

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Tübingen,
Abteilung Physiologie I
Leiter: Professor Dr. F. Lang

**Die Rolle der Proteinkinase C im Apoptoseprogramm
der Erythrozyten nach Glukosedepletion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Barbara Annette Klari

aus Ehingen/Donau

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

Meiner Mutter und meinem verstorbenen Vater in Dankbarkeit gewidmet

1. Einleitung

1.1 Apoptose	9
1.1.1 Geschichtlicher Abriss der Apoptose-Forschung	9
1.1.2 Apoptose und ihre Bedeutung für den menschlichen Organismus	10
1.1.3 Der Tod einer Zelle: Apoptose versus Nekrose	12
1.2 Caspasen: Schlüsselenzyme der Apoptose	14
1.2.1 Caspasenaktivierung	18
1.2.2 Regulation der Caspasen	20
1.3 Signalwege der Apoptose in kernhaltigen Zellen	21
1.3.1 Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion	22
1.3.2 Die mitochondriale Apoptoseinduktion	26
1.3.3 Eine neue Entdeckung- die Induktion der Apoptose durch das Endoplasmatische Retikulum	30
1.4 Die Familie der Bcl – 2 Proteine	32
1.5 Erythrozyten	35
1.5.1 Form und Funktion	35
1.5.2 Bildung und Abbau	36
1.5.3 Regulation der Erythropoese	37
1.5.4 Die Eryptose- das Apoptoseprogramm der Erythrozyten	38
1.5.5 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: Ca ²⁺ -abhängiger Signalweg.	39
1.5.6 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: Ca ²⁺ -unabhängiger Signalweg	42
1.5.7 Rolle der Caspasen in Erythrozyten	43
1.5.8 Physiologische Relevanz	43

1.6 Proteinkinase C	44
1.6.1. Isoenzyme der Proteinkinase C Familie	44
1.6.2. Aktivierung der Proteinkinase C	44
1.6.3. Funktionen der Proteinkinase C	45
1.7 Fragestellung der Arbeit	46
2. Materialien und Methoden	
2.1 Erythrozyten	47
2.1.1 Blutzellen und Aufreinigung der Erythrozyten	47
2.1.2 Analyse der Blutzellzahlen in Vollblut und in den Erythrozytenkonzentraten	48
2.2 Verwendete Substanzen	49
2.2.1 Ionomycin	49
2.2.2 PMA	49
2.2.3 Staurosporin	49
2.2.4 K252a	50
2.2.5 Fluo-3/AM	50
2.2.6 Okadaic acid	51
2.2.7 Annexin - V – Fluos	51
2.3 Verwendete Lösungen	52
2.3.1 Ringerlösung	52
2.3.2 Ca ²⁺ -freie Lösung	52
2.3.3 Glukose-freie Lösung	53
2.3.4 Hypertone Lösung 850 mOsm	53
2.3.5 Annexin Waschpuffer	54

2.4 FACS- Analyse	54
2.4.1 Geschichtliches	55
2.4.2 Aufbau und Beschreibung	55
2.4.3 Das Prinzip der Durchflusszytometrie	56
2.4.4 Durchführung einer FACS – Analyse	58
2.4.5 Auswertung der Messdaten	59
2.5 Intrazelluläre Ca²⁺- Messungen -Fluo-3/AM	59
2.6 Proteinkinase C-Aktivitäts- Nachweis	60
2.6.1 Beschreibung des Nachweisverfahrens	60
2.6.2 Inhalt des Proteinkinase C-Kits	60
2.6.3 Durchführung	61
2.7 ATP- Messung	64
2.7.1 Durchführung	64
2.8 Statistik	65
3. Ergebnisse	
3.1 Exposition von Phosphatidylserin	66
3.2 Bestimmung der Zellgröße	68
3.3 Messung der PKC-Aktivität in Erythrozytenextrakten unter verschiedenen Bedingungen	69
3.4 ATP- Messung	72

3.5 Einfluss des Phosphorylierungsgrades von Proteinen auf die Eryptose	73
3.5.1 Inkubation der Erythrozyten mit Phorbol ester und/oder Okadaic acid	73
3.5.2 Inkubation der Erythrozyten mit K252a- einem Serin-Threonin-Kinaseninhibitor	77
3.5.3 Inkubation der Erythrozyten mit dem PKC- Inhibitor Staurosporin	79
3.6 Wirkungsmechanismus von Okadaic acid	81
3.6.1 Bestimmung des Ca^{2+} -Einstroms- und Messung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration	81
3.6.2 Vergleich der Phosphatidylserinexposition durch Okadainsäure jeweils in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}	83
4. Diskussion	
4.1 Rolle der Proteinkinase C im Apoptoseprogramm von Erythrozyten	84
4.2 Fehlerdiskussion	89
4.2.1 Detektion der Apoptose durch Annexinbindung	89
4.2.2 Begriffsdefinition: Apoptose	90
5. Zusammenfassung	91

6. Literatur

6.1 Publikationsverzeichnis 93

6.2 Literaturverzeichnis 93

7. Anhang

7.1 Danksagung 116

7.2 Lebenslauf 118

1. Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Geschichtlicher Abriss der Apoptose-Forschung

Bis vor ca. 20 Jahren hat man den Zelltod als ein für den Organismus grundsätzlich negatives Ereignis betrachtet. Dass der Zelltod eine wichtige regulatorische Funktion während Entwicklung und Erhalt des Organismus besitzt und damit einen zentralen Teil des Lebens darstellt, war eine überraschende Entdeckung. Bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts wurde der programmierte Zelltod von C. Vogt bei der Untersuchung der Metamorphose bei Amphibien entdeckt (*Vogt, 1842*). Aber erst durch die detaillierte Beschreibung mehr als hundert Jahre später wurden die komplexen morphologischen Veränderungen der Zelle, die beim programmierten Zelltod ablaufen, beschrieben (*Kerr et al., 1972*) und der Begriff „Apoptose“ geprägt.

Der Begriff Apoptose (apo = ab, weg los; ptosis = Senkung) ist aus dem Griechischen entliehen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst.

Kerrs bahnbrechende Entdeckung ließ die Apoptose zu einem der attraktivsten neuen Forschungsgebiete werden.

So wurden fünf Jahre nach Kerrs Veröffentlichung beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die ersten Gene entdeckt, die für die Apoptose verantwortlich sind. Forscher fanden 1977 die Gene, die zur Störung der Apoptose während der Entwicklung führen (*Sulston et al., 1977*) und 13 Jahre später ein tumorerzeugendes Gen, welches bei Überexpression Apoptose verhindert (*McDonnell et al., 1990*).

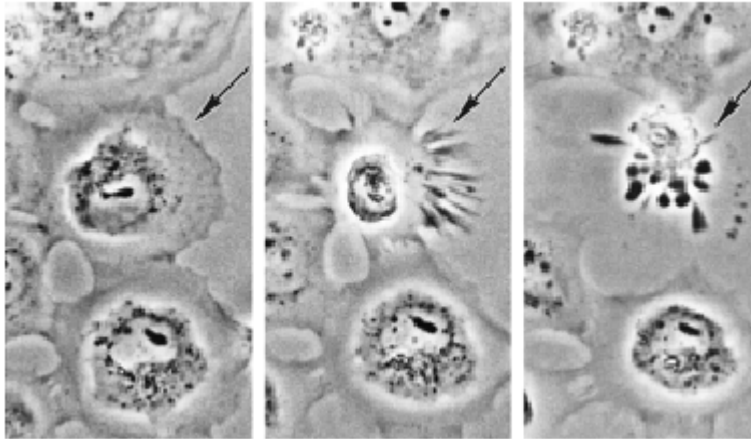


Abbildung 1: Zeitverlauf der Apoptose (nach Schulze-Osthoff, 2002): Die mit einem Pfeil markierte Tumorzelle zeigt typische Veränderungen wie Zellschrumpfung, Membranausstülpungen und die Ablösung vom Untergrund und Zellverband.

1.1.2 Apoptose und ihre Bedeutung für den menschlichen Organismus

Apoptose ist die häufigste Form des Zelltods im Organismus. Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle - so beispielsweise für die korrekte Ausbildung von Händen und Füßen. Aber nicht nur für die Gewebe- und Organplastizität während der Embryogenese, sowie bei Anpassungsprozessen im späteren Leben spielt der programmierte Zelltod die entscheidende Rolle, sondern auch im Immunsystem. Zum Beispiel werden Lymphozyten, die zur Abwehr einer Infektion benötigt und nach Ausheilung der Infektion nicht mehr gebraucht werden, durch Apoptose entfernt und die Immunantwort so abgeschaltet. Weiterhin werden autoreaktive Lymphozyten, die sich gegen körpereigenes Gewebe richten würden, Zellen, die durch Mutationen oder virale Infekte geschädigt sind, durch Apoptose unschädlich gemacht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Apoptose auf physiologische Art und Weise überflüssige oder potentiell schädliche Zellen entfernt werden (*Green und Reed, 1998a*). Damit liegt auf der Hand, dass einer Fehlsteuerung des apoptotischen Programms viele Erkrankungen zugrunde liegen. Zu niedrige Apoptoserate kann z.B. zu Autoimmunstörungen, Diabetes,

Nierenerkrankungen (SLE) und zur Proliferation entarteter Zellen führen (Sarasin und Stary, 1997). Übermäßige Apoptose ist charakteristisch für die Krankheitsbilder von AIDS¹ (Thompson, 1995), neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer (Cotman und Anderson, 1995), M. Parkinson (Tatton et al., 2003) und BSE bzw. Kreuzfeld-Jakob.

Einen Überblick über die Konsequenzen der Dysregulation der Apoptose soll folgende Auflistung bieten:

Tabelle 1: Dysregulation der Apoptose und deren Folgen (nach Sarasin und Stary, 1997; Thompson, 1995; Cotman und Anderson, 1995 ;Tatton et al., 2003)

Erhöhte Apoptoserate	Reduzierte Apoptoserate
Hepatobiliäre Erkrankungen: Primäre sklerosierende Cholangitis Akutes Leberversagen Primäre biliäre Zirrhose Hepatitis Morbus Wilson	Maligne Erkrankungen: Leukämien Lymphome Karzinome
Neurodegenerative Erkrankungen: Morbus Alzheimer Morbus Parkinson Multiple Sklerose Retinopathia pigmentosa Amyotrophe Lateralsklerose	Autoimmunerkrankungen: Lupus erythematodes Rheumatoide Arthritis Hypereosinophilie
Hämatopoetische Erkrankungen Myelodysplastische Syndrome Aplastische Anämie Chronische Leukopenie	Chemotherapieresistenz
Colitis ulcerosa	Latente virale Infektionen
AIDS	

¹ Aquired immunodeficiency sndrome

1.1.3. Der Tod einer Zelle: Apoptose versus Nekrose

Zellen können prinzipiell durch zwei Mechanismen sterben:

a) **Nekrose**

b) **Apoptose**

Die Nekrose ist meist ein pathologischer Prozess und wird häufig durch extreme Abweichungen physiologischer Bedingungen ausgelöst. Zu hohe Temperaturen, toxische Substanzen, mechanische Verletzungen oder Sauerstoffmangel- wie es beim Schlaganfall der Fall ist- werden als Ursache für den nekrotischen Zelltod angesehen. Nach der Kondensation der Kernsubstanz kommt es initial zum Anschwellen der Zellorganellen, was zum Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran und konsekutivem Freisetzen zytoplasmatischer Makromoleküle führt. Diese rufen durch Anlockung von Fresszellen eine lokale Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe hervor. (Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998).

