosphatidylserinpräsentation der Eisenmangelerythrozyten jedoch um 73,6 % in der ausgewählten, und um 73,9 % in der gesamten Population verstärkt (Abb. 28). Mit diesen Experimenten konnte die Verklumpung der Zellen als mögliche Ursache für die erhöhte Annexinbindung ausgeschlossen werden.

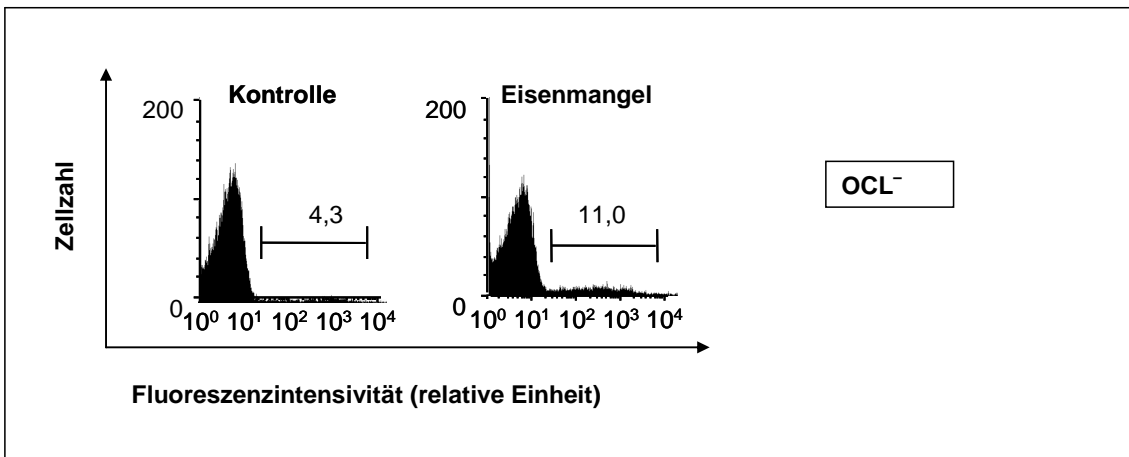


**Abbildung 28:** Zweidimensionale Histogramme von Erythrozyten beider Gruppen

In den Histogrammen erkennt man eine Linksverschiebung der Zellen bei der anämischen Gruppe (rechtes Bild) im Vergleich zu den Kontrollzellen (linkes Bild). R<sub>1</sub> bezeichnet den Bereich der unverklumpten Einzelzellen.

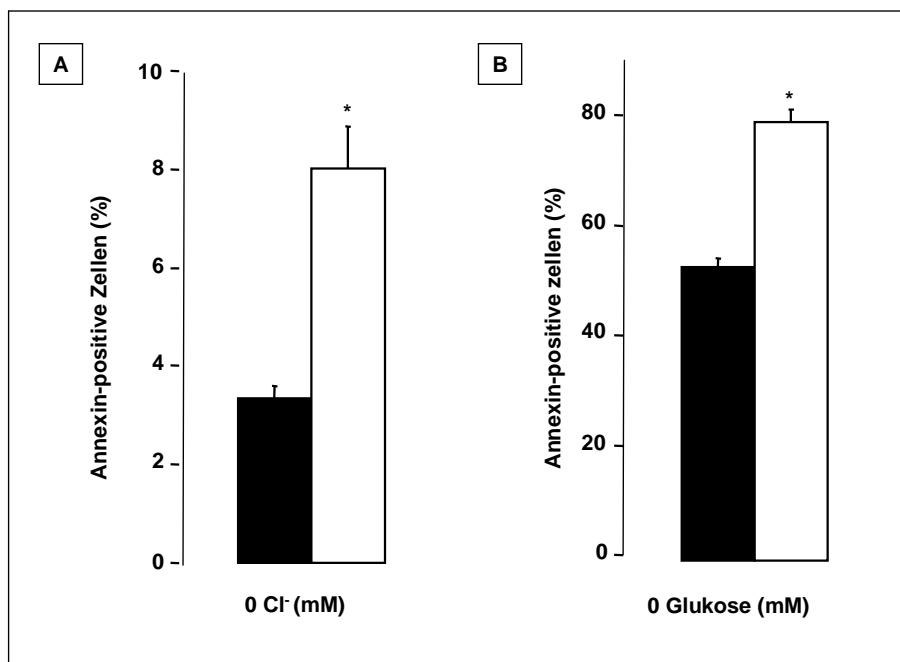
Die Cl<sup>-</sup>-Substitution in den Inkubationslösungen durch Glukonat (durch diese Maßnahme wurde der Ca<sup>2+</sup>-durchlässigen Kationenkanal inhibiert), erhöhte ebenfalls die Menge der annexinpositiven Zellen bei beiden Gruppen. Hierbei ergaben sich Werte von 2,4 ± 0,2 % und 3,4 ± 0,3 % (jew. n=8) bei den Kontrollen und 3,9 ± 0,3 % und 8,0 ± 0,9 % (jew. n=8) bei den anämischen Tieren. Die Anzahl der annexinbindenden Zellen nach Cl<sup>-</sup>-Wegnahme war in der Gruppe der anämischen Tiere signifikant erhöht (Abb. 29, 30 A).

Energiemangel, der durch das Entfernen von Glukose aus der Lösung im Versuchsansatz hervorgerufen wurde, verursachte ebenfalls in beiden Gruppen eine verstärkte Annexinbindung (von 2,5 ± 0,1 % auf 53,4 ± 1,5 % (jew. n=8) bei den Kontrollen und von 4,0 ± 0,2 % auf 79,8 ± 2,3 % (jew. n=8) bei den eisenarm ernährten Mäusen). Den Ergebnissen, der durch Chloridwegnahme gestressten Zellen entsprechend, war Anzahl annexinpositiver Erythrozyten bei den anämischen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 30 A, B).



**Abbildung 29:** Histogramme der annexinpositiven Erythrozyten

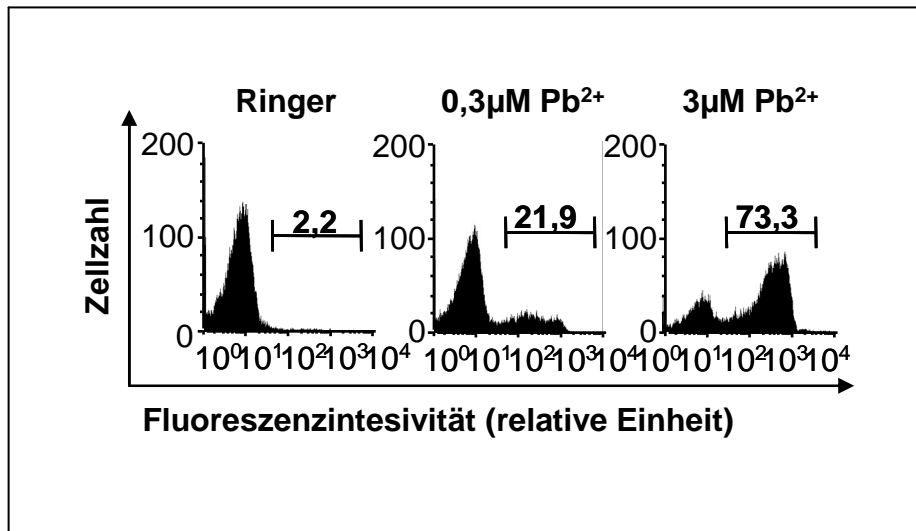
In dieser Abbildung ist die Fluoreszenz annexinpositiver Zellen nach 12-stündiger Inkubation in Cl<sup>-</sup>-depletierter Lösung veranschaulicht. Die angegebene Zahl über dem Marker entspricht der Menge annexinbindender Zellen. Diese überwiegen eindeutig in der hypochromen Gruppe.



**Abbildung 30 A, B:** Mittelwerte annexinpositiver Erythrozyten

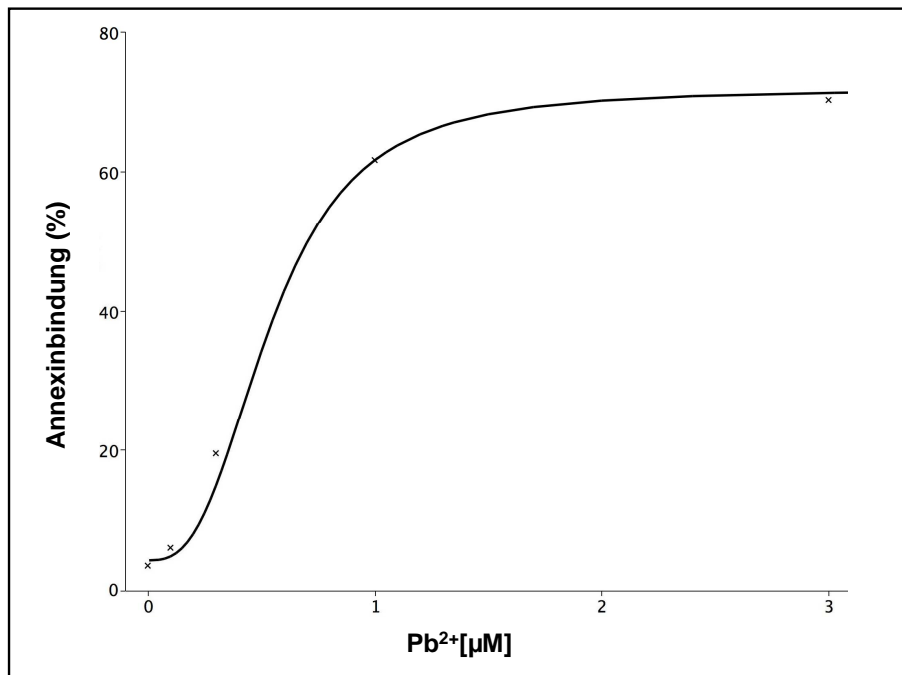
Die Zellen wurden für diesen Versuch 12 h in Cl<sup>-</sup>-freier (A) und Glukose-depletierter Lösung (B) inkubiert. Es zeigten sich signifikant (\*) erhöhte Mittelwerte ( $\pm$  SEM, n=8) der annexinpositiven Zellen bei den hypochromen Zellen (weißer Balken) im Vergleich zu den Kontrollzellen (schwarze Balken), (ungepaarter t-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die Versuche mit Blei wurden mit humanen Erythrozyten in vitro durchgeführt. Nach Inkubation frischer Erythrozyten für 24 h in Ringerlösung (Abb. 31) ergaben sich Werte für die Anzahl annexinpositiver Zellen von  $3,6 \pm 0,6 \%$  ( $n=10$ ).