Tabelle 2: Charakteristische morphologische Kriterien der Zellnekrose

Morphologie

- Untergang ganzer Zellgruppen
- Heftige inflammatorische Reaktion
- Zellschwellung, Verteilung des Chromatins und Zellyse
- Phagozytose durch Makrophagen
- Freisetzung lysosomaler Enzyme

Die Apoptose hingegen läuft nach einer starren Regieanweisung ab.

Meistens sind nur einzelne Zellen betroffen und diese reagieren auf Signale von innen, auch wenn sich die Auslöser des Signals außerhalb der Zelle befinden.

Solche Signale sind zum Beispiel Gamma- oder UV-Strahlen (*Rosette und Karin, 1996*), Chemotherapeutika (*Cariers et al., 2002; Wieder et al., 2001*), freie Radikale und Wasserstoffperoxid, oxidativer Stress (*Rosette und Karin, 1996*), Energiemangel (*Pozzi et al., 2002*), osmotischer Schock (*Bortner und Cidlowski, 1998; Bortner und Cidlowski, 1999; Lang et al., 1998 a; Lang et al., 2000; Maeno et al., 2000; Michea et al., 2000*). Aber auch physiologische Signalstoffe, wie der Tumornekrosefaktor oder der Ligand des APO-1/CD95-Rezeptors, können den apoptotischen Zelltod auslösen.

Morphologische und biochemische Charakteristika der Apoptose

Auf molekularer Ebene werden drei Stadien der Apoptose unterschieden:

- 1) Initiation
- 2) Exekution
- 3) Termination

Zu Beginn der Apoptose kann man eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft über einen langen Zeitraum normal weiter. Die Exekutionsphase ist gekennzeichnet durch die Schrumpfung des Zellkerns und eine Verdichtung des Chromatins. Es kommt zu einer Umverteilung von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran, an der Zytoplasmamembran lassen sich die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen erkennen (Zeiosis), es folgt die Kernfragmentierung und als letztes der Abbau der DNA. Schließlich schnüren sich membranumschlossene Vesikel - die so genannten „apoptotic bodies“ - von der Zelle ab (*Green und Reed, 1998a*).

In der letzten Phase der Apoptose, der so genannten Terminationsphase, werden dann die apoptotischen Körperchen von benachbarten Zellen oder von Zellen des Immunsystems (sog. Makrophagen) mittels Phosphatidylserin -

spezifischer Rezeptoren erkannt, phagozytiert und durch lysosomale Enzyme abgebaut (Savill et al., 1990; Fadok et al., 1992, Krammer, 1999; Dive et al., 1992). Dadurch, dass die „apoptotic- bodies“ phagozytiert werden, bevor die Integrität ihrer Zellmembran endgültig verloren geht, wird eine inflammatorische Reaktion vermieden (Voll et al., 1997). Der programmierte Zelltod wird damit zu einem physiologischen Prozess.

Tabelle 3: Charakteristische morphologische und molekulare Kriterien der Zellapoptose

Morphologie

- Untergang einzelner Zellen
- Zellschrumpfung „apoptotic bodies“
- Fehlende inflammatorische Reaktion
- Phagozytose durch Nachbarzellen und Makrophagen
- Intakte Lysosomen
- Kein Verlust der zellulären Integrität

1.2 Caspasen: Schlüsselenzyme der Apoptose

Der überwiegenden Mehrheit Apoptose verursachender Signalen ist gemein, dass sie die Aktivierung von so genannten Caspasen bewirken. Dieses proteolytische System, welches durch posttranslationale Proteinmodifikationen die typischen morphologischen Veränderungen der Zelle bedingt, führt schließlich zu ihrer Desintegration und zur anschließenden Phagozytose durch Fresszellen.

Caspasen sind proteinspaltende Enzyme (Proteasen), die aspartathaltige Aminosäuresequenzen in ihren Substraten erkennen und diese spezifisch, nämlich hinter Asparaginsäureresten, schneiden.

Daher der Name Caspasen (**C** für Cystein und **aspase** für aspartatspaltend).

Alle Caspasen werden als inaktive Vorstufen synthetisiert, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Die Apoptoseinduktion führt zu einer Aktivierung von Caspasen in einer proteolytischen Kaskade, die der Verstärkung des apoptotischen Signals dient (*Afford et al. 2000; Los et al. 1999; Fischer et al. 2003*).

Dass die Caspasen im Zusammenhang mit der Apoptose stehen könnten, vermutete man zum ersten Mal nach der Entdeckung dreier zentraler Gene: *ced3*, *ced4* und *ced9*, welche bei Nematoden *Caenorhabditis elegans* für den Zelltod benötigt werden (*Yuan et al., 1993; Thornberry et al., 1992*).

Dabei stellte man fest, dass die Caspase – 1 (ICE: Interleukin - 1 β – Converting-Enzyme) sehr hohe Sequenzähnlichkeit mit *ced3* besitzt.

Bislang konnten bei Säugetieren 14 Caspasen identifiziert werden, wovon 12 auch beim Menschen nachgewiesen wurden. Für die murinen Caspasen – 11, und - 12 konnten noch keine humanen Homologe gefunden werden.

Allen Caspasen ist gemein, dass sie sich sehr in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur ähneln (*Nicholson und Thornberry, 1997*).

Auf Grund von phylogenetischen Untersuchungen kann eine Einteilung der Caspasen in zwei große Gruppen vorgenommen werden.

Die erste Gruppe besteht aus *ced3* ähnlichen Caspasen, die an der Regulation und Ausführung des programmierten Zelltods beteiligt sind (Caspase -3, -2, -6, -7, -8, -9 und -10), die zweite Gruppe besteht aus solchen, deren Hauptaufgabe nicht in der Apoptose-Regulation, sondern in der Prozessierung von entzündungsfördernden Zellbotenstoffen wie Interleukin-1 beta, liegt (Caspase -1, -4, -5, -11, -13 und -14).

Die Gruppe der Zelltod-Caspasen kann nochmals in zwei Untergruppen aufgeteilt werden - in Initiator- und Effektorcaspasen. Diese Caspasen unterscheiden sich durch ihrer Aktivierungsreihenfolge (*Shi, 2002 a*) (s. auch unter 1.2.1) und durch ihre jeweilige Prodomäne. So besitzen die Caspasen -3, -6, -7 eine kurze Prodomäne und gehören zur Gruppe der Effektorcaspasen.

Die Initiatorcaspasen -2, -8, -9 und -10 zeichnen sich durch eine lange Prodomäne aus (*Rano et al., 1997*).

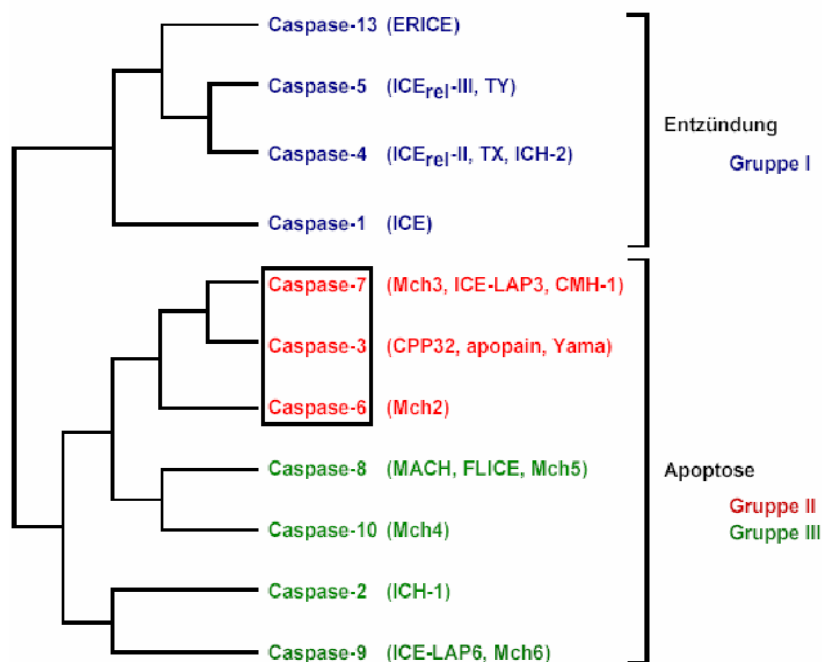


Abbildung 2: Die Familie der humanen Caspasen (verändert nach Nicholson, 1999 und Strasser et al., 2000). Caspasen werden in zwei phylogenetische Gruppen eingeteilt. Die Apoptose-auslösenden Caspasen kann man noch weiter unterteilen: in Effektorcaspasen (hier rot) und in Initiatorcaspasen (hier grün)

Alternativ ist eine Einteilung der Caspasen auf Grund ihrer Substratspezifität möglich.

Danach gibt es drei Gruppen: Gruppe 1 (Caspase -1, -4, -5, -11 und -13) besteht aus Caspasen, die die Erkennungssequenz WEHD für ihre proteolytische Aktivität benötigen, Gruppe 2 besteht aus den Caspasen -2, -3 und -7, sie benötigen die Sequenz DEXD und Gruppe 3 beinhaltet die Caspasen -6, -8, -9, und -10, ihre Signalsequenz ist (IVL)EXD.

Die Substratspezifität der verschiedenen Caspasen wird durch die vier N-terminal zur Spaltstelle, dem Aspartat, liegenden Aminosäuren bestimmt (Thornberry et al., 1997).

Bis heute sind bereits über 280 Substrate der Caspasen identifiziert worden, wobei nicht alle Substrate in jedem Zelltyp gespalten werden. Auch die jeweilige funktionelle Konsequenz der Spaltung konnte noch nicht für alle Substrate aufgeklärt werden (Fischer et al., 2003).

Das vermutlich am besten beschriebene Substrat ist PARP (poly Adenosin-diphosphat-Ribose-Polymerase), das sehr früh in zwei Fragmente zerschnitten wird. PARP ist ein ATP-abhängiges DNA-Reparaturenzym, dessen Zerstörung notwendige Reparaturmechanismen unterbindet. Vor allem Caspase -3 und -7 scheinen für die Zerstörung von PARP verantwortlich zu sein (*Slee et al. 2001*). Die Region, mit der Caspasen ihre Substrate binden, besteht aus vier flexiblen Schleifen, von denen zwei durch proteolytische Spaltung bei der Aktivierung der Procaspasen entstehen. Drei dieser Schleifen (L2, L3, L4) befinden sich auf derselben Seite. Die Interaktion mit der vierten Schleife L2' der Gegenseite ist jedoch entscheidend für die Bildung der Substrat – bindenden Tasche und gewährleistet darüber hinaus die Stabilität der entstandenen Konformation (*Chai et al., 2001*).

Unabhängig vom apoptotischen Stimulus und Zelltyp werden während des Zelltodprogramms ungefähr 70 Kernmatrix-Proteine von Caspasen gespalten und ins Zytosol freigesetzt (*Gerner et al., 2002*). Dadurch kommt es zum Abbau der Kernlamina und zur Störung des nukleären Transports durch die Kernpore. Des Weiteren sind die neu entstandenen Proteine nicht mehr in der Lage, an DNA zu binden oder Chromatin zu stabilisieren. Auch werden nahezu alle Synthesewege für Makromoleküle wie RNA oder Proteine beeinträchtigt (*Fischer et al., 2003*). Eine Übersicht über einige Substrate und ihre Spaltprodukte, die wichtig für die Apoptose sind, gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Beispiele einiger Substrate von Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind
(nach Fischer et al., 2003, Nicholson and Thornberry, 1997; Tan and Wang, 1998; Wolf and Green, 1999)

Substrat	Physiologische Funktion	Funktion des Spaltproduktes
Pro- und anti-apoptotische Proteine:		
Procaspasen, BCL2	Signal-Amplifikation, Inaktivierung von Inhibitoren	
Proteine, verantwortlich für den apoptotischen Phänotyp:		
ICAD	Inhibition der durch Caspasen aktivierten DNase (CAD)	Freisetzung der aktiven CAD Endonuclease-Aktivität
Proteine, verantwortlich für die zelluläre Homöostase:		
DNA – PKCs	Reparatur von DNA – Strangbrüchen und Nukleotid – Excision	Inaktivierung zerstört die katalytische Aktivität
RFC 140	DNA – Replikation und – Reparatur	Inhibition der DNA – Replikation

1.2.1 Caspasenaktivierung

Caspasen liegen in einer inaktivierten Form, auch Procaspase genannt, konstitutiv im Zytoplasma vor und besitzen nur ungefähr 1-2% ihrer Aktivität (*Green, 1998 b*).

Die Procaspasen bestehen aus je drei Domänen: Einer N-terminalen Prodomäne (~23-216 Aminosäuren), einer großen Untereinheit (~20 kD) und einer kleinen Untereinheit (~10 kD) (*Bredesen, 2000*). Darüber hinaus können die Caspasen noch sog. CARDS (Caspase – recruitment domain) oder DEDs (Death effector domain) enthalten, welche die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen.

Die Aktivierung erfolgt in der Regel durch proteolytische Prozessierung nach einem Aspartat, das sich zwischen den jeweiligen Untereinheiten befindet.

Die Prodomäne wird abgespalten, es lagern sich zwei große und zwei kleine Untereinheiten zu einem stabilen Tetramer zusammen (*Eldadah und Faden, 2000; Los et al., 1999*).

Diese Heterotetramere verfügen über zwei katalytische Zentren, die unabhängig voneinander agieren (*Blanchard et al., 1999; Watt et al., 1999*). Die Aktivierung kann entweder autokatalytisch oder über Caspasen ähnlicher Spezifität erfolgen. Aufgrund der Reihenfolge ihrer Aktivierung werden, wie bereits oben erwähnt, zwei Gruppen von Caspasen unterschieden: Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen (*Shi, 2002 a*).

Initiatorcaspasen (Caspase -2, -8, -9 und -10) lösen das Zelltodprogramm nach einem geeigneten Stimulus aus. Nach ihrer Aktivierung überführen sie die Effektorcaspasen -3, -6 und -7 durch proteolytische Spaltung in Propeptide. Durch eine folgende zweite Proteolyse entstehen zwei Untereinheiten, die essentiell für die Funktion der Effektorcaspasen sind. Diese Proteasen verrichten die eigentliche Arbeit und zerschneiden ihre Substrate wie Struktur-Steuerproteine und sind vermehrt verantwortlich für den Zelltod.

Die katalytische Aktivität der Effektorcaspasen wird nach abgelaufener Aktivierung um mehrere Zehnerpotenzen erhöht (*Salvesen und Dixit, 1999*).

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen ist wesentlich komplexer und erfordert mehrere Faktoren. Im Vergleich zu den Effektorcaspasen bewirkt die Aktivierung der Initiatorcaspasen durch autokatalytische Spaltung nur eine geringe Steigerung der katalytischen Aktivität (*Stennicke et al., 1999; Srinivasula et al., 2001*). Erfolgt die Aktivierung jedoch in Verbindung mit bestimmten zytosolischen Faktoren, kann ein Anstieg der katalytischen Aktivität um drei Zehnerpotenzen beobachtet werden.

Als Beispiel dient Procaspase -9, diese wird erst nach Assoziation mit APAF1, einem aus den Mitochondrien freigesetzten Cofaktor, vollständig enzymatisch aktiv. Voraussetzung für die Bildung dieses Holoenzym, das auch als Apoptosom bezeichnet wird, ist die Aktivierung von APAF1 durch Cytochrom c (*Rodriguez und Lazebnik, 1999; Srinivasula et al., 2001; Li et al., 1997*).

Die hauptsächliche Aufgabe von Caspase -9 ist die Aktivierung von Caspase -3 und -7, welche zu den potentesten Effektorcaspasen gehören und schließlich zum Zelltod führen.

1.2.2 Regulation der Caspasen

Aufgrund der enormen Bedeutung der korrekt eingestellten Apoptoserate für den menschlichen Organismus, werden die Caspasen durch ein komplexes System streng reguliert. Die IAPs sind inhibitorische Proteine der Apoptose, von denen 6 humane Mitglieder gekannt sind: NIAC; C-IAP1, C-IAP2, XIAP, Survivin und BRUCE.

Indem sie an spezifische Peptidsequenzen binden, bewirken sie eine Inhibition der Caspasen (*Deveraux und Reed, 1999; Salvesen und Duckett, 2002*). Um unkontrollierten Zelltod zu vermeiden, werden vor Ablauf der Apoptose unabsichtlich aktivierte Caspasen durch IAPs inhibiert. Die funktionelle Einheit aller IAPs besteht aus ~ 80 Aminosäuren, die um ein Zink – Atom angeordnet sind. Diese Region wird auch als BIR (baculoviral IAP repeat) bezeichnet. Die meisten IAPs der Säugetiere enthalten mehrere BIRs, welchen jeweils unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können. Vor kurzem wurde ein negativer Regulator für IAPs in Säugern entdeckt. Das mitochondriale Intermembranprotein DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) / Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) wird aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt und eliminiert dann den inhibitorischen Effekt der IAPs (*Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000*).

Ebenfalls an der Apoptoseregulation beteiligt ist das so genannte FLIP.

Ein der Procaspase -8 ähnliches Molekül, welches katalytisch inaktiv ist, verhindert eine FAS-FADD-Procaspase -8 -Interaktion.

Hitzeschockproteine wurden als eine weitere Gruppe von negativen Regulatoren der Apoptose identifiziert. So interagieren die Mitglieder dieser

Proteinfamilie entweder direkt mit Apaf-1 und verhindern so die Formation des Apoptosoms, oder sie fangen das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom c ab und verhindern so die Bildung des Apoptosoms (*Beere et al., 2000; Bruey et al., 2000; Li et al., 2000; Pandey et al., 2000; Saleh et al., 2000*).

Auch die Kompartimentierung von Caspasen und ihren Aktivierungsfaktoren stellt einen Mechanismus für die Regulierung der Caspasen-Aktivierung dar. So zeigten Studien, dass sich Caspasen neben ihrer Lokalisation im Zytosol auch innerhalb der Mitochondrien befinden können (Procaspasen -2, -3, und -9) (*Mancini et al., 1998; Susin et al., 1999a*). Caspase -2 wurde zusätzlich noch im Nukleus und am Golgi-Apparat (*Mancini et al., 2000*), Caspase -12 am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (*Nakagawa et al., 2000a*). Diese Ergebnisse deuten auf eine Regulation der Caspasen-Aktivierung durch Translokation dieser Proteine während der Apoptose hin. (*Krajewski et al., 1999; Susin et al., 1999a; Zhivotovsky et al., 1999*).

Großen Einfluss auf die Empfindlichkeit apoptotischer Signale hat auch die Familie der Bcl2 Proteine. So entscheidet das Verhältnis zwischen den pro-apoptotischen und den anti-apoptotischen Mitgliedern dieser Proteinfamilie, ob der Selbstzerstörungsprozess seinen Lauf nimmt oder nicht.

1.3 Signalwege der Apoptose in kernhaltigen Zellen

Die Aktivierung von Caspasen kann im Wesentlichen auf dreierlei Weise eingeleitet werden:

- 1.) über membranständige Todesrezeptoren
- 2.) sowie durch allgemeinen Zellstress wie Hitze, Bestrahlung oder Zytostatika, DNA-Schäden, oxidativen Stress und Schädigung der Mitochondrien
- 3.) über das Endoplasmatische Retikulum.

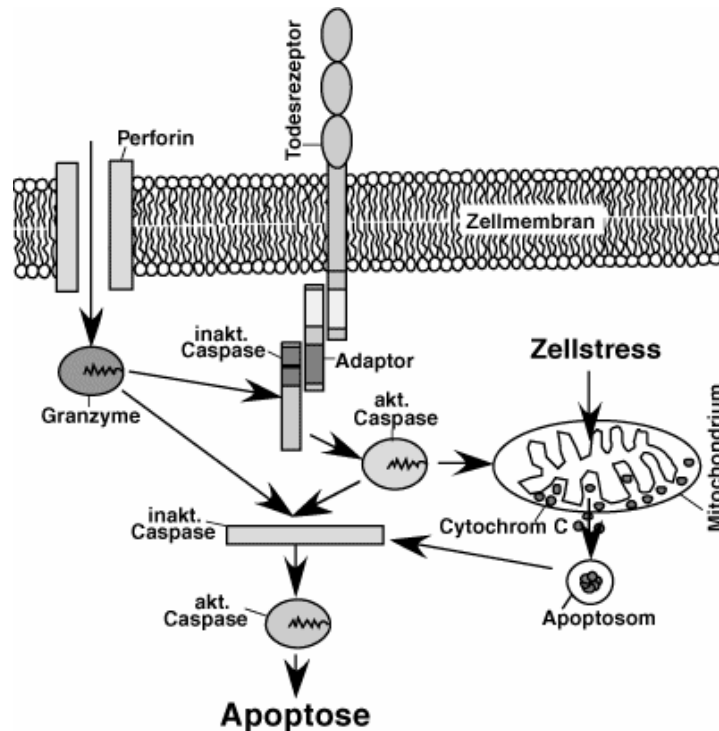


Abbildung 3: Eine vereinfachte, schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die zur Apoptose führen. (nach PD Dr. Thomas Brunner, <http://publicrelations.unibe.ch/unipress/heft118>)

1.3.1 Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion

Carswell entdeckte 1975, dass ein von Makrophagen produzierter Faktor, daraufhin als Tumor – Nekrose – Faktor bezeichnet, maßgeblich an der Zerstörung von Tumorzellen beteiligt ist (Carswell *et al.*, 1975).

Durch weitere Forschungsarbeiten stellte sich heraus, dass dieser Faktor durch Bindung an bestimmte Oberflächenrezeptoren Apoptose induzieren kann.