**Abbildung 31:** Histogramme der Blei-induzierten Phosphatidylserinexposition Annexinbindung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung +/- Pb<sup>2+</sup> (0,3 bis 3 μM). Die Zahlen unter den Markern entsprechen der Menge an annexinpositiven Zellen.

Durch die Zugabe von Pb<sup>2+</sup> in aufsteigenden Konzentrationen (0,1; 0,3; 1; 3 μM) nahmen die Werte dosisabhängig zu. Die Halbmaximalkonzentrationen von Blei lag bei  $0,54 \pm 0,2 \mu\text{M}$  (Abb. 32). Inkubierte man die Erythrozyten 24h lang mit 1 μM Pb<sup>2+</sup>, nahm der prozentuale Anteil der annexinpositiven Zellen deutlich zu ( $61,7 \pm 2,7 \%$ ;  $n=10$ ).

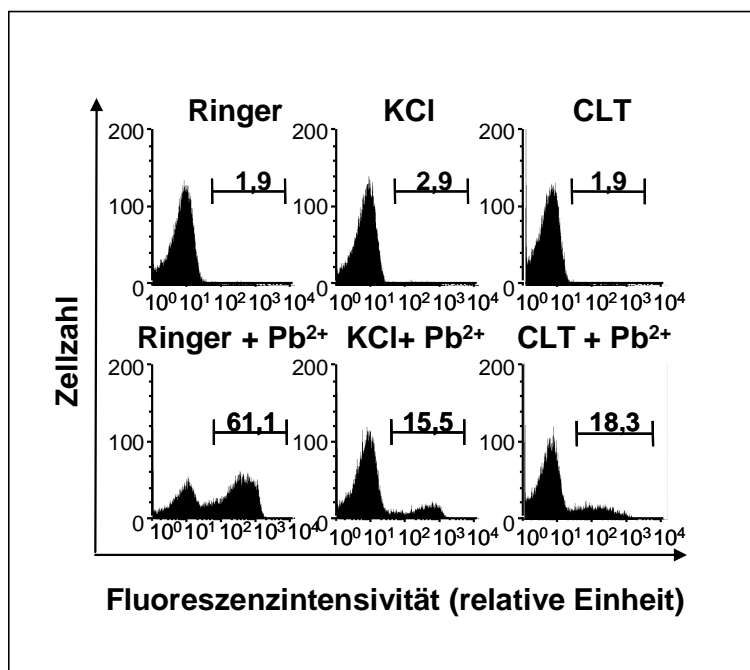


**Abbildung 32:** Dosiswirkungskurve des Blei-induzierten Effektes

Arithmetisches Mittel (x) (n=8 - 10) der Annexinbindung nach 24-stündiger Inkubation mit Blei (Pb<sup>2+</sup>) in aufsteigenden Konzentrationen. Die Darstellung zeigt die Dosisabhängigkeit des Effektes. Die Halbmaximalkonzentration (D50) von Blei liegt hier bei  $0,54 \pm 0,2 \mu\text{M}$ . (Hill-Funktion; Maximalkonzentration  $A=71,78$ ; asymptotischer Wert  $B=4,3$ ; Steigungsparameter  $c=2,84$ ; Halbmaximalkonzentration  $D50=0,54$ ).

Um die Bedeutung des K<sup>+</sup>-Kanals für den Mechanismus der Blei-induzierten Eryptose genauer aufzudecken, und um zu sehen, ob ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Gardos-Kanals, des Volumenverlustes und der Annexinbindung besteht, wurden die Erythrozyten in einer hochkonzentrierten K<sup>+</sup>-Lösung (125 mM K<sup>+</sup>) inkubiert, um den K<sup>+</sup>-Gradienten zu egalisieren und somit den Austritt von K<sup>+</sup> nach Öffnung des K<sup>+</sup>-Kanals zu verhindern. Tatsächlich ließ sich durch diese Maßnahme, neben der Anwesenheit von Blei, der Anstieg der annexinpositiven Zellen signifikant vermindern (Abb. 33, 34).

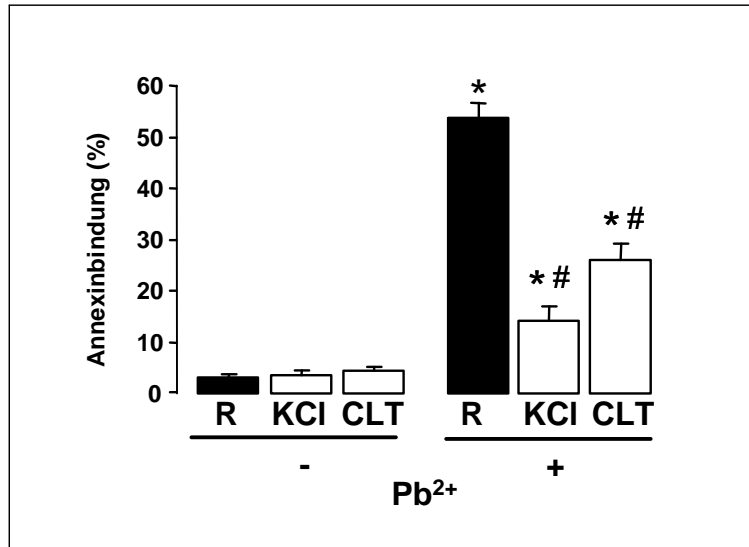




**Abbildung 33:**

In den Histogrammen ist die Annexinpositivität der Erythrozyten abgebildet. Bei einer Inkubationszeit von 24 h in Ringer +/- Pb<sup>2+</sup> (1 µM) +/- 125 mM K<sup>+</sup> oder Clotrimazol (CLT, 2 µM). Der inhibitorische Effekt von CLT und 125 mM K<sup>+</sup> ist an der Abnahme der Fluoreszenzaktivität der Zellen zu erkennen (veranschaulicht durch die Werte unter den Markern).

Zusätzlich wurde Clotrimazol (ein Inhibitor des Ca<sup>2+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanals, 2 µM) mit und ohne Blei (1 µM) zu den Erythrozyten in Ringerlösung gegeben und 24 h lang inkubiert. Ähnlich wie die Erhöhung des extrazellulären K<sup>+</sup> inhibierte Clotrimazol die Blei-induzierte Apoptose (Abb. 34).



**Abbildung 34:** Arithmetische Mittelwerte der annexinpositiven Zellen

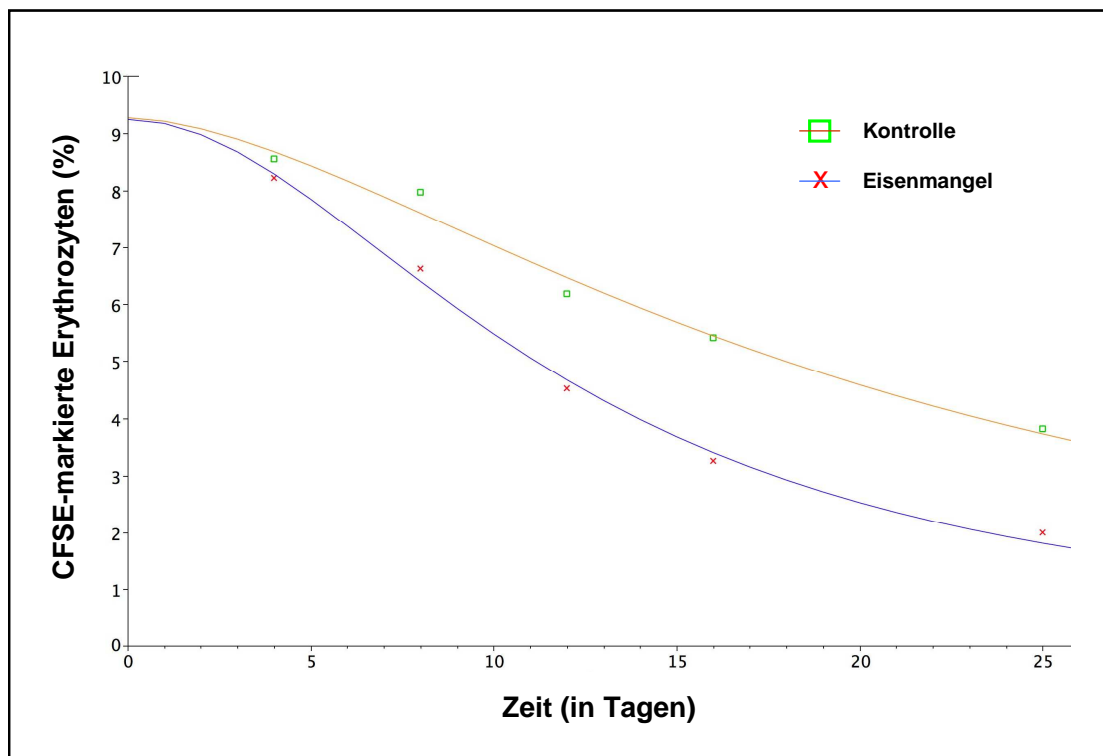
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4) der annexinbindenden Erythrozyten. Die drei linken Balken entsprechen der Messung vor der Bleizugabe, die rechten symbolisieren die Ergebnisse nach der Applikation von 1  $\mu$ M Blei. Die Annexinfluoreszenz wurde, zum einen durch die zusätzliche Gabe von 2  $\mu$ M Clotrimazol (CLT), zum anderen durch hohe Konzentrationen von K<sup>+</sup> extrazellulär (125 mM K<sup>+</sup> ersetzt 125 mM NaCl) signifikant vermindert (weiße Balken links), \*symbolisiert den Unterschied zur Kontrolle Ringer ohne Pb<sup>2+</sup>; # den zur Kontrolle Ringer mit Pb<sup>2+</sup>.