Zur Gruppe der TNF – / NGF - Rezeptor – Superfamilie (Schulze – Osthoff *et al.*, 1998) gehörend, besitzen sie zwei bis sechs Cystein – reiche extrazelluläre Domänen (Smith *et al.*, 1994; Gruss *et al.*, 1995). Der intrazelluläre Teil besitzt einen in Todesrezeptoren konservierten Bereich namens „death domain“ (DD), der für die Induktion der Apoptose essentiell ist (Itoh und Nagata, 1993).

Als erster Schritt der Signalübertragung erfolgt eine Trimerisierung des Rezeptors. Im Zytoplasma lagert sich nun an die DD das Protein FADD (Fas-associated DD)/(MORT1, CAP1, 2) an, das ebenfalls eine DD an seinem C-terminalen Ende enthält. Eine Bindung entsteht durch DD-DD-Wechselwirkung. Gleichzeitig wird eine Death-effector-domain (DED), die sich am N-terminalen Ende von FADD befindet, aktiviert. Daran wird nun ein weiteres Protein, nämlich Caspase -8 (FLICE/Mach- α 1), welche über eine entsprechende DED verfügt, gebunden. Dieser auch DISC (death-inducing signaling complex) genannte Protein-Komplex führt dann zu einer Aktivierung anderer Caspase-Proteine die – ebenso wie ICE-Proteasen dann bei der Proteolyse der Zelle mitwirken (*Nagata, 1997*).

Die bislang am besten untersuchten Adapter – Proteine sind „TNF- receptor – 1 – associated death domain“ (TRADD) (*Hsu et al., 1995*) und „Fas associated via death domain“ (FADD)/MORT – 1 (*Chinnaiyan et al., 1995*).

Bis heute wurden acht „death receptors“ identifiziert. Dazu gehören: 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) (*Locksley et al., 2001; Aggarwal, 2003*).

Bemerkenswerter Weise haben die „death receptors“ nicht nur Einfluss auf die Initiierung von Zelltodmechanismen, sondern können abhängig von Zelltyp und kostimulierenden Signalen über sog. „TNF – receptor - associated factors“ (TRAF´s) auch Zellaktivierung, Zellproliferation und – differenzierung fördern (*Ashkenazi und Dixit, 1998; Baud et al., 2001; Daniel et al., 2001*).

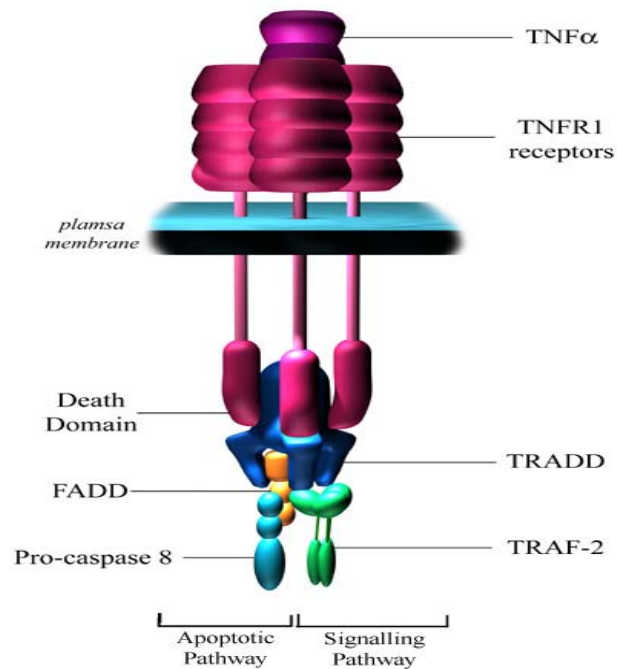


Abbildung 4: TNF-Rezeptor und sein Signalweg. Aus dem Biotech Journal, 2002. (www.biotechjournal.com/Journal/jan2002/janArticle6text.htm)

Ähnlich den Zelltodrezeptoren gehören alle Liganden (s. Abbildung 5) der Rezeptoren, mit Ausnahme derer des NGFR, aufgrund struktureller Homologien zur TNF – Superfamilie (Ashkenazi und Dixit, 1998; Schulze – Osthoff et al., 1998).

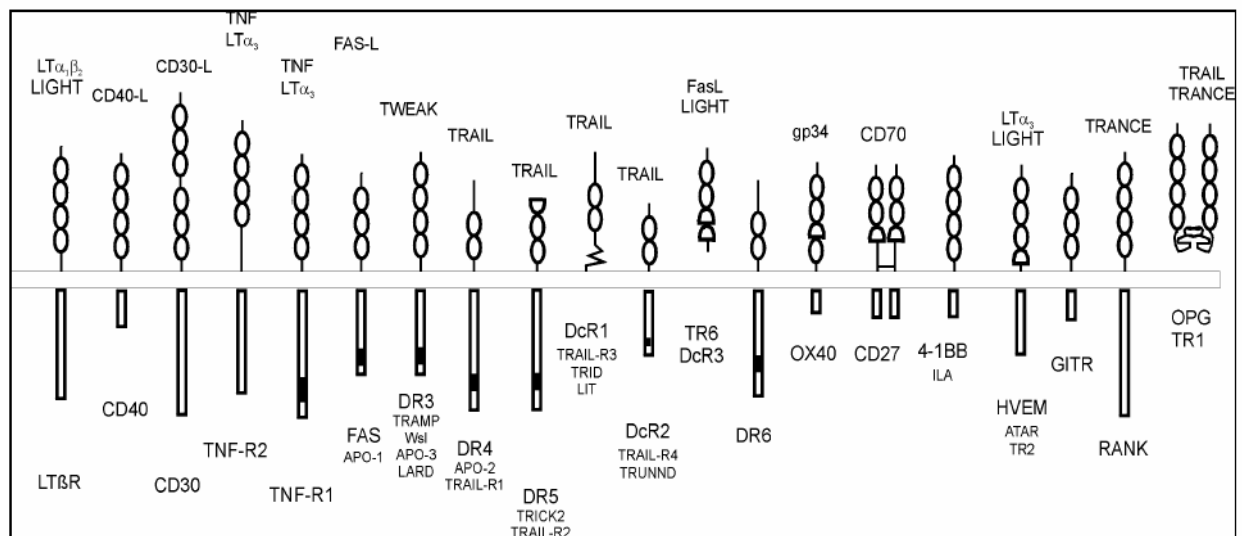


Abbildung 5: Rezeptoren und ihre Liganden (nach Frank Mühlenbeck et al., 1998)

Im Folgenden soll nun das Beispiel der Signaltransduktion der Rezeptor – vermittelten Apoptose am Beispiel von CD 95, welches auch bislang am besten untersucht ist, näher erläutert werden (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley et al., 2001).

Signaltransduktion der Rezeptor-vermittelten Apoptose am Beispiel von CD95

Die apoptotische Signaltransduktion wird eingeleitet durch die Bindung von löslichem (sCD95L) oder membrangebundenem (mCD95L) CD 95 - Liganden an den bereits trimerisierten Rezeptor (Siegel et al., 2000). Dieser bindet über seine C – terminale Todesdomäne (DD) an die DD von CD95, wodurch der Todes-induzierende Signalkomplex („death inducing signalling complex“, DISC) entsteht. Via DD-Bindungsstelle wird das Adaptermolekül FADD (Fas-associated Death Domain Protein, auch unter dem Namen Mort1 bekannt) gebunden. FADD wiederum kann Procaspase -8 binden, die Interaktion erfolgt über eine N-terminale Death Effector Domain -Bindungsstelle von FADD und der analogen Domäne der Procaspase -8. (Kischkel et al., 2001).

Konsekutiv erfolgt am DISC autokatalytisch die Aktivierung der Procaspase -8 (Muzio *et al.*, 1996). Die aktive Caspase -8 aktiviert verschiedene Zellproteine, so zum Beispiel auch die Procaspase -3. Dadurch wird das Apoptosesignal weitergeleitet und das Selbstzerstörungsprogramm der Zelle nimmt seinen Lauf.

1.3.2 Die mitochondriale Apoptoseinduktion

Mitochondrien sind neben ihrer Funktion als „Energieproduzent“ der Zellen auch ein wichtiges Entscheidungszentrum für den Ablauf und die Art des programmierten Zelltodes (Alnemri, 1999; Kroemer und Reed, 2000).

So verursachen verschiedenste apoptotische Stimuli, wie zum Beispiel der Entzug von Wachstumsfaktoren, Hypoxie und Hitzeschock (Kluck *et al.*, 1997), Chemotherapeutika (Wieder *et al.*, 2001), Chemikalien (Wieder *et al.*, 2001) oder Sauerstoffintermediate (ROI)(Cassarino und Bennett, 1999; Kroemer *et al.*, 1997) eine Permeabilitätsänderung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP). Auch durch DNA-Schäden und die dadurch bedingte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 werden derartige Veränderungen beobachtet.

Diese Permeabilisierung ist nach Green und Kroemer verantwortlich für folgende Mechanismen (Green und Kroemer, 2004).

- Freisetzung von Caspasen-aktivierenden Molekülen
- Freisetzung von Todesmolekülen, welche Caspasen- unabhängig agieren
- Zusammenbruch des metabolischen Systems, welches das Überleben einer Zelle sichert

Obwohl die Permeabilität der mitochondrialen Außenmembran (OM) stark reguliert ist, kann ein völlig unselektiver Verlust der Permeabilitätskontrolle der OM auftreten.

Derzeit stehen 2 Modelle, welche eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran erklären, in Konkurrenz zueinander:

Nach dem ersten Modell führt eine Porenbildung zur Permeabilisierung der OM (Kroemer und Reed, 2000).

Diese PT-Pore wird durch einen Proteinkomplex aus mehreren Proteinen gebildet. Die Haupteinheit der PT-Pore besteht aus dem VDAC-ANT-CyP-D Komplex (Crompton, 1999), aber auch andere Moleküle sind an deren Aufbau beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen scheint die PT eine wichtige Rolle für die Ca^{2+} -Pufferung und -Freisetzung zu spielen (Murchison und Griffith, 2000).

Unter oxidativem Stress, hohen Ca^{2+} -, oder niedrigen ATP Konzentrationen öffnet sich die PT-Pore. Dies erlaubt die Diffusion von Molekülen bis zu einer Größe von ca. 1500 Da durch die innere Mitochondrienmembran. Der dadurch entstehende osmotische Einstrom von Wasser und Molekülen, auch „permeability shift transition“ genannt, wurde 1980 zum ersten Mal von den Wissenschaftlern Haworth und Hunter beschrieben (Haworth und Hunter, 1980). Dem sofortigen Zusammenbruch des Potentials der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\psi_m$) folgt ein osmotisches Anschwellen der mitochondrialen Matrix (Crompton et al., 1999). Im Gegensatz zur IM, welche ein Anschwellen der Matrix mit ihren gefalteten Cristae viel leichter ausgleichen kann, führt diese Schwellung zu einem Zerreißen der OM.

Im zweiten Modell geht man von einem direkten Einfluss der BCL-2 Familie auf die äußere Mitochondrienmembran aus (Green und Kroemer, 2004).

Nach einem Todessignal aktivieren BH3-only Proteine Mitglieder der Bax-Subfamilie.

Nach deren Insertion in die OM bilden diese große Kanäle, wodurch Apoptose-auslösende Faktoren vom Intermediärraum der Mitochondrien ins Zytosol entweichen können.