### 3.6. CFSE-Essay

Mit dieser Methode konnte die Elimination der Erythrozyten aus dem Blutkreislauf der Versuchstiere demonstriert werden. Um den Effekt einer verstärkten Phosphatidylserinexposition auf die Überlebenszeit zu untersuchen, wurden die Erythrozyten mit einem beständigen fluoreszierenden Farbstoff (CFSE) markiert.

Dafür wurde den Versuchstieren beider Gruppen retroorbital venöses Blut entnommen, mit CFSE angefärbt und ausschließlich unbehandelten Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Diesen Tieren wurde in regelmäßigen Zeitabständen Blut entnommen, und darin der Anteil CFSE-positiver Erythrozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die hypochromen Erythrozyten eine deutlich verkürzte Lebensspanne im zirkulierenden Blut haben. Die Halbwertszeit der zirkulierenden Erythrozyten verkürzte sich von 20 Tagen bei den Kontrollen auf 12,3 Tage bei den Eisenmangelerythrozyten (Abb. 35).

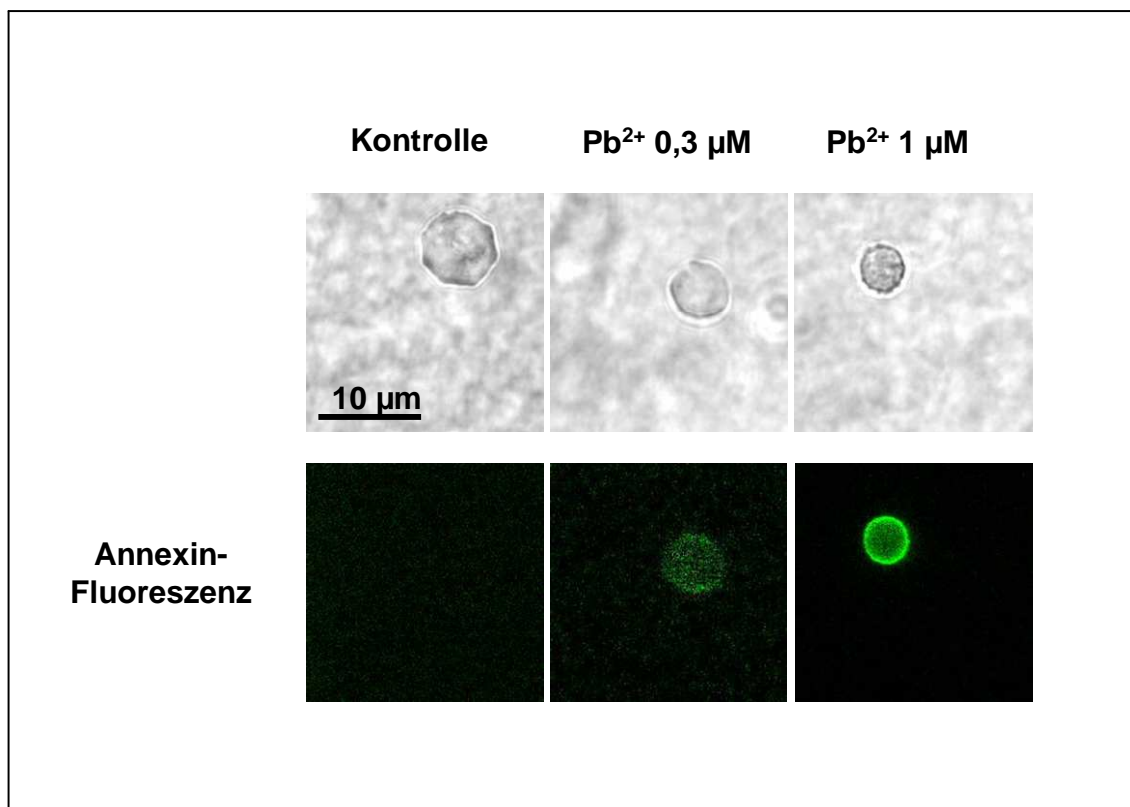


**Abbildung 35:** Prozentuale Abnahme der CFSE-markierten Erythrozyten im Blut

In diesem Schaubild sind die arithmetischen Mittel (n=8) des prozentualen Anteils CFSE-positiver Zellen im peripheren Blut zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 5, 13, 18, 25 Tage nach Injektion) aufgetragen. Der steilere Verlauf der Kurve der hypochromen Erythrozyten (x) spricht für eine schnellere Elimination dieser Zellen. Die Erythrozyten der Kontrollgruppe (□) waren an den verschiedenen Zeitpunkten in höheren Konzentrationen im Blut nachweisbar. Die Hälfte der Erythrozyten der Eisenmangelmäuse war schon nach 12,3 Tagen ( $t_{50}$ , mit einem 95 % Konfidenzintervall von 8,9 – 15,6 Tagen) nicht mehr messbar, während die Halbwertszeit der Kontrollzellen nach 20,0 Tagen ( $t_{50}$ , 95 % Konfidenzintervall entspricht 16,6 – 23,4 Tagen) erreicht war. ( $t_{50}$  war signifikant verschieden,  $p < 0,05$ , die Kurve wurde durch eine Hill-Funktion berechnet, Maximalkonzentration beim Zeitpunkt 0: Kontrolle  $A=9,4$ ; Eisenmangel  $A=9,2$ ; Steigungsparameter  $c=1,8$  (Kontrolle);  $c=2,0$  (Eisenmangel)).

### 3.7. Lichtmikroskopie

Der durch  $\text{Pb}^{2+}$  hervorgerufene Effekt auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten wurde mit Hilfe der Lichtmikroskopie veranschaulicht. Hierbei konnte der zusätzliche Einfluss auf die Morphologie der Zellen gezeigt werden (s. Abb. 36). Die *in vitro* Behandlung der Erythrozyten mit Blei stimulierte die Umwandlung des bikonkaven in einen echinozytären Korpus. Der Effekt war dosisabhängig und deutete auf eine verstärkte Schrumpftneigung der Zellen hin (Abb. 36).



**Abbildung 36:** Mikrophotographie der Fluoreszenzlichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahme unterschiedlich behandelter Erythrozyten: in Ringerlösung (links), Ringerlösung mit 0,3  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  (mittig), Ringerlösung 1  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$ . In der oberen Reihe ist die veränderte Morphologie der Zellen zu erkennen. Die Inkubation mit Blei verursacht einen Volumenverlust und eine erkennbare Deformation der Zellhülle (im rechten Bild deutlich zu sehen). Die untere Bildreihe stellt die Annexinfluoreszenz (grün) dar. Bei den in Ringerlösung inkubierten Erythrozyten war keine Annexinbindung zu erkennen (links), nach Bleizugabe jedoch wurde die Fluoreszenz sichtbar und nahm konzentrationsabhängig zu (mittig, rechts).

#### 4. DISKUSSION

Wichtige Zellorganellen, die in anderen Zelltypen den Ablauf verschiedener Apoptosemechanismen wesentlich prägen, fehlen in der Ausstattung der Erythrozyten. Daher war man bisher der Meinung, diese Form des Zelltodes spielte bei den Erythrozyten keine Rolle. Da die Erythrozyten weder Mitochondrien, Zellkern noch ein endoplasmatisches Retikulum mehr besitzen, wurden sie bis vor kurzem von der Apoptoseforschung weitestgehend ignoriert. Inzwischen hat man sich der Thematik angenommen und festgestellt, dass apoptoseähnliche Vorgänge auch im Falle der roten Blutkörperchen eine wesentliche Bedeutung haben. Neuere Erkenntnisse zeigen überraschenderweise, dass auch diese Zellspezies einige Merkmale, die für die Apoptose kernhaltiger Zellen typisch sind, aufweisen. Dazu gehören vor allem die Exposition von Phosphatidylserin, die Ausbildung von Membranausstülpungen („membrane blebbing“) und der, durch Ionenverschiebungen ausgelöste, Volumenverlust (54). Diese Veränderungen werden von proapoptotischen Stimuli, beispielsweise intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung (19; 30) oder Ceramidbildung (116), hervorgerufen. Die auslösenden Stimuli sind vielfältig und facettenreich. Für eine genauere Vorstellung helfen die aufgeführten Beispiele, die den Zelltod durch die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Erythrozyten auslösen:

- Phorbol ester (ein Aktivator der Proteinkinase-C) (8; 105)
- oxidativer Stress (131; 132; 139)
- Ionomycin (139)
- Paclitaxel (123)
- Prostaglandin  $\text{E}_2$  (121)
- hyperosmotischer Schock (92)
- Phosphatdepletion (22)
- Chlorpromazin (2)
- Ligation von Glycophorin-C (83)
- Ligation von CD47 (84)

- Ligation von FAS (130)

Weiterhin wird die Ceramidbildung auf der Membranaußenseite durch

- den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) (122)
- Quecksilberionen (63)
- Paclitaxel (123)
- Plasma von Sepsispatienten (100)
- hyperosmolaren Schock (116)

aktiviert.

Dementsprechend kann der erythrozytäre Zelltod durch verschiedene Mediatoren und Pharmaka gehemmt werden. Dazu gehören Harnstoff (116), Erythropoetin (138), Niflumic Acid und NPPB (jeweils Cl<sup>-</sup>-Kanal-Blocker) (139), Cyclooxygenase-Inhibitoren (121) und Katecholamine (120).

Diese morphologischen und strukturellen Veränderungen stellen die Weichen für die weiteren funktionellen Wege der Zellen im Körper. Das betrifft sowohl die kernlosen Erythrozyten, als auch jegliche andere kernhaltige Zelle.

Die vorliegende Arbeit eröffnet neue Blickwinkel auf mögliche Konsequenzen einer Bleiintoxikation und eines Eisenmangels. Beide Krankheitsbilder können eine Anämie zur Folge haben. Es soll durch die durchgeführten Experimente ein Zusammenhang zwischen dem erythrozytären Zelltod und den klassischen Befunden bzw. veränderten Laborparametern bei der Anämie hergestellt werden. Die Versuche waren hilfreich um das Verständnis der Pathophysiologie der Anämie auszuweiten und vertiefen zu können.