Bcl-2 und Bcl-xl können diese Konformationsänderung oder gar die Oligomerisation von Bax oder Bak und somit eine daraus folgende

Caspasenaktivierung durch das mitochondriale Cytochrom c verhindern (Vander Heiden et al., 1997; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass während der Apoptose die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran gesteigert ist, was zu einer konsekutiven Freisetzung von giftigen Intermembranproteinen ins Zytosol führt (Goldstein et al., 2000).

Folgende Faktoren gelangen in das Zytosol:

- **Cytochrom C**, ein Eisenporphyrin-Protein, welches verantwortlich ist für den Elektronentransport zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran.
Ist dieser Transportmechanismus gestört, so entstehen vermehrt Superoxidanionen, welche Schäden durch Oxidation von Lipiden, Proteinen oder an den Nukleinsäuren verursachen können (Cai und Jones, 1998; Cassarino und Bennett, 1999).
Außerdem aktiviert das System die Procaspase -9 durch Bildung des so genannten Apoptosoms, was die Aktivierung von weiteren Caspasen, nämlich der Procaspasen -3, -6 und -7 zur Folge hat.
- **Diablo/Smac**, welches ein proapoptotisches Protein darstellt, wird nach einem apoptotischen Stimulus ins Zytosol freigesetzt. Durch multiple Interaktionen mit den IAPs kann es die IAP – vermittelte Inhibition sowohl der Initiator – als auch der Effektorcaspasen antagonisieren und dadurch die Apoptose fördern (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).
- **Apoptose – induzierender Faktor (AIF)**, ein Flavoprotein, transloziert nach Freisetzung aus dem intermembranösen Raum in den Zellkern und bedingt Caspasen – unabhängig Chromatinkondensation, Fragmentierung der DNA und Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (Susin et al., 1999b; Joza et al., 2001).

- **Endonuklease G**, eine 30kD-große Nuclease bindet nach Freisetzung an den Zellkern und induziert ebenfalls eine Caspasen – unabhängige DNA – Fragmentierung (Li et al., 2001).

Außerdem werden die **Procaspasen -2, -3, -9** sowie **Ca²⁺ - Ionen** freigesetzt, die die Aktivierung von Caspasen und Nukleasen begünstigen (Cassarino und Bennett, 1999; Green und Reed, 1998; Loeffler und Kroemer, 2000; Petit et al., 1997).

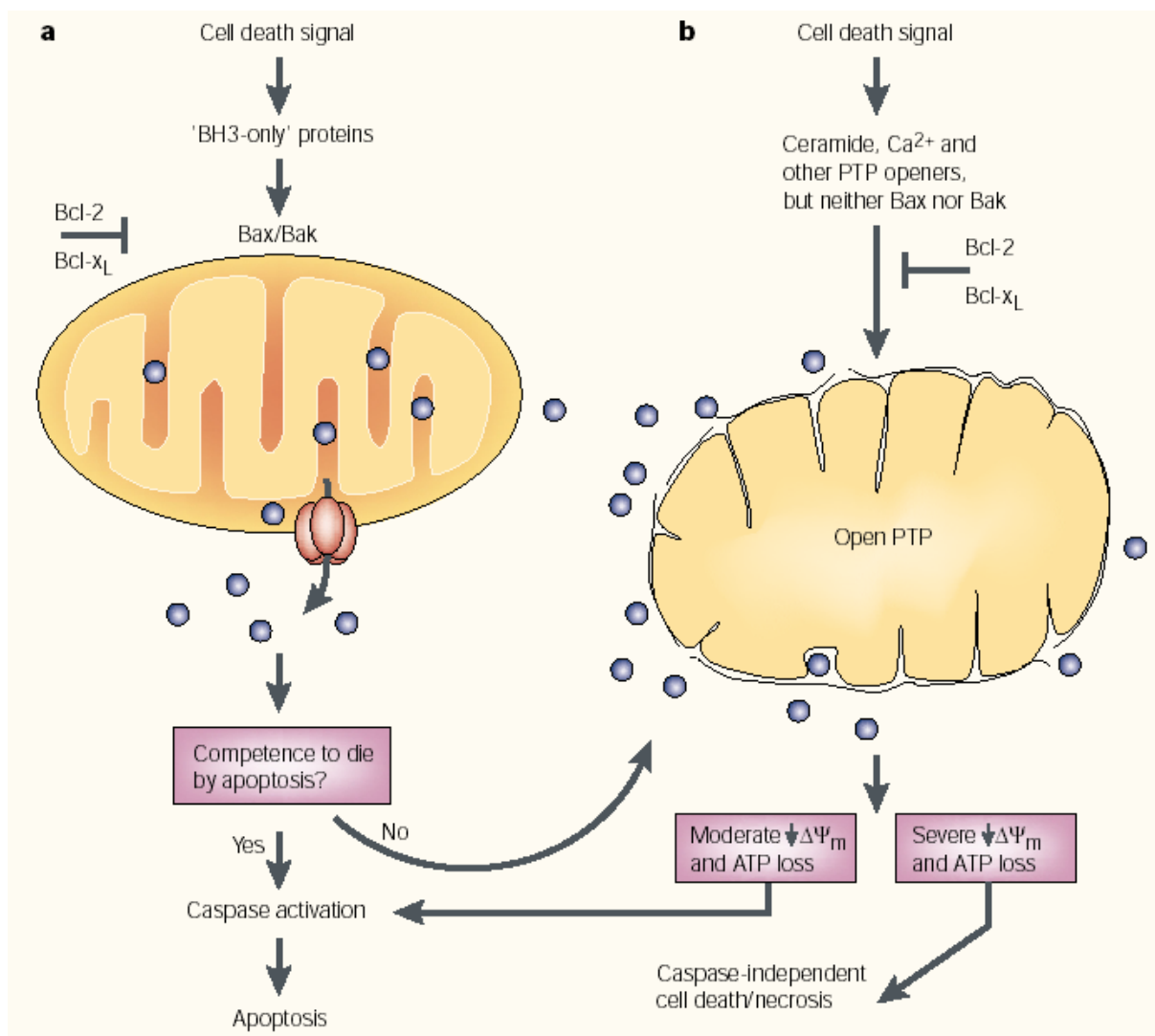


Abbildung 6: Die mitochondriale Apoptose- zwei verschiedene Signalwege (nach Jean-Claude Martinou and Douglas R. Green, 2001)

Die Signalwege der Apoptose - zwei völlig getrennte Systeme?

Bis vor kurzem ging man noch von zwei völlig getrennten Signalwegen in der Apoptoseregulation aus. Man unterschied dabei Typ- I Zellen, bei denen die Apoptose über den Rezeptor – vermittelten Signalweg induziert wird, von Typ – II Zellen, deren Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Weg abläuft (*Schmitz et al., 1999*). Doch inzwischen konnte eine Verbindung zwischen diesen beiden Signalwegen nachgewiesen werden.

Die beiden Signaltransduktionswege treffen bei der Aktivierung der Caspase -3 aufeinander und eine Interaktion zwischen den beiden Signaltransduktionswegen ist durch das proapoptotische Protein Bid, ein Mitglied der Bcl 2-Familie, möglich. Durch proteolytische Spaltung und Aktivierung von Bid durch die Caspase -8 transloziert Bid an die Mitochondrienmembran und induziert dort die Freisetzung von Cytochrom c (*Luo et al., 1998*).

1.3.3 Eine neue Entdeckung- die Induktion der Apoptose durch das Endoplasmatische Retikulum

Durch die Entdeckung einer im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verankerten Caspase und deren Aktivierung durch spezifische endoplasmatische Proteine wurde die wichtige Rolle des ER beim Regulierungsprozess des Apoptoseprogramms deklariert (*Nagakawa et al., 2000a*).

Die Hauptaufgabe des ER besteht in der Faltung verschiedener Proteine in ihre Tertiär- und Quartärstruktur durch so genannte Chaperons.

Kommt es jedoch durch Faktoren wie Hypoxie, Störung der Ca^{2+} - Homöostase, virale Infekte oder Proteinüberladung zu einer Störung dieser Funktion und dadurch zu einer Anhäufung ungefalteter Proteine, wird eine sog. „ER stress response“ oder „unfolded protein response“ (UPR) aktiviert (*Pahl und Baeuerle, 1995*).

Durch deren Aktivierung wird die Translationsrate weiterer Proteine gedrosselt.

Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der Transkriptionsfaktoren für Chaperone um die ungefalteten Proteine in ihre passende Konfirmation zu bringen.

Kann dieser Mechanismus aus irgendwelchen Gründen nicht ablaufen, kommt es unweigerlich zu einem Zusammenbruch der Homöostase und folglich zur Apoptose. Bislang konnte der genaue Ablauf des Signalweges der ER – induzierten Apoptose nicht vollständig aufgeklärt werden. Allerdings scheinen zwei Hauptwege, der eine abhängig von Transkriptionsfaktoren, der andere Caspasen – abhängig, beteiligt zu sein (*Szegezdi et al., 2003*).

Der Transkriptionsfaktor GADD153/CHOP ist in der Lage, über eine Veränderung des Verhältnisses von Bcl – 2 zu Bax ein pro-apoptotisches Signal zu amplifizieren.

Zu dieser Erkenntnis führten Studien mit Neuronen, die mit Amyloid β behandelt wurden (*Wang et al., 1998; Ghribi et al., 2001*).

Ob diese Verringerung an Bcl – 2 zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials und folgend zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt, konnte bislang allerdings nicht geklärt werden.

Der zweite Signalweg läuft unabhängig von Mitochondrien oder Todesrezeptoren ab und wird über Caspase -12, welche zur Gruppe der ICE-like Caspasen gehört, vermittelt. Diese transloziert nach Aktivierung über apoptotische Stimuli vom ER ins Zytosol, wo sie Procaspase -9 spaltet, welche wiederum die Effektorcaspase -3 aktiviert (*Morishima et al., 2002*).

Des Weiteren wurde nach Ca^{2+} - Freisetzung aus dem ER eine Aktivierung der Cystein - Protease m – Calpain beobachtet, welche nach Translokation vom Zytosol ins Endoplasmatische Retikulum ebenfalls zur Aktivierung von Procaspase -12 führt (*Nakagawa und Yuan, 2000 b*).

1.4 Die Familie der Bcl – 2 Proteine

Zum ersten Mal wurden Bcl-2 Gene 1985 in B– Zell Lymphomen¹ entdeckt. Dabei stellte man fest, dass eine chromosomale Translokation zur Fehlregulation von Genen mit anschließender Überproduktion der kodierenden Proteine führt. (*Tsujimoto et al., 1985*). Durch Forschungsergebnisse in den darauf folgenden Jahren entdeckten mehrere Arbeitsgruppen, dass Bcl-2- m überexprimierende Zellen hämatopoetischen Ursprungs nach Wachstumsfaktorentzug keine Apoptose einleiten, sondern in die G0-Phase eintreten (*McDonnell et al., 1990; Vaux et al., 1988*).

Folglich kommt der Bcl-2 Familie eine Schlüsselfunktion bei der Entscheidung einer Zelle über Leben und Tod zu (*Reed, 1998*).

Diese sich ständig vergrößernde Proteinfamilie umfasst mittlerweile 26 Mitglieder und wird in 2 große Gruppen eingeteilt.

So gibt es die Gruppen der anti-apoptotischen Proteine, welche zum Beispiel Bcl-2, Bcl-XL angehören, und eine andere Gruppe, die sich aus proapoptotischen Mitgliedern zusammensetzt (wie z.B. Bax, Bid). All diese Proteine fungieren als potentielle Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene.

Einen genauen Überblick über die einzelnen Proteine soll die angeführte Tabelle geben.

Tabelle 5: Die Mitglieder der Bcl – 2 Familie und ihre Entdecker

Pro-apoptotisch	Anti-apoptotisch
Bax (<i>Oltvai et al., 1993</i>)	Bcl-2 (<i>Tsujimoto et al., 1985</i>)
Bak (<i>Chittenden et al., 1995; Kiefer et al., 1995</i>)	Bcl-X_L (<i>Boise et al., 1993</i>)
Bok/Mtd (<i>Hsu et al., 1997</i>)	Bcl-w (<i>Gibson et al., 1996</i>)
Bik/Nbk (<i>Boyd et al., 1995;</i>	Mcl-1 (<i>Kozopas et al., 1993</i>)
	A1/Bfl-1 (<i>Lin et al., 1996</i>)

¹ B – cell lymphomas

Han et al., 1996)	Boo/Diva (Song et al., 1999)
Bid (Wang et al., 1996)	Bcl-xES (Schmitt et al., 2004)
Bad (Yang et al., 1995)	Bcl-2-L-10 (Zhang et al., 2001)
Hrk/DP5 (Inohara et al., 1997)	Bcl – B (Ke et al., 2001)
Bim/Bod (O'Connor et al., 1998)	
Noxa/APR (Oda et al., 2000)	
Bnip (Matsushima et al., 1998)	
Bcl-X_S (Boise et al., 1993)	
Bcl-rambo (Kataoka et al., 2001)	
Bcl-G (Guo et al., 2001)	
Bfk (Coultas et al., 2003)	
Bmf (Puthalakath et al., 2001)	
Bcl-2L12 (Floros et al., 2003)	
EGFP-Bak-like (Kim et al., 2004)	
Bfk (Coultas et al., 2003)	

Durch Sequenzanalysen wurde festgestellt, dass alle Mitglieder dieser Familie durch das Vorhandensein mindestens eines der vier konservierten Bcl-2 Homologie-Motive (BH) gekennzeichnet sind.

Diese Domänen ermöglichen es den verschiedenen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, entweder Homo- oder Heterodimere zu bilden und sich gegenseitig zu regulieren (Kelekar und Thompson, 1998; Oltvai et al., 1993). Je nach Zusammensetzung der Heterodimere entfalten diese unterstützende oder inhibierende Wirkung in Bezug auf das Zelltodprogramm. So wird z. B. das proapoptische Bax durch Heterodimerisierung mit Bcl – 2 antagonisiert und es entsteht ein anti – apoptotisches Molekül (Sedlak et al., 1995).

Untersucht man den Domänenaufbau der verschiedenen Gruppen, so enthalten die anti – apoptotischen Mitglieder die α helikalen Domänen (BH1 bis BH4).

Die pro – apoptotischen Moleküle können in zwei weitere Untergruppen aufgeteilt werden.

Die Bax – Familie mit Bax, Bak und Bok enthält bis auf BH4 alle Homologiedomänen, während die „BH3 – domain – only“ Mitglieder nur das BH3 – Segment beinhalten (*Strasser et al., 2000*). Da alle diese Proteine die Apoptose fördern, wird die BH3 – Domäne als elementarer Bestandteil für die Ausbildung pro – apoptotischer Eigenschaften angesehen (*Puthalakath und Strasser, 2002*).

Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie sind oft in Membranen der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums oder in der Kernhülle gelegen.

Dort sind sie durch eine hydrophobe Domäne am COOH- Ende auf der zytosolischen Seite intrazelluläre Membranen verankert (*Nguyen et al., 1993*). Im Gegensatz dazu, werden viele der pro-apoptotischen Familienmitglieder wie Bax oder die BH3-only Proteine Bid, Bad und Bim normalerweise frei im Zytosol vorgefunden.

Erst nach deren Aktivierung durch das Zytosol translozieren diese an die Mitochondrienmembran (*Goping et al., 1998; Luo et al., 1998*) und bewirken dort deren Membranpermeabilisierung.

Hauptaufgabe von Bcl-2 oder Bcl-XL ist die Verhinderung der Caspasenaktivierung durch das mitochondriale Cytochrom c, ausgelöst durch viele verschiedene Apoptosestimuli (*Kluck et al., 1997; Vander Heiden et al., 1997; Yang et al., 1997*).

Sie erfüllen protektive Funktion durch eine Stabilisierung des Membranpotentials (*Shimizu et al., 1996*) und inhibieren die Bildung der mitochondrialen „permeability transition pore“ (mtPTP) (*Marzo et al., 1998b*).

Durch direkten Einfluss auf die Mitochondrien stellen die anti-apoptotischen Proteine eine zentrale Schaltstation der Apoptose dar.

Das proapoptotische Protein Bax vermittelt seine apoptotischen Stimuli direkt zum Mitochondrium. Als so genannter direkter Aktivator transloziert es nach

Aktivierung durch die BH3- only Proteine an die Mitochondrien, oligomerisiert und lagert sich in deren Außenmembran ein (*Gross et al., 1998*). Dort bewirkt Bax die Freisetzung von Cytochrom c und den Verlust des Membranpotentials (*Pastorino et al., 1998*). Im Gegensatz zum Protein Bid, welches zu seiner Aktivierung und Signalweiterleitung in die Mitochondrien Caspasen benötigt, reicht Bax allein aus, um den Zelltod zu induzieren (*Xiang et al., 1996*).

Reguliert werden die Mitglieder der Bcl – 2 Familie sowohl transkriptionell als auch posttranslational durch Phosphorylierung.

1.5 Erythrozyten

1.5.1 Form und Funktion

Erythrozyten sind bikonkave scheibenförmige Zellen mit einem Durchmesser von etwa 7,5 µm und sind im Normalfall außerordentlich verformbar. Ihre Hauptaufgabe besteht im Transport von Sauerstoff von den Respirationsorganen zu den Sauerstoff-verbrauchenden Zellen durch reversible Bindung an das Hämoglobinmolekül. Jedes Molekül besteht aus vier Untereinheiten mit jeweils einer Proteinkette (Globin) und einem eisenhaltigen Porphyrinring (Häm), der Bindungsstelle für O₂. Außerdem transportieren die Erythrozyten CO₂ von der Peripherie zurück zu den Atmungsorganen.

Kommt es zur Zellschwellung, so nehmen die roten Blutkörperchen kugelförmige Gestalt an und werden Sphärozyten genannt. Im Gegensatz dazu spricht man bei Zellschrumpfung von Echinozyten (stechapelförmig). Beide, sowohl die Sphärozyten, als auch die Echinozyten, sind in ihrer Verformbarkeit wesentlich eingeschränkt und weisen eine verkürzte Lebensdauer auf.

1.5.2 Bildung und Abbau

Pro Sekunde werden etwa 2,4 Millionen Erythrozyten neu produziert. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt 110-130 Tage.

Während der Fetalphase werden die Erythrozyten in der Leber, danach im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen, den sog. Hämozytoblasten, gebildet. Der Hämozytoblast entwickelt sich im Verlauf mehrerer Zellteilungen über den Proerythroblasten zum Erythroblasten. Mit dem Beginn der Biosynthese von Hämoglobin wird dieser zum Normoblasten, welcher den inzwischen pyknotischen Zellkern während der Weiterentwicklung zum Retikulozyten (juveniler Erythrozyt) ausstößt. Außerdem werden intrazelluläre Membranen und Kompartimente abgebaut. Die so entstandene Zelle enthält netzförmig angeordnete Reste ribosomaler RNA, welche innerhalb der ersten 48 h verschwinden. Da der reife Erythrozyt (=Normozyt) schließlich keine RNA mehr enthält, ist er zur Energiegewinnung hauptsächlich auf anaerobe Glykolyse und zur Generierung von Redoxäquivalenten (NADPH) auf den Pentosephosphatweg angewiesen. Das so entstandene ATP und NADPH dient vor allem der Erhaltung der Zellstruktur, dem aktiven Transport an der Zellmembran (Bsp.: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$) und der Glutathionsynthese. Glutathion regeneriert in reduzierter Form Thiolgruppen von Proteinen und führt zur Entgiftung von Peroxiden. Ein Mangel an Energie beeinträchtigt über die Verminderung von NADPH (Pentosephosphatweg) den Nachschub an GSH (reduziertes Glutathion) und schwächt somit die antioxidative Abwehr der Erythrozyten (*Bilmen et al., 2001*). Das ebenfalls aus der Glykolyse gewonnene NADH benötigt der Erythrozyt zur Reduktion von Methämoglobin als Voraussetzung für den Sauerstofftransport.

Der Abbau der Erythrozyten findet hauptsächlich im retikuloendothelialen System von Knochenmark, Leber und Milz statt.

1.5.3 Regulation der Erythropoese

Die Bildung der Erythrozyten steht weitgehend unter dem Einfluss von Hormonen. Das wichtigste Hormon hierbei ist sicherlich das Erythropoietin, welches sowohl in der fetalen Leber, als auch in den adulten Nieren gebildet wird. Bei Sauerstoffmangel wird es vermehrt ausgeschüttet und fördert somit die Bildung neuer Erythrozyten.

In einer 2003 veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Erythropoietin auch den Ca^{2+} – Einstrom und die darauf folgende Aktivierung der Scramblase hemmt. Dadurch verlängert es die Lebensdauer der Erythrozyten (*Myssina et al., 2003*).

Weitere Hormone, die die Erythropoese fördern, sind Testosteron, Schilddrüsenhormone, Somatotropin und Kortisol.

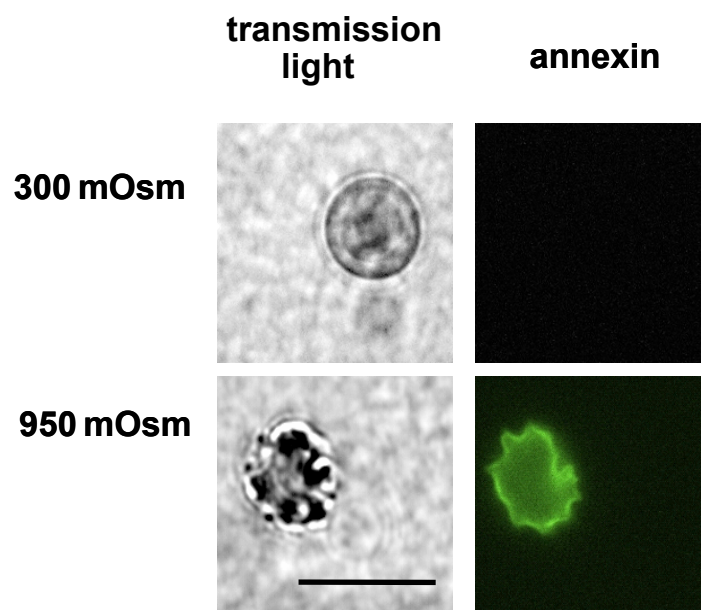


Abbildung 7: Rotes Blutkörperchen nach 24 stündiger Behandlung mit isotoner Ringer Lösung (obere Bilder) und mit hyperosmolarer Lösung (untere Bilder). Die linken Bilder sind mit einer Kamera und Durchlichtmikroskop aufgenommen, die rechten Bilder nach 10 minütiger Annexin V Färbung. (Fluoreszierendes Annexin V bindet an Phosphatidylserin und zeigt somit den Zusammenbruch der Zellmembranasymmetrie an.)