## **4.1. Legitimation der Versuche - Überlegungen zur klinischen Relevanz**

### **4.4.1. Veränderung des Blutbildes**

Die Eisenmangelanämie kann im menschlichen Organismus erhebliche Veränderungen der Blutbildkonstellation mit sich bringen. Diese wurden bereits in der Einleitung (siehe Kapitel 1.5.3.) genauer erläutert. Um die Entstehung einer hypochromen Anämie als Voraussetzung für die Durchführung der Tierexperimente diagnostizieren zu können, wurde in regelmäßigen Abständen, mittels Blutabnahmen, ein Status erhoben. So war es möglich, Entwicklung und Verlauf der Anämie zu dokumentieren. Die Analyse der Blutbilder zeigte typischen Veränderungen, die auch im humanen Organismus bei Anämien zu sehen sind. Die eisenarme Diät mit den zusätzlichen Blutentnahmen führte zur signifikanten Senkung des Hämatokrits, Hämoglobins und des MCV. Der periorale bzw. paravertebrale Haarausfall sprach als visueller Hinweis für die Manifestation der Krankheit. Diese Resultate lieferten die adäquate Basis für detailliertere Versuche mit Erythrozyten aufgrund der vorherrschenden Analogie zum humanen Krankheitsbild.

### **4.4.2. Bleispiegel im Blut bei Intoxikation**

Die Bleikonzentrationen, welche in den Experimenten signifikante Effekte auslösen konnten, befanden sich durchaus in einem Größenbereich, der bei Intoxikationen in vivo im Plasma zu messen ist (175). Man sollte dabei jedoch nicht vergessen, dass die meisten Ionen im Blut an Plasmaproteine, beispielsweise an Albumin (170), gebunden sind, und somit die Konzentrationen nicht repräsentativ für die Menge freier Ionen im Blut sind. Nichtsdestotrotz liegen bei einer Bleivergiftung freie Ionen im Plasma durchaus im Bereich von 10-19 µg/dL (~0,5 - 0,8 µmol) vor (11; 82).

## **4.2. Bedeutung von Phosphatidylserin und intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung**

Phosphatidylserin an der Erythrozytenoberfläche führt zur Bindung an Phosphatidylserinrezeptoren von Makrophagen (65; 134) mit anschließender Aufnahme und Abbau durch die Fresszellen. So wird das Gefährdungspotential, das Zellen, die auf diesem Weg eliminiert werden, tragen, rasch minimiert (24; 62). Alternde Erythrozyten weisen interessanterweise eine erhöhte zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und damit ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Scramblase auf (102; 157). Auch oxidativer Stress oder eine Schwächung antioxidativer Schutzmechanismen (51) forcieren den zellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über Kationenkanäle und somit die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Somit wird die Beseitigung der betroffenen Erythrozyten aus dem Blut beschleunigt und einzelne Zellkomponenten können recycelt werden.

Die vorliegenden Versuche deuten auf einen Mechanismus hin, der die beschleunigte Entsorgung der eisenarmen oder bleigeschädigten Erythrozyten aus dem Kreislauf demonstrieren kann.

## **4.3. Annexinbindung**

Annexin-V-Fluoreszenz ist ein Marker mit dessen Hilfe sich die Phosphatidylserinexposition detektieren und quantifizieren lässt. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine signifikante Steigerung der Annexinfluoreszenz nach Bleiexposition. Die Fluoreszenzaktivität der Eisenmangelerythrozyten nahm zu, im Vergleich zu den Zellen der normal ernährten Tiere. Schon bei Kontrollbedingungen waren die Unterschiede zu den gesunden Erythrozyten signifikant erhöht. Bei zusätzlicher Stressbelastung war der Ergebnis deutlicher und eindrucksvoller.

Aufgrund der erhöhten unstimulierten Annexinbindung bei den Eisenmangelerythrozyten ist eine Verstärkung des Makrophagen-Signals zu



erwarten. Das hat in vivo erhebliche Konsequenzen. Müssen die Zellen zusätzlichen Stress (z.B. hyperosmolare Bedingungen in der Niere, Energiemangel bei Stoffwechsellage) bewältigen, kann ein geschwächter Erythrozyt unter Umständen seine Funktionen nicht mehr in vollem Maße aufrechterhalten. Die Situation eskaliert, konsekutiv folgt die gesteigerte Phosphatidylserinexposition.

Auch Endothelzellen haben Rezeptoren für Phosphatidylserin. Die verstärkte Präsenz von Phosphatidylserin auf den Erythrozyten könnte somit nicht nur zur Bindung an Makrophagen, sondern auch die Adhäsion der Erythrozyten an Endothelzellen ermöglichen. Dieses Prinzip könnte als Erklärung für mikrovaskuläre Zirkulationsstörungen, die als eine unangenehme Komplikation der Anämie auftreten, herangezogen werden (62). Es ist bereits bekannt, dass Erythrozyten bei Thalassämie, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel und Sichelzellanämie eine erhöhte Annexinbindung aufweisen (118). Weitere Studien postulieren eine mögliche Adhäsion der Sichelzellen an das Endothel postkapillarer Venolen mit reduzierter Zirkulation in den genannten Gefäßen als Konsequenz (190), woraus zerebrale Ischämien als Komplikation resultieren können (101).

Entzündungsreaktionen könnten mögliche Auslöser für Gefäßokklusionen als eine der Komplikationen der akuten Sichelzellkrise darstellen (97). Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (121) und PAF (122) induzieren in Erythrozyten Phosphatidylserinexposition, und potenzieren somit das Bindungsvermögen geschädigter Erythrozyten an das Endothel oder an Makrophagen.

Die Anämie tritt oft im Gefolge mit chronischer Herzinsuffizienz auf. Dabei ist in 50 % der Fälle eine chronische Entzündung der Auslöser (50). Entzündungsmediatoren könnten weiterhin als Ursache für die Entstehung der „anaemia in chronic illness“ (Anämie bei chronischen Krankheiten) eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.4. Bestimmung der Überlebenszeit**

Die These, verminderte Erythrozytenzahlen bei Eisenmangelanämie und chronischer Bleivergiftung resultierten aus einer reinen Synthesestörung, wackelt bei genauerer Betrachtung dieser überraschenden Ergebnisse. Um schlüssige Antworten auf diese Frage zu erhalten, wurden in vivo Experimente durchgeführt. Die Erythrozyten der gesunden und anämischen Mäuse wurden mit einem stabilen Farbstoff (CFSE) markiert, in gesunde Tiere injiziert und daraufhin die Konzentration der markierten Zellen im Blut über einen längeren Zeitraum wiederholt gemessen. Auf diesem Weg kann man die Clearance der Zellen messen und Rückschlüsse auf deren Lebensspanne im Organismus ziehen. Die Zahl der hypochromen Erythrozyten im Blut hat signifikant schneller abgenommen, als die der Kontrollpopulation. 50 % der CFSE-positiven eisenarmen Zellen waren bereits nach 12,3 Tagen nicht mehr nachzuweisen, während die mittlere Überlebenszeit der normochromen Erythrozyten 20,0 Tage betrug (Abb.35).

Die Clearance morbider Erythrozyten ist bei diesem Versuch relevant erhöht. Überträgt man dieses Ergebnis auf den Menschen, setzt es als Ursache für die niedrigen Erythrozytenzahlen bei einer Anämie die frühzeitige Elimination kranker Erythrozyten aus dem Kreislauf voraus.

#### **4.5. Ionenkanäle und $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung**

Die 20-minütige Inkubation der Erythrozyten gesunder Spender mit Blei ( $1\mu\text{M}$ ) erhöhte deren Fluo 3/AM-Fluoreszenz in den FACS-Messungen im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenz Fluo 3/AM-beladener eisenarmer Erythrozyten nahm ebenfalls signifikant zu im Vergleich zu den Erythrozyten der gesunden Vergleichstiere. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Bestimmung der

intrazellulären Aufnahme von radioaktivem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , die bei den mikrozytären hypochromen Mäuseerythrozyten signifikant erhöht war. Blei steigert also, ebenso wie manifester Eisenmangel, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Erythrozyten.

Versucht man den Effekt des Bleis durch Entfernung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  oder Zugabe von Amilorid (1 mM), ein Inhibitor des unselektiven Kationenkanals (117), zu hemmen, bleibt der Erfolg aus. Folglich führt Blei nicht zu einer direkten Aktivierung des Kationenkanals und verursacht daher keinen unmittelbaren Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle.

Ein weiteres morphologisches Korrelat der Bleiexposition ist die Zellschrumpfung. Um die Ursache herauszuarbeiten, wurden die Zellen mit Clotrimazol, ein Inhibitor des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals (25; 31), inkubiert. Der Volumenverlust und die Annexinbindung durch Blei konnte in diesen Versuchen durch Clotrimazol unterbunden werden. Denselben Hemmeffekt erzielte  $\text{K}^+$  (125 mM) extrazellulär kombiniert mit Blei. Bei diesem Versuchskonzept wurde der Konzentrationsausgleich von  $\text{K}^+$  nach extrazellulär durch Egalisierung des  $\text{K}^+$ -Gefälles verhindert. Daraus kann man die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals durch Blei ableiten. Ähnlich wie bereits für kernhaltige Zellen gezeigt (27; 28; 77; 93; 94; 137; 150), forciert der zelluläre Verlust von  $\text{K}^+$  durch die oben genannten Kanäle die erythrozytäre Apoptose (117). Dies spricht deutlich für eine direkte Wirkung des Bleis auf die Erythrozyten und analog dazu für eine Beeinflussung der erythrozytären Apoptose.

Abgerundet wurden diese Hypothesen durch Patch-clamp-Versuche, die in verschiedenen Ansätzen die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle durch Blei beweisen konnten. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in ATP-defiziente Erythrozyten von Patienten mit Eisenmangel merklich zunimmt (168). Auch in anderen Untersuchungen bestand eine Verbindung zwischen erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und hypochromer

Anämie: die Energiedepletion mit erhöhtem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  gilt als wichtiger Triggerfaktor für den programmierten Zelltod (115; 117).

Auch Blei exponierte Erythrozyten weisen weiterhin einen erniedrigten ATP-Gehalt auf, wie in entsprechenden Experimenten gezeigt werden konnte. Das ATP nimmt aufgrund der anhaltenden Pumpleistung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ab. Die Energie wird also verbraucht, um das anflutende  $\text{Ca}^{2+}$  wieder nach extrazellulär zu transportieren. Trotz dieser Reaktion kann es zur Zunahme des zytosolischen Calciums kommen. Dem folgt wiederum eine Stimulation der Scramblase. Die führt zu einem Zusammenbruch der Phosphatidylkomposition in der Zellmembran und anschließend zur Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran.

#### **4.6. Zellvolumen und Forward Scatter**

Der verminderte Hämoglobingehalt der eisenarmen Erythrozyten ist für einen reduzierten kolloidosmotischen Druck verantwortlich und verursacht folglich ein vermindertes Zellvolumen. Durch die vorliegenden Experimente wird gezeigt, dass die erkrankten Zellen sowohl bei physiologischen, als auch bei pathologischen Bedingungen kleiner sind. Da nun der bereits erwähnte Kationenkanal durch Zellschrumpfung aktiviert wird, könnte dieses als Erklärungsmodell für den pathophysiologischen Mechanismus dienen. Während die Zunahme von  $\text{Na}^+$  in der Zelle zu steigendem Volumen führt, könnte  $\text{Ca}^{2+}$  den gegenteiligen Effekt hervorrufen. Die Zunahme des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert den GARDOS-Kanal (18; 47). Die darauffolgende sofortige Hyperpolarisation der Zellmembran führt zu einem  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom und zum zellulären Verlust von  $\text{KCl}$  der Zelle. Durch den entstehenden osmotischen Gradienten verliert die Zelle zudem Wasser, was unvermeidlich eine zelluläre Schrumpfung nach sich zieht.

Die Inhibition der durch Blei induzierten Annexinbindung und Zellschrumpfung mit Clotrimazol und hohen extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen beweist den Zusammenhang zwischen Volumenveränderung und Phosphatidylserinexposition. Volumenverluste können daher über einen zellulären  $K^+$ -Verlust die Aktivierung der Scramblase veranlassen und dadurch die erythrozytäre Apoptose stimulieren. Dieser Mechanismus wurde bei kernhaltigen Zellen bereits mehrfach beschrieben (27; 28; 77; 93; 94; 137; 150).

Mittels Lichtmikroskopie konnte der Volumenverlust inklusive Konstitutionsänderung der bleiexponierten Erythrozyten bestätigt werden. Auch die FACS-Analysen ergaben einen verminderten Forward Scatter und deuteten auf reduzierte Zellvolumina hin. Die Behandlung mit Blei deformierte und verkleinerte somit die bikonkaven in echinozytäre Erythrozyten dosisabhängig.

Die bisherige Nomenklatur des Befundes im Blutaussstrich bei chronischer Bleivergiftung „basophil getüpfelt“ könnte also durchaus ein passendes deskriptives Korrelat für das lichtmikroskopische Bild eines bleigeschädigten Erythrozyten sein.

## **4.7. Fehlerdiskussion**

### **4.7.1. Detektion der Apoptose durch Annexinbindung**

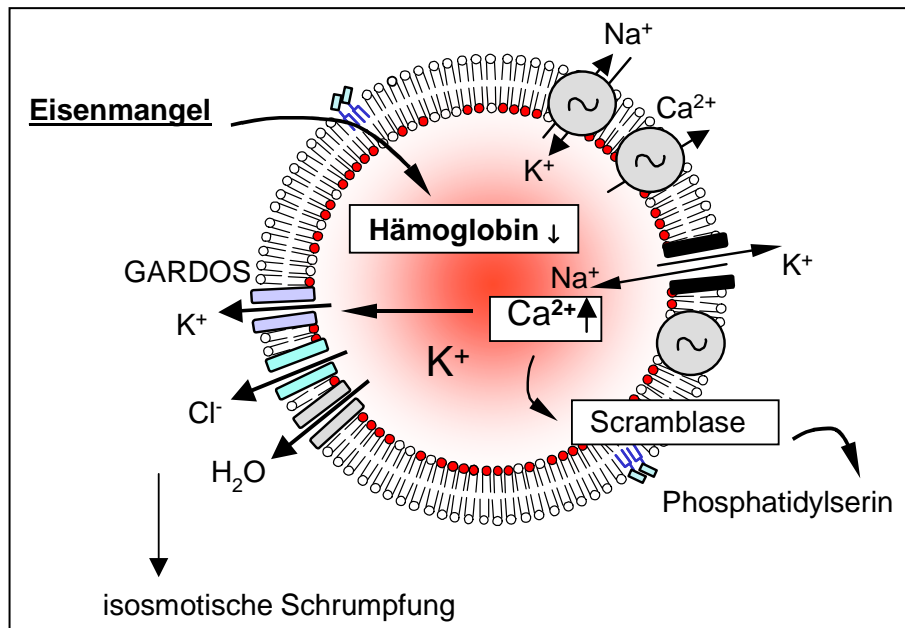
In der Standardmethode zur Verwendung von Annexin-V-Fluos zur Erfassung der Apoptoserate ist die Doppelfärbung mit Propidiumiodid vorgesehen. Dabei handelt es sich um ein fluoreszierendes Molekül mit den Eigenschaften eines hochspezifischen Farbstoffs für DNS. Es interkaliert in doppelsträngige DNS und verändert anschließend sowohl die Anregungs-, als auch die Emissionswellenlänge. Da Propidiumiodid die Zellmembran von toten Zellen passieren kann, dient es nicht zur Erfassung von lebendem Zellmaterial. Durch diese Kontrolle soll ein verdecktes (stummes) Berücksichtigen nekrotischer Zellen im Rahmen der Apoptoseerfassung, und somit Fehlmessungen vermieden werden.

Da in den Erythrozyten jedoch keine DNS enthalten ist, kann diese Färbemethode nicht angewandt werden. Um eine artifiziell hohe Anzahl apoptotischer Zellen auszuschließen, wurden zusätzlich die Zellzahl und die Hämoglobinkonzentration im Überstand der Versuchsansätze bestimmt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass eine eventuelle „banale“ Hämolyse der Erythrozyten im Annexin-V-Fluos-Versuch detektiert wird. Annexin-V-Fluos bindet entweder nicht an Zelltrümmer oder annexinpositive Zelltrümmer werden in der FACS-Analyse nicht erfasst, da in Versuchsansätzen mit überwiegend nekrotischem Zellmaterial bei der Durchführung der Durchflusszytometrie die erfasste Zellzahl gegen Null geht.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

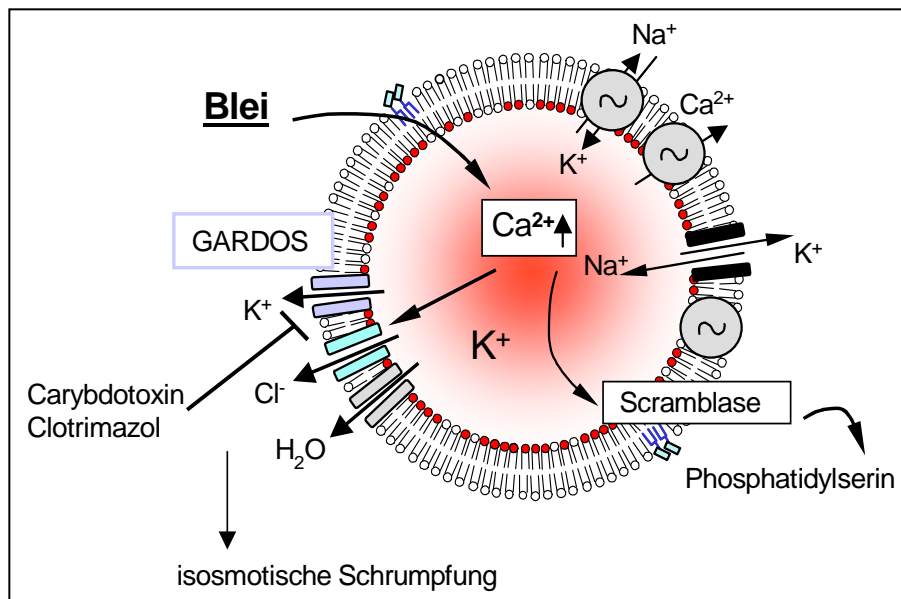
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Eisenmangelanämie (Abb. 37) und Bleiintoxikation (Abb. 38) die Empfindlichkeit der Erythrozyten für stressinduzierte Apoptose verstärkt.

Dieser Effekt ist nicht zuletzt auf die verstärkte Aktivität des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kationenkanals zurückzuführen. Die zelluläre Zunahme des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  durch Aktivierung dieses Kanals wiederum aktiviert die Scramblase. Dies zieht nun unmittelbar die Präsentation von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran und die Aktivierung des GARDOS-Kanals mit einem anschließenden Verlust von  $\text{KCl}$  und die konsekutive Schrumpfung der Zelle nach sich.



**Abbildung 45:** Schaubild der durch Eisenmangel induzierten „Apoptose-Kaskade“

Die bereits beschriebenen Mechanismen können für das beschleunigte Recycling der Erythrozyten im Kreislauf verantwortlich sein und möglicherweise die Symptome der Blei-induzierten Anämie, sowie der Eisenmangelanämie erklären. Die Studie eröffnet somit neue Aspekte bezüglich der pathophysiologischen Ursachen für eine Anämie.



**Abbildung 46:** Veranschaulichung des durch Blei verursachten Signalwegs

Ferner entstehen hieraus Ideen für neue Behandlungsansätze. Dazu gehören potentielle Hemmstoffe der erythrozytären Apoptose als Medikamente gegen verschiedene Anämieformen. Durch ihre Anwendung wäre das Ausmaß der Symptomkomplikationen möglicherweise geringer und die Indikationsstellung für eine Blut-Transfusion möglicherweise dehnbar. Die Prognose der chronischen Herzinsuffizienz wird beispielsweise durch eine Anämie entscheidend verschlechtert (50) und verbessert sich durch deren adäquate Behandlung. Ein medikamentöses Eingreifen wäre durch das detaillierte Wissen über die pathophysiologischen Entstehungsmechanismen der Anämie erheblich erleichtert.