1.5.4 Die Eryptose- das Apoptoseprogramm der Erythrozyten

Noch vor wenigen Jahren glaubte man, dass Erythrozyten nicht in der Lage seien, programmierten Zelltod durchzuführen. Denn wenn man die oben beschriebenen Mechanismen der Apoptose in kernhaltigen Zellen betrachtet, stellt man sich die Frage, wie denn ein Erythrozyt in der Lage sein soll Apoptose durchzuführen, wenn die wichtigsten Systeme wie das Mitochondrium, die DNA, oder das Endoplasmatische Retikulum gar nicht existieren.

Zwar sind in Erythrozyten Caspasen gefunden worden, doch konnte bis heute noch nicht gezeigt werden, dass diese Enzyme wirklich aktiviert werden (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001a; Daugas et al., 2001; Lang et al., 2003a; Lang et al., 2003b; Lang et al., 2004a*).

Unterstützt in der Annahme, Erythrozyten seien zu einem Selbstzerstörungsprogramm nicht in der Lage, wurde die Fachwelt durch eine Studie, welche zeigte, dass Erythrozyten nach Behandlung mit Staurosporin, Cycloheximid oder nach Serumdeprivation im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen keine Apoptose zeigten. (*Daugas et al., 2001*)

Dennoch konnte durch weitere Untersuchungen gezeigt werden, dass Erythrozyten, obwohl sie keine Zellorganellen mehr enthalten, nach Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes durch Ca^{2+} -Ionophore wie Ionomycin Zellschrumpfung, „membrane blebbing“ (Bildung von Membranausstülpungen und -bläschen) und Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche zeigen. All diese Merkmale sind typischerweise bei der Apoptose in kernhaltigen Zellen zu sehen (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001a; Daugas et al., 2001*).

So kam man zu dem Schluss, dass auch Erythrozyten in der Lage seien, als Reaktion auf gewisse Stimuli wie hyperosmolaren Schock (z. B. in der Niere), oxidativen Stress oder Energiemangel, durch eine Art programmierten Zelltod sich selbst zu zerstören.

Bis heute wurden zwei verschiedene Apoptosewege in Erythrozyten gefunden.

1.5.5 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: Ca²⁺ - abhängiger Signalweg

Verschiedene Arbeitsgruppen fanden heraus, dass es infolge osmotischen Schocks (*Huber et al., 2001; Lang et al., 2003 a*), Acetylcholin (*Bennekou, 1993*), oxidativen Stresses (*Duranton et al., 2002*), Membrandepolarisation (*Christophersen und Bennekou, 1991*), Energiemangel (*Lang et al., 2004*) und Verminderung der intra – oder extrazellulären Cl⁻ -Konzentration (*Duranton et al., 2002; Huber et al., 2001*) zu einem Einstrom von Ca²⁺ - Ionen durch nicht-selektive Kationenkanäle in die Zelle kommt. Diese Erhöhung der Ca²⁺ -Konzentration führt zu folgenden Veränderungen:

1.) Aktivierung des Gardos Kanals

In der Erythrozytenmembran wird durch den Ca²⁺ -Einstrom ein volumensensitiver, einwärts-gerichteter Ca²⁺ -abhängiger K⁺-Kanal (KCNN4, hSK4, Gardos-Kanal) geöffnet. Dieser führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und dadurch zu einem Verlust an KCl (*Del Carlo et al., 2002; Dunn, 1998; Gardos, 1958; Grygorczyk und Schwarz, 1983, Leinders et al., 1992; Pellegrino und Pellegrini, 1998; Shindo et al., 2000*).

Durch den Ionenverlust kommt es konsekutiv zu einem durch osmotischen Druck bedingten Ausstrom von Wasser und daraus resultierend zur Zellschrumpfung (*Hoffman et al., 2003; Lang et al., 2003*).

Eine wichtige Rolle spielt der Gardos-Kanal auch bei der Schrumpfung und Deformierung von desoxygenierten Sichelzellen, die zu einer drastischen Erhöhung der Blutviskosität führen (*Joiner et al., 1993; Franco et al., 1996*). Durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Reizen wird die Lebensdauer der defekten Erythrozyten verkürzt (*Lang et al., 2002b*).

2.) Aktivierung der erythrozytären Scramblase

Ebenfalls bewirkt eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration eine Aktivierung der Scramblase. Dieses Enzym bewirkt eine unspezifische Bewegung von Phospholipiden zwischen den Blättern der Lipiddoppelschicht (*Bevers et al., 1999; Zhou et al., 1997*) und führt somit zu einem Zusammenbruch der Membranasymmetrie.

Phosphatidylserin, welches sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran befindet, wird nach Scramblaseaktivierung auf der Membranaußenseite, also auf der Zelloberfläche exprimiert (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001a; Daugas et al., 2001*).

Makrophagen, die mit spezifischen Rezeptoren für Phosphatidylserin ausgestattet sind (*Messmer und Pfeilschiffer, 2000; Fadok et al., 2001*), sorgen für eine rasche Entfernung geschädigter Erythrozyten aus dem Blutkreislauf durch Phagozytose und darauf folgendem Zellabbau (*Boas et al., 1998; Eda und Sherman, 2002*).

Somit lässt sich sagen, dass die Aktivierung der Scramblase zu einer verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten führt.

Analog dazu weisen gealterte Zellen erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen auf (*Romero und Romero, 1999; Kiefer und Snyder, 2000*).

3.) Aktivierung von Calpain

Die Calpaine sind eine Familie von Ca^{2+} -abhängigen Thiol-Proteasen und kommen im menschlichen Organismus ubiquitär vor.

Ihre Aufgabe besteht in der Transduktion extrazellulärer Signale, welche über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels vermittelt werden. Sie spalten eine Vielzahl an zytoskelettalen, membranassoziierten und an der Zellregulation beteiligten Proteine.

So werden Strukturproteine wie Aktin, Fodrin und Gelsolin (*Chan und Mattson, 1999*) von Calpain modifiziert und die Proteine Bid und Bax, analog zu den Caspasen (*Gao und Dou, 2000*), wie auch die Procaspasen -3 und -9 gespalten, wobei diese jedoch weder aktiviert noch inaktiviert werden (*Danial und Korsmeyer, 2004*).

Aus dem oben beschriebenen ist klar ersichtlich, dass Störungen der Calpaine aufgrund ihrer unverzichtbaren Funktionen bei Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Nekrose häufig mit Erkrankungen assoziiert ist wie

M. Alzheimer, Katarakt und Muskeldystrophie (*Sorimachi und Kawabate, 2003*).

Zurzeit sind zwei Isoformen bekannt: Calpain I (μ -form) und Calpain II (m-form), wobei die Erythrozyten die Isoform μ -Calpain (Calpain I) enthalten.

μ - Calpain liegt in der Zelle als inaktives Heterodimer vor.

Strukturanalytisch ist das Dimer immer aus einer schweren Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 80 kDa mit vier Domänen (katalytische Untereinheit) und einer leichten Untereinheit von 30 kDa mit zwei Domänen (regulierende Untereinheit) (*Barrett, 1991; Yoshizawa, 1995*) zusammengesetzt.

Unter Zugabe von Ca^{2+} dissoziiert Calpain in diese Untereinheiten (*Kitagaki, 2000*). Das μ -Calpain stellt eine aktive Proteinase dar und aktiviert sich durch einen autolytischen Prozess selbst. Dieser autokatalytische Prozess von μ -Calpain (Calpain I) läuft beginnend mit der achtzig kDa Untereinheit durch Ca^{2+} Verbrauch über mehrere Zwischenprodukte (80 kDa - 78 kDa - 76 kDa - 30 kDa - 18 kDa). Durch ein Calpain –aktivierendes Protein, welches Plasmamembran– assoziiert in Erythrozyten vorliegt, wird eine Aktivierung von Calpain bereits bei nahezu physiologischen Ca^{2+} - Konzentrationen ermöglicht (*Salamino et al., 1993*).

Reguliert wird Calpain durch Calpastatin, einen endogenen Inhibitor, welcher intrazellulär in der Nähe des Nukleus lokalisiert ist, während Calpain vermehrt im Zytoplasma und an der Zellmembran zu finden ist. Die Aktivität des Calpains und die inhibitorische Leistung des Calpastatins hängen vom intrazellulären Konzentrationsverhältnis beider Stoffe ab, wobei der Calpastatin- Spiegel von Wachstumshormonen moduliert wird (*Barnoy et al., 1997*).

Weitere Inhibitoren des Calpain sind das Calpeptin, ein Cystein-Proteaseninhibitor, Calmodulin-Antagonisten (*Johnson, 1990*), diverse synthetische Proteinaseinhibitoren und Dimethyl-Ketophosphonate (*Tao, 1998*).

4.) Einfluss von Ca^{2+} - Ionen auf das Zytoskelett

Um ihre Aufgabe des Sauerstofftransports effektiv zu erfüllen, müssen die Erythrozyten beträchtliche Deformierungen aushalten, ohne daran zugrunde zu gehen. Diese ausgeprägte Verformbarkeit wird durch eine unübliche Zusammensetzung der Plasmamembran erreicht. Eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} - Konzentration hat großen Einfluss auf dieses komplexe Netzwerk. So weiß man, dass Calmodulin im Komplex mit Protein 4.1 die Spektrin - Aktin –

Interaktion Ca^{2+} -abhängig reguliert und damit die Membranstabilität steuert (*Tanaka et al., 1991*). Calmodulin kommt ubiquitär vor und dient als intrazellulärer Ca^{2+} - Rezeptor. Außerdem kann Ca^{2+} über Aktivierung einer Transglutaminase eine Quervernetzung der Membranproteine induzieren, wodurch die Zellmembran ihre Flexibilität verliert und rigide wird (*Anderson et al., 1977*).

5). Stimulation von Phospholipasen, Proteinkinasen und Phosphatasen

Auch Modifikationen von Phospholipasen (*Allan et al., 1976 a; Allen et al., 1976b; Smith et al., 2001*), Proteinkinasen und Phosphatasen (*Cohen und Gascard, 1992; Minetti et al., 1996*) durch Ca^{2+} - Ionen wurden beschrieben.

1.5.6 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: Ca^{2+} -unabhängiger Signalweg

Da der Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie, z.B. durch osmotischen Schock verursacht, nicht vollständig durch Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} oder durch Inhibitoren der Kationenkanäle (Amilorid oder Ethylisopropylamilorid) unterbunden werden kann (*Lang et al., 2003a*), kam man zu der Erkenntnis, dass noch ein weiterer Signalweg vorhanden sein muss.