## 6. LITERATUR

### 6.1. Publikationsverzeichnis

1. Akel A., Hermle T., Niemoeller O.M., **Kempe D.S.**, Lang P.A., Attanasio P., Podolski M., Wieder T., Lang F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol*; 532:11-7.
2. Birka C., Lang P.A., **Kempe D.S.**, Hoefling L., Tanneur V., Durantou C., Nammi S., Henke G., Myssina S., Krikov M., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2004). Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch*; 448:471-7.
3. Eisele K., Lang P.A., **Kempe D.S.**, Klarl B.A., Niemoeller O., Wieder T., Huber S.M., Durantou C., Lang F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol*; 210:116-22.
4. Hermle T., Shumilina E., Attanasio P., Akel A., **Kempe D.S.**, Lang P.A., Podolski M., Gatz S., Bachmann R., Bachmann C., Abele H., Huber S., Wieder T., Lang F. (2006). Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*; in press.
5. **Kempe D.S.**, Lang P.A., Eisele K., Klarl B.A., Wieder T., Huber S.M., Durantou C., Lang F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol*; 288:C396-402.
6. **Kempe D.S.**, Lang P.A., Durantou C., Akel A., Lang K.S., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2006). Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J*; 20:368-70.
7. **Kempe D.S.**, Akel A., Lang P.A., Hermle T., Biswas R., Muresanu J., Friedrich B., Wolz C., Schumacher U., Peschel A., Goetz F., Döring G., Wieder T., Gulbins E., Lang F. (2006). Suicidal erythrocyte death in sepsis; in press.
8. Klarl B.A., Lang P.A., **Kempe D.S.**, Niemoeller O.M., Akel A., Sobiesiak M., Eisele K., Podolski M., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2006). Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*; 290:C244-53.

9. Lang K.S., Myssina S., Lang P.A., Tanneur V., **Kempe D.S.**, Mack A.F., Huber S.M., Wieder T., Lang F., Duranton C. (2004). Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl<sup>-</sup>. *Am J Physiol Renal Physiol*; 286:1046-53.
10. Lang P.A., **Kempe D.S.**, Akel A., Klarl B.A., Eisele K., Podolski M., Hermle T., Niemoeller O.M., Attanasio P., Huber S.M., Wieder T., Lang F., Duranton C. (2005). Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 372:228-35.
11. Lang P.A., **Kempe D.S.**, Myssina S., Tanneur V., Birka C., Laufer S., Lang F., Wieder T., Huber S.M. (2005). PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*; 12:415-28.
12. Lang P.A., **Kempe D.S.**, Tanneur V., Eisele K., Klarl B.A., Myssina S., Jendrossek V., Ishii S., Shimizu T., Waidmann M., Hessler G., Huber S.M., Lang F., Wieder T. (2005). Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*; 118:1233-43.
13. Lang P.A., Beringer O., Nicolay J.P., Amon O., **Kempe D.S.**, Hermle T., Attanasio P., Akel A., Schafer R., Friedrich B., Risler T., Baur M., Olbricht C.J., Zimmerhackl L.B., Zipfel P.F., Wieder T., Lang F. (2006). Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med*; 84:378-88.
14. Myssina S., Lang P.A., **Kempe D.S.**, Kaiser S., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2004). Cl<sup>-</sup> channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca<sup>(2+)</sup>-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem*; 14:241-8.

## 6.2 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*; 3:745-756.
2. Akel A., Hermle T., Niemoeller O.M., Kempe D.S., Lang P.A., Attanasio P., Podolski M., Wieder T., Lang F. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol*; 532:11-17.
3. Allan D., Billah M.M., Finean J.B., Michell R.H. (1976). Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular Ca<sup>(2+)</sup>. *Nature*; 261: 58-60.
4. Allan D., Watts R., Michell R.H. (1976). Production of 1,2-diacylglycerol and phosphatidate in human erythrocytes treated with calcium ions and ionophore A23187. *Biochem J*; 156: 225-232.
5. Ameisen J.R. (2005). Selective „death programs“ or pleiotropic „life programs“? Looking for programmed cell death in the light of evolution. *J Soc Biol*; 199:175-189.
6. Anderson D.R., Davis J.L., Carraway K.L. (1977). Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. Involvement of spectrin, transglutaminase, and a membrane-bound protease. *J Biol Chem*; 252:6617-6623.
7. Andree H.A.M., Reutelingsperger C.P.M., Hauptman R., Hemker H.C., Hermens W.Th., Willems G.M. (1990). Binding of vascular anticoagulant a (VACa) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*; 265:4923.
8. Andrews D.A., Yang L., Low P.S. (2002). Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood*; 100:3392-3399.
9. Ashkenazi A., Dixit V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*; 281:1305-1308.
10. Bar P.R. (1996). Apoptosis-the cell's silent exit. *Life Sci*; 59:369-378.
11. Barbosa F. Jr., Tanus-Santos J.E., Gerlach R.F., Parsons P.J. (2005). A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations and future needs. *Environ Health Perspect*; 113:1669-1674.

12. Barnoy S., Glaser T., Kosower N.S. (1997). Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors. *Biochem Biophys Acta*; 1358:181-188.
13. Barrett M.J., Goll D.E., Thompson V.F. (1991). Effect of substrate on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration required for activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteinases,  $\mu$ - and  $m$ -calpain. *Life Sci*; 48:1659-1669.
14. Barry P.H., Lynch J.W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol*; 121:101-117.
15. Baud V., Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*; 11:372-377.
16. Beaumont C., Canonne-Hergaux F. (2005). Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin. *Transfus Clin Biol*; 12: 123-130.
17. Bellinger D.C. (2005). Teratogen update: lead and pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*; 73:409-420.
18. Bennekou P. (1993). The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochim Biophys Acta*; 1147:165-167.
19. Berg C.P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*; 8:1197-1206.
20. Bevers E., Comfurius P., Dekkers D., Zwaal R. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*; 1439: 317-330.
21. Bilmen S., Aksu T.A., Gumuslu S., Korgun D.K., Canatan D. (2001). Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta*; 303:83-86.
22. Birka C., Lang P.A., Kempe D.S., Hoefling L., Tanneur V., Duranton C., Nammi S., Henke G., Myssina S., Krikov M., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2004). Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch*; 448:471-477.
23. Blanchard H., Kodandapani L., Mittl P.R., Marco S.D., Krebs J.F., Wu J.C., Tomaselli K.J., Grutter M.G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des*; 7:1125-1133.

24. Boas F.E., Forman L., Beutler E. (1998). Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:3077-3081.
25. Bookchin R.M., Ortiz O.E., Lew V.L. (1987). Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res*; 240:193-200.
26. Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1998). A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol*; 56:1549-1559.
27. Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K<sup>(+)</sup>, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem*; 274:21953-21962.
28. Bortner C.D., Hughes F.M. Jr., Cidlowski J.A. (1997). A primary role for K<sup>(+)</sup> and Na<sup>(+)</sup> efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*; 272:32436-32442.
29. Brand V.B., Sandu C.D., Duranton C., Tanneur V., Lang K.S., Huber S.M., Lang F. (2003). Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem*; 13:347-356.
30. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. (2001). Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ*; 8:1143-1156.
31. Brugnara C., de Franceschi L., Alper S.L. (1993). Inhibition of Ca<sup>(2+)</sup>-dependent K<sup>(+)</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*; 92:520-526.
32. Brunsting A., Mullaney P.F. (1974). Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J*; 14:439-453.
33. Cai J., Jones D.P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*; 273:11401-11404.
34. Cariers A., Reinehr R., Fischer R., Warskulat U., Haussinger D. (2002). c-Jun- N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem*; 12:179-186.
35. Carson D.A., Lois A. (1995). Cancer progression and p53. *Lancet*; 346:1009-1111.

36. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 72:3666-3670.
37. Cassarino D.S., Bennett J.P. (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev*; 29:1-25.
38. Chai J., Du C., Wu J.W., Kyin S., Wang X., Shi Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*; 406:855-862.
39. Chan S.L., Mattson M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*; 58:167-190.
40. Chao D.T., Korsmeyer S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*; 16:395-419.
41. Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*; 81:505-512.
42. Christophersen P., Bennekou P. (1991). Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta*; 1065:103-106.
43. Cohen C.M., Gascard P. (1992). Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol*; 29:244-292.
44. Cook J.D. (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*; 18:319-332.
45. Cotman C.W., Anderson A.J. (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*; 10:19-45.
46. Counter S.A., Buchanan L.H., Ortega F., Rifai N. (2000). Blood lead and hemoglobin levels in Andean children with chronic lead intoxication. *Neurotoxicology*; 21:301-308.
47. Coupry I., Armsby C.C., Alper S.L., Brugnara C., Parini A. (1996). Clotrimazole and efaroxan inhibit red cell Gardos channel independently of imidazoline I1 and I2 binding sites. *Eur J Pharmacol*; 295: 109-112.
48. Creutz C.E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science*; 258:924-931.

49. Crompton M., Virji S., Doyle V., Johnson N., Ward J.M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp*; 66:167-179.
50. Crosato M., Steinborn W., Anker SD. (2003). Anemia in chronic congestive heart failure: frequency, prognosis, and treatment. *Heart Fail Monit*; 4:2-6.
51. Damonte G., Guida L., Sdraffa A., Benatti U., Melloni E., Forteleoni G., Meloni T., Carafoli E., De Flora A. (1992). Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell Calcium*; 13:649-658.
52. Danial N.N., Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*; 116:205-219.
53. Daniel P.T., Wieder T., Sturm I., Schulze-Osthoff K. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*; 15:1022-1032.
54. Daugas E., Cande C., Kroemer G. (2001). Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*; 8:1131-1133.
55. De Sousa F.T., Prata M.M., Barbas J.V., dos Santos J.P. (1990). Treatment of anemia in patients with chronic renal insufficiency undergoing hemodialysis with recombinant human erythropoietin: 12 months' experience. *Acta Med Port*; 3:347-352.
56. Del Carlo B., Pellegrini M., Pellegrino M. (2002). Calmodulin antagonists do not inhibit IK(Ca) channels of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; 1558:133-141.
57. Deveraux Q.L., Reed J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*; 13:239-252.
58. Drasch G.A. (1982). Lead burden in prehistorical, historical and modern human bones. *Sci Total Environ*; 24:199-231.
59. Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*; 102:33-42.
60. Dunn P.M. (1998). The action of blocking agents applied to the inner face of Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>(+)</sup> channels from human erythrocytes. *J Membr Biol*; 165:133-143.
61. Durantou C., Huber S.M., Lang F. (2002). Oxidation induces a Cl<sup>(-)</sup>-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*; 539:847-855.

62. Eda S., Sherman I.W. (2002). Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem*; 12:373-384.
63. Eisele K., Lang P.A., Kempe D.S., Klarl B.A., Niemoeller O., Wieder T., Huber S.M., Durantou C., Lang F. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol*; 210:116-122.
64. Fadeel B., Orrenius S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*; 258:479-512.
65. Fadok V.A., de Cathelineau A., Daleke D.L., Henson P.M., Bratton D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*; 276:1071-1077.
66. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*; 148:2207.
67. Fischer U., Janicke R.U., Schulze-Osthoff K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*; 10:76-100.
68. Fölsch U.R., Kochsiek K., Schmidt R.F. (2000). *Pathophysiologie*, Springer Verlag, Berlin.
69. Fontana V., Baldi R., Franchini M., Gridelli P., Neri R., Palmieri F., Puntoni R., Ricco U., Parodi S. (2004). Adverse haematological outcome and environmental lead poisoning. *J Expo Anal Environ Epidemiol*; 14:188-193.
70. Frago L.M., Leon Y., de la Rosa E.J., Gomez-Munoz A., Varela-Nieto I. (1998). Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci*; 111:549-556.
71. Franco R.S., Palascak M., Thompson H., Rucknagel D.L., Joiner C.H. (1996). Ehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium. *Blood*; 88:4359-4365.
72. Gardos G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; 30:653.



73. Gerner C., Gotzmann J., Frohwein U., Schamberger C., Ellinger A., Sauermann G. (2002). Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. *Cell Death Differ*; 9:671-681.
74. Goldkorn T., Balaban N., Shannon M., Chea V., Matsukuma K., Gilchrist D., Wang H., Chan C. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci*; 111:3209-3220.
75. Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I., Green D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*; 2:156-162.
76. Golstein P., Ojcius D.M., Young J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*; 121:29-65.
77. Gomez-Angelats M., Bortner C.D., Cidlowski J.A. (2000). Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K<sup>(+)</sup> and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J Biol Chem*; 275:19609-19619.
78. Green D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*; 94:695-698.
79. Green D.R., Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*; 305:626-629.
80. Green D.R., Reed J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*; 281:1309-1312.
81. Grygorczyk R., Schwarz W. (1983). Properties of the Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>(+)</sup> conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium*; 4:499-510.
82. Gulson B., Mizon K., Tylor A., Korsch M., Stauber J., Davis J.M., Louie H., Wu M., Swan H. (2006). Changes in manganese and lead in the environment and young children associated with the introduction of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline-preliminary results. *Environ Res*; 100:100-114.
83. Head D.J., Lee Z.E., Poole J., Avent N.D. (2005). Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *Br J Haematol*; 129:130-137.
84. Head D.J., Lee Z.E., Swallah M.M., Avent N.D. (2005). Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability in vitro. *Br J Haematol*; 130:788-790.

85. Hennemann H.H. (1991). Hämatologie. Schattauer Verlag, Stuttgart.
86. Hernández-Serrato M.I., Mendoza-Alvarado L.R., Rojas-Martínez R., González-Garza C., Hulme J.M., Olaiz-Fernández G. (2003). Factors associated with lead exposure in Oaxaca, Mexico. *J Expo Anal Environ Epidemiol*; 13:341–347.
87. Herold G. (2004). Innere Medizin. Gerd Herold, Köln.
88. Hoffman J.F., Joiner W., Nehrke K., Potapova O., Foye K., Wickrema A. (2003). The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100:7366-7371.
89. Hokama T., Gushi Ken M., Nosoko N. (2005). Iron deficiency anaemia and child development. *Asia Pac J Public Health*; 17:19-21.
90. Homburg C.H., de Haas M., von dem Borne A.E., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P., Roos D. (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*; 85:532-540.
91. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*; 81:495-504.
92. Huber S.M., Gamper N., Lang F. (2001). Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch*; 441:551-558.
93. Hughes F.M. Jr. and Cidlowski J.A. (1999). Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Adv Enzyme Regul*; 39:157-171.
94. Hughes F.M. Jr., Bortner C.D., Purdy G.D., Cidlowski J.A. (1997). Intracellular K<sup>+</sup> suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem*; 272:30567-30576.
95. Joiner C.H., Morris C.L., Cooper E.S. (1993). Deoxygenation-induced cation fluxes in sickle cells. III. Cation selectivity and response to pH and membrane potential. *Am J Physiol*; 264:734-744.
96. Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Pflucker J.C., Kroemer G., Penninger J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*; 410:549-554.

97. Kalambur V.S., Mahaseth H., Bischof J.C., Kielbik M.C., Welch T.E., Vilback A., Swanlund D.J., Hebbel R.P., Belcher J.D., Vercellotti G.M. (2004). Microvascular blood flow and stasis in transgenic sickle mice: utility of a dorsal skin fold chamber for intravital microscopy. *Am J Hematol*; 77:117-125.
98. Karow T., Lang-Roth R. (2004). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*. Karow, Pulheim.
99. Kaul P.P., Srivastava R., Srivastava S.P., Kamboj M., Chand S. (2002). Relationships of maternal blood lead and disorders of pregnancy to neonatal birthweight. *Vet Hum Toxicol*; 44:321-323.
100. Kempe D.S., Akel A., Lang P.A., Hermle T., Biswas R., Muresanu J., Friedrich B., Wolz C., Schumacher U., Peschel A., Goetz F., Döring G., Wieder T., Gulbins E., Lang F. (2006). Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med*; in press.
101. Kennan R.P., Suzuka S.M., Nagel R.L., Fabry M.E. (2004). Decreased cerebral perfusion correlates with increased BOLD hyperoxia response in transgenic mouse models of sickle cell disease. *Magn Reson Med*; 51:525-532.
102. Kiefer C.R., Snyder L.M. (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol*; 7:113-116.
103. Kienast J., Schmitz G. (1990). Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*; 75:116-121.
104. Kitagaki H., Tomioka S., Yoshizawa T., Sorimachi H., Saido T.C., Ishiura S., Suzuki K. (2000). Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. *Biosci Biotechnol Biochem*; 64:689-695.
105. Klarl B.A., Lang P.A., Kempe D.S., Niemoeller O.M., Akel A., Sobiesiak M., Eisele K., Podolski M., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2005). Protein kinase C mediates erythrocyte „programmed cell death“ following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*; 290:244-253.
106. Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*; 275:1132-1136.
107. Kolesnick R., Fuks Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*; 22:5897-5906.

108. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*; 84:1415-1420.
109. Krammer P.H. (1999). CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*; 71:163-210.
110. Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*; 60:619-642.
111. Lane D.P.(1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*; 358:15-16.
112. Lang F. (2000). *Basiswissen Physiologie*; Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
113. Lang F., Lepple-Wienhues A., Paulmichl M., Szabo I., Siemen D., Gulbins E. (1998). Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*; 8:285-292.
114. Lang F., Ritter M., Gamper N., Huber S., Fillon S., Tanneur V., Lepple-Wienhues A., Szabo I., Gulbins E. (2000). Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*; 10:417-428.
115. Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M. (2003). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*; 10:249-256.
116. Lang K.S., Myssina S., Brand V., Sandu C., Lang P.A., Berchtold S., Huber S.M., Lang F., Wieder T. (2004). Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*; 11:231-243.
117. Lang K.S., Myssina S., Tanneur V., Wieder T., Huber S.M., Lang F., Duranton C. (2003). Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*; 367:391-396.
118. Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H.G., Kanz L., Fritz J., Lang F., Huber S.M., Wieder T. (2002). Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem*; 12:365-372.

119. Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. (2003). Role of Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>(+)</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*; 285:C1553-1560.
120. Lang P.A., Kempe D.S., Akel A., Klarl B.A., Eisele K., Podolski M., Hermle T., Niemoeller O.M., Attanasio P., Huber S.M., Wieder T., Lang F., Duranton C. (2005). Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*; 372:228-235.
121. Lang P.A., Kempe D.S., Myssina S., Tanneur V., Birka C., Laufer S., Lang F., Wieder T., Huber S.M. (2005). PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*; 12:415-428.
122. Lang P.A., Kempe D.S., Tanneur V., Eisele K., Klarl B.A., Myssina S., Jendrossek V., Ishii S., Shimizu T., Waidmann M., Hessler G., Huber S.M., Lang F., Wieder T. (2005). Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*; 118:1233-1243.
123. Lang P.A., Houber J., Bachmann C., Kempe DS., Sobiesak M., Akel A., Niemoeller M.O., Dreischer P., Eisele K., Klarl K.A., Gulbins E., Lang F., Wieder T. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem*; 18:151-164.
124. Leinders T., van Kleef R.G., Vijverberg H.P. (1992). Single Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>(+)</sup> channels in human erythrocytes: Ca<sup>(2+)</sup> dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim Biophys Acta*; 1112:67-74.
125. Li L.Y., Luo X., Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; 412:95-99.
126. Lockshin R.A. (2005). Programmed cell death: history and future of a concept. *J Soc Biol*; 199:169-173.
127. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; 104:487-501.
128. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-490.
129. Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A., Okada Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97:9487-9492.

130. Mandal D., Mazumder A., Das P., Kundu M., Basu J. (2005). Fas-, Caspase 8-, and Caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem*; 280:39460-39467.
131. Mandal D., Moitra P.K., Saha S., Basu J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett*; 513:184-188.
132. Matarrese P., Straface E., Pietraforte D., Gambardella L., Vona R., Maccaglia A., Minetti M., Malorni W. (2005). Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB*; 19:416-418.
133. McCarthy D.A., Macey M.G. (2001). *Cytometric analysis of cell phenotype and function*. Cambridge University Press.
134. Messmer U.K., Pfeilschifter J. (2000). New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays*; 22:878-881.
135. Michea L., Ferguson D.R., Peters E.M., Andrews P.M., Kirby M.R., Burg M.B. (2000). Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol*; 278:209-218.
136. Minetti G., Piccinini G., Balduini C., Seppi C., Brovelli A. (1996). Tyrosine phosphorylation of band 3 protein in  $\text{Ca}^{2+}$ /A23187-treated human erythrocytes. *Biochem J*; 320:445-450.
137. Montague J.W., Bortner C.D., Hughes F.M. Jr., Cidlowski J.A. (1999). A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. *Steroids*; 64:563-569.
138. Myssina S., Huber S.M., Birka C., Lang P.A., Lang K.S., Friedrich B., Risler T., Wieder T., Lang F. (2003). Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol*; 14:2750-2757.
139. Myssina S., Lang P.A., Kempe D.S., Kaiser S., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2004).  $\text{Cl}^-$ -channel blockers NPPB and niflumic acid blunt  $\text{Ca}^{2+}$ -induced erythrocyte "apoptosis". *Cell Physiol Biochem*; 14:241-248.
140. Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*; 88:355-365.
141. Naha N., Bhar R.B., Mukherjee A., Chowdhury A.R. (2005). Structural alteration of spermatozoa in the persons employed in lead acid battery factory. *Indian J Physiol Pharmacol*; 49:153-162.

142. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; 403:98-103.
143. Nicholson D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*; 6:1028-1042.
144. Nicholson D.W., Thornberry N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*; 22:299-306.
145. Nunomura W., Takakuwa Y., Tokimitsu R., Krauss S.W., Kawashima M. Mohandas N. (1997). Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by  $Ca^{2+}$  and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem*; 272:30322-30328.
146. Oberdisse E., Hackenthal E., Kuschinsky K. (1999). *Pharmakologie und Toxikologie*, Springer Verlag, Heidelberg.
147. Ogretmen B., Hannun Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*; 4:604-616.
148. Pahl H.L., Baeuerle P.A. (1995). A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J*; 14:2580-2588.
149. Pellegrino M., Pellegrini M. (1998). Modulation of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch*; 436:749-756.
150. Perez G.I., Maravei D.V., Trbovich A.M., Cidlowski J.A., Tilly J.L., Hughes F.M. Jr. (2000). Identification of potassium-dependent and – independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. *Biol Reprod*; 63: 1358-1369.
151. Pozzi S., Malferrari G., Biunno I., Samaja M. (2002). Low-flow ischemia and hypoxia stimulate apoptosis in perfused hearts independently of reperfusion. *Cell Physiol Biochem*; 12:39-46.
152. Raisova M., Bektas M., Wieder T., Daniel P., Eberle J., Orfanos C.E., Geilen C.C. (2000). Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett*; 473:27-32.
153. Reichl F. (2002). *Taschenatlas der Toxikologie*, Thieme Verlag, Stuttgart.
154. Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (2004). *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban&Fischer Verlag, München.

155. Rico J.A., Kordas K., Lopez P., Rosado J.L., Vargas G.G., Ronquillo D., Stoltzfus R.J. (2006). Efficacy of iron and/or zinc supplementation on cognitive performance of lead-exposed Mexican schoolchildren: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics*; 117:518-527.
156. Roempp. *Chemie Lexikon* (2006). Georg Thieme Verlag.  
URL: <http://www.roempp.com/prod/roempp.php>
157. Romero P.J., Romero E.A. (1999). Effect of cell ageing on  $\text{Ca}^{2+}$  influx into human red cells. *Cell Calcium*; 26:131-137.
158. Rosette C., Karin M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*; 274:1194-1197.
159. Salamino F., De Tullio R., Mengotti P., Viotti P.L., Melloni E., Pontremoli S. (1993). Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. *Biochem J*; 290:191-197.
160. Salvesen G.S., Duckett C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3:401-410.
161. Sarasin A., Stary A. (1997). Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev*; 21:406-411.
162. Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*; 343:170-173.
163. Schmitz I., Walczak H., Krammer P.H., Peter M.E. (1999). Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ*; 6:821-822.
164. Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*; 254:439-459.
165. Schwarz W. (1983). Properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium*; 4:499-510.
166. Shannon M. (2003). Severe lead poisoning in pregnancy. *Ambul Pediatr*; 3:37-39.
167. Shapiro, Howard M. (2003). *Practical Flow Cytometry*, Wiley-Liss, New York.



168. Shimoda M., Yawata Y. (1985). A marked increase of calcium uptake in the ATP-depleted red cells of patients with iron deficiency. *Am J Hmatol*;19:55-61.
169. Shindo M., Imai Y., Sohma Y. (2000). A novel type of ATP block on a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel from bullfrog erythrocytes. *Biophys J*; 79:287-297.
170. Simons T.J. (1986). Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *J Physiol*; 378: 267-286.
171. Smith S.K., Farnbach A.R., Harris F.M., Hawes A.C., Jackson L.R., Judd A.M., Vest R.S., Sanchez S., Bell J.D. (2001). Mechanisms by which intracellular calcium induces susceptibility to secretory phospholipase A2 in human erythrocytes. *J Biol Chem*; 276:22732-22741.
172. Sood A., Midha V., Sood N. (2002). Pain in abdomen - do not forget lead poisoning. *Indian J Gastroenterol*; 21:225-226.
173. Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*; 328:721-732.
174. Sorimachi H., Kawabata Y. (2003). Calpain and pathology in view of structure-function relationships. *Folia Pharmacol Jpn*; 122:21-29.
175. Stober T., Stelte W., Kunze K. (1983). Lead concentrations in blood, plasma, erythrocytes, and cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*; 61:21-26.
176. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*; 69:217-245.
177. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397:441-446.
178. Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*; 1010:186-194.
179. Tanaka T., Kadowaki K., Lazarides E., Sobue K. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem*; 266:1134-1140.

180. Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., Goeddel D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*; 74:845-853.
181. Tatton W.G., Chalmers-Redman R., Brown D., Tatton N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*; 53:61-70.
182. Thews G., Vaupel P. (2005). *Vegetative Physiologie*. Springer Verlag, Heidelberg.
183. Thompson C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267:1456-1462.
184. Tiffert T., Lew V.L. (1997). Cytoplasmic calcium buffers in intact human red cells. *J. Physiol*; 500:139-154.
185. Twomey C., McCarthy J.V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med*; 9:345-359.
186. Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*; 102:43-53.
187. Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*; 182:1597-1601.
188. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*; 184:39-51.
189. Vlcek K., Senholdova Z., Pelcova D., Zak J., Surovcova H. (2005). Severe lead intoxication after ingestion of lead shots. *Cas Lek Cesk*; 144:282-284.
190. Wagner M.C., Eckman J.R., Wick T.M. (2004). Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med*; 144:260-267.
191. Wieder T., Orfanos C.E., Geilen C.C. (1998). Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem*; 273:11025-11031.

192. Wieder T., Essmann F., Prokop A., Schmelz K., Schulze-Osthoff K., Beyaert R., Dorken B., Daniel P.T. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*; 97:1378-1387.
193. Wieder T., Prokop A., Bagci B., Essmann F., Bernicke D., Schulze-Osthoff K., Dorken B., Schmalz H.G., Daniel P.T., Henze G. (2001). Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia*; 15:1735-1742.
194. Yan P., Xiong Y., Chen B., Negash S., Squier T.C., Mayer M.U. (2006). Fluorophore-assisted light inactivation of calmodulin involves singlet-oxygen mediated cross-linking and methionine oxidation. *Biochemistry*; 45:4736-4748.
195. Yoshida H., Kawane K., Koike M., Mori Y., Uchiyama Y., Nagata S. (2005). Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*; 437:754-758.
196. Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ishiura S., Suzuki K. (1995). Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun*; 208:376-383.
197. Zhou Q., Zhao J., Stout J.G., Luhm R.A., Wiedmer T., Sims P.J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem*; 272:18240-18244.

## 7. DANKSAGUNG

Der erfolgreiche Abschluss meiner experimentellen Arbeit im Erythrozytenlabor des Physiologischen Instituts in Tübingen wurde mitunter durch die Hilfe und kollegiale Zusammenarbeit des Erythrozytenlabor-Teams ermöglicht.

Deshalb möchte ich mich herzlich bei diesem Team für die tolle Kooperation bedanken. Die loyale Atmosphäre und der anhaltende Eifer haben das Arbeiten angenehm gestaltet und sehr viel Spaß bereitet.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Laborleiter Herr PD Dr. rer. nat. Thomas Wieder, der bei Experimenten zur radioaktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung mit seinem weitreichenden Fachwissen eine große Hilfe war und während der ganzen Zeit unser Team unterstützt hat.

Für die Hilfe bei den Patch-clamp-Versuchen möchte ich mich bei Ph. D. Christoph Durantou herzlich bedanken.

Fachkundige Unterstützung und Mithilfe bei der Anwendung und Umsetzung der statistischen Methodik hat mir Herr Prof. Dr. rer. nat. Klaus Dietz geboten. Für seine Bemühungen möchte ich mich herzlich bedanken.

Die Motivation für die Arbeit im Labor und den Spaß an der Wissenschaft hat mein Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang sehr gefördert und unterstützt. Für die Überlassung des interessanten Themas gilt ihm mein besonderer Dank.

Natürlich auch an alle meine Freunde ein herzliches Dankeschön für die Geduld und Unterstützung auch während meinen arbeitsintensiven Phasen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, die mir auf meinem bisherigen Weg größtes Vertrauen in allen Lebenslagen entgegengebracht haben, meine große und aufrichtige Dankbarkeit aussprechen.

## 8. LEBENS LAUF

### *Zur Person*

---

Daniela Stefanie Kempe, geboren am 05.01.1981 in Mutlangen als Tochter von Dipl. Ing. Dieter Kempe und Rosemarie Kempe, geborene Schuster, Lehrerin für Sport und Englisch.

### *Schulbildung*

---

2000 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife an der Agnes-von-Hohenstaufenschule in Schwäbisch Gmünd (Note 1,7)

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Latein

Leistungsfächer: Chemie/Ernährungslehre, Englisch

### *Hochschulausbildung*

---

2001 Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Fach Humanmedizin

31.03.2003 Ärztliche Vorprüfung (Note 1,66)

Mai 2003 Beginn der Promotionsarbeit am Physiologischen Institut der Universität Tübingen

Okt. 2004 Teilnahme am IZKF- Promotionskolleg in Tübingen

20.11.2007 Ärztliche Prüfung (Note 2,0)