So zeigten mit hypertone, extrazellulärem Medium behandelte Erythrozyten osmotische Zellschrumpfung, was zur Aktivierung einer erythrozytären Sphingomyelinase führte, die in der Folge Ceramid bildet (*Lang et al., 2004a*). Ceramid ist ein „Second Messenger“, der bei vielen Zellen an der Auslösung von Apoptose beteiligt ist (*Frago et al., 1998; Goldkorn et al., 1998; Kolesnick und Fuks 2003; Ogretmen und Hannun 2004; Raisova et al., 2000*).

Ceramid sensitiviert die erythrozytäre Scramblase für zytosolisches Ca^{2+} und fördert somit deren Aktivität. In folge dessen kommt es zu einer vermehrten Phosphatidylserinexposition an der Membranoberfläche (*Lang et al., 2004a*). Die Mechanismen, welche zur Aktivierung der Sphingomyelinase führen, sind bis jetzt noch unbekannt.

1.5.7 Rolle der Caspasen in Erythrozyten

Zwar konnten Caspasen in Erythrozyten nachgewiesen werden, jedoch war es bis heute in der Regel nicht möglich zu zeigen, dass diese Enzyme in roten Blutkörperchen tatsächlich aktiviert werden (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001a; Daugas et al., 2001; Lang et al., 2003a; Lang et al., 2003b; Lang et al., 2004a*).

Lediglich einer Arbeitsgruppe gelang es eine Caspasenaktivierung nach oxidativem Stress nachzuweisen (*Mandal et al., 2002; Mandal et al., 2003*). Demnach läuft das Zelltodprogramm der Erythrozyten weitgehend unabhängig von Caspasen ab. Die Funktion oder Rolle der vorhandenen inaktiven Caspasen konnte bislang nicht aufgeklärt werden (*Berg et al., 2001*).

1.5.8 Physiologische Relevanz

In dem Ausmaß, in welchem Ca^{2+} die Phosphatidylserin-Umlagerung bewirkt und zum Abbau des Zytoskeletts führt, löst eine Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Aktivität das Verschwinden (die Clearance) von betroffenen Erythrozyten aus (*Daugas et al., 2001*).

Dieser Vorgang führt zur Entfernung geschädigter und gealterter Erythrozyten, da diese eine gesteigerte Ca^{2+} -Aktivität im Vergleich zu ungeschädigten roten Blutkörperchen aufweisen (*Kiefer und Snyder, 2000; Romero und Romero, 1999*). Krankheitsbilder wie zum Beispiel die Sichelzellerkrankung (*Joiner, 1993; Wu et al., 2003*), Thalassämie (*Mach-Pascual et al., 1996*) oder Eisenmangelanämie (*Jolobe, 2000*) zeigen einen erniedrigten Hämatokrit.

Dieser resultiert aus einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Auslösern der Eryptose, welche über Aktivierung zellvolumenregulierender Kationenkanäle und Ca^{2+} -Einstrom die Apoptose der Erythrozyten bewirken (*Lang et al., 2002b*).

1.6 Proteinkinase C

1.6.1. Isoenzyme der Proteinkinase C Familie

Die Proteinkinase C (PKC) stellt kein einzelnes Enzym dar, sondern vielmehr eine Familie von Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, von denen bis heute zehn Mitglieder bekannt sind.

Diese zehn Isoenzyme lassen sich wiederum in drei Klassen einteilen;

- in die konventionellen Proteinkinasen, zu denen die Proteine PKC α , PKC β I und β II, PKC γ gehören
- in die neuen mit den Proteinen PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ
- und in die atypischen, zu deren Unterfamilie folgende Kinasen gehören: PKC λ i and PKC ζ (*Blobe et al., 1996; Nakhost et al., 1998; Slater et al., 2000; Lopez-Lluch et al., 2001*).

1.6.2. Aktivierung der Proteinkinase C

In ihrem inaktiven Zustand befinden sich die meisten PKC- Mitglieder frei im Zytosol, wobei die Pseudosubstratsequenz der Regulatorregion mit dem katalytischen Zentrum des Proteins interagiert und somit eine Aktivierung verhindert.

Die Aktivierung erfolgt in einer Kaskade, bei der zuerst ein Hormon oder ein Effektormolekül an den membrangebundenen Rezeptor binden muss.

Als Resultat daraus wird die Phospholipase C (PLC) oder die Phospholipase A2 via G-Proteine aktiviert.

Die aktivierte PLC hydrolysiert das Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3).

Letzteres hat einen Anstieg der Ca²⁺-Ionen zur Folge, welche an die zytosolische Proteinkinase bindet.

Durch die Bindung von Ca²⁺ transloziert die PKC an die Zellmembran, wo sie mit DAG interagiert und ihre volle Enzymaktivität erhält.

1.6.3. Funktion der Proteinkinase C

Die PKC - Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Funktionen wie z.B. bei der Proliferation, Differenzierung, Apoptose (*Nishizuka, 2003*) und bei verschiedensten pathologischen Prozessen (*Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1992; Dekker und Parker, 1994*).

So fanden Arbeitsgruppen heraus, dass eine unadäquate Aktivierung von PKC-Isoformen bei der Entstehung von Krebs und Insulinresistenz, viralen Infektionen als auch bei immunologischen und das zentralen Nervensystem betreffenden Fehlregulationen beteiligt ist.

In Erythrozyten, welche die PKC α , PKC ι , PKC μ and PKC ζ Isoformen (*Govekar und Zingde, 2001*) enthalten, regeln die PKCs die Phosphorylierung sowohl zytoskelettaler Proteine, solche wie Band 4.1, 4.9 und Accucin (*Danilov und Cohen, 1989*), also auch die des Na⁺/H⁺ Antiporter NHE 1 (*Bourikas et al., 2003*). Sie haben Einfluss auf die zytoskelettale Unversehrtheit und auf die Funktion der roten Blutkörperchen.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Wie man seit kurzen weiß, führt eine Senkung des Energieniveaus von Erythrozyten zur Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen, zum Eintritt von Ca^{2+} in das Zytosol, zur Aktivierung einer Ca^{2+} -sensitiven Scramblase und letztendlich zur Expression von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite. Dieses Phospholipid fungiert als Marker für Makrophagen, die mit einem spezifischen Phosphatidylserin-Rezeptor ausgestattet sind, worüber sie die geschädigten Erythrozyten rasch aufnehmen und somit aus dem zirkulierenden Blut entfernen.

Der oben erläuterte Ca^{2+} -Einstrom und die daraus resultierende Signalkette kann in ähnlicher Weise bei einer Zellstimulation mit Diacylglycerin oder Phorbol ester, die beide Proteinkinase C-Aktivatoren darstellen, beobachtet werden. Staurosporin und Calphostin c, zwei Proteinkinase C Inhibitoren, sind dahingegen in der Lage, diesen Mechanismus zu inhibieren und die Phosphatidylserinexposition zu unterbinden. Vermittelt werden all diese Mechanismen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung einzelner Proteine.

Da schon aus früheren Studien bekannt war, dass die Proteinkinase C in menschlichen Erythrozyten exprimiert wird und neben der Phosphorylierung von zytoskelettalen Proteinen auch Einfluss auf die zelluläre Integrität und die Funktion der Erythrozyten hat, stellen wird die Hypothese auf, dass diesem Enzym bei der Regulation des programmierten Erythrozytentods eine entscheidende Rolle zukommt. So vermuteten wir, dass die Proteinkinase C eine Vermittlerrolle bei der durch zellulären Stress ausgelösten Scramblaseaktivierung, z.B. nach Energiedepletion, spielt. Die folgende Studie wurde durchgeführt, um diese Vermutung durch experimentelle Befunde zu stützen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Erythrozyten

2.1.1 Blutzellen und Aufreinigung der Erythrozyten

Für unsere Experimente wurden nur Erythrozyten von gesunden Spendern verwendet, welche zuvor eine Informations- und Einwilligungserklärung unterschrieben hatten. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und genehmigt. Die Erythrozytenkonzentrate wurden von der Blutbank der Universität Tübingen bereitgestellt. Zur Herstellung wurde ein „OptiPure RC quadruple blood pack set“ mit einem Filter von Baxter (Unterschleißheim, Deutschland) eingesetzt. Dabei wurden 500 ml Blut automatisch mit 70 ml des CPD - Puffers gemischt (s. Tab. 6). Die Blutkomponenten wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4795 g und 22°C getrennt. Plasma, Buffy Coat und Erythrozyten wurden dann in die entsprechenden Blutbeutel gepresst.

Portionen der Erythrozytenkonzentrate wurden bis zum Experiment bei 4°C gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des CPD – Puffers.

Substanz	Konzentration (mg/ml)
Zitronensäure	3,27
Natriumcitrat	26,30
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	2,50
Dextrosemonohydrat	25,50

Dabei wurden die Erythrozyten mit SAG-M stabilisierender Lösung (s. Tab. 7) versetzt und bei Raumtemperatur durch einen integrierten Leukozyten - Depletionsfilter gepresst. Die so hergestellten Erythrozytenkonzentrate (30- 90% Hämatokrit) wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die Experimente wurden in isotoner Kochsalzlösung (0,3% Hämatokrit) bei 37°C durchgeführt, um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten.

Tabelle 7: Zusammensetzung der SAG – M Lösung.

Substanz	Konzentration (mg/ml)
NaCl	8,77
Dextrosemonohydrat	9,00
Adenin	0,17
Mannitol	5,25

2.1.2 Analyse der Blutzellzahlen in Vollblut und in den Erythrozytenkonzentraten

In Vollblut und in den Erythrozytenkonzentraten wurde die Zahl an Blutplättchen und an Leukozyten (nur in Vollblut) unter Verwendung eines automatischen Blutzellanalysegerätes (CellDyn3000; Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Die Zellen wurden über die Kombination ihrer optischen und elektrischen Eigenschaften in einem geeigneten Zählermedium erkannt. In Anbetracht der durchgeführten Messungen betrug der Anteil an korpuskulären Teilchen im Erythrozytenkonzentrat $2.4 \pm 0.2\%$ (n=22) des Vollbluts.

Die Quantifizierung der Leukozyten geschah durch den Einsatz der FACS-Analyse an einem Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) unter Benutzung eines international standardisierten Kit (TrueCount) der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Germany). Da der Leukozytenanteil unserer Konzentrate nur $0.012 \pm 0.001\%$ (n=22) der sonst im Vollblut vorhanden Menge entspricht, kann man die verwendeten Konzentrate als Leukozyten-frei betrachten.

2.2 Verwendete Substanzen

2.2.1 Ionomycin

Ionomycin ist ein Ca^{2+} -Ionophor, der Ca^{2+} 1:1 bindet und durch biologische Membranen transportiert. Es wurde in DMSO oder Ethanol gelöst und in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ eingesetzt.

2.2.2 PMA

Phorbol-12-myristate-13-acetat.

Ein kokarzinogen wirksames Diterpen, welches in pflanzlichen Ölen vorkommt (z.B. in Crotonöl) und zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt.

Die eingesetzte Konzentration betrug $3\mu\text{M}$. Als Lösungsmittel diente DMSO

2.2.3 Staurosporin

Staurosporin ist ein zellmembrangängiger PKC Inhibitor.

Eingesetzt wurde eine Lösung mit der Konzentration von $1\mu\text{M}$.

Als Lösungsmittel diente hier DMSO.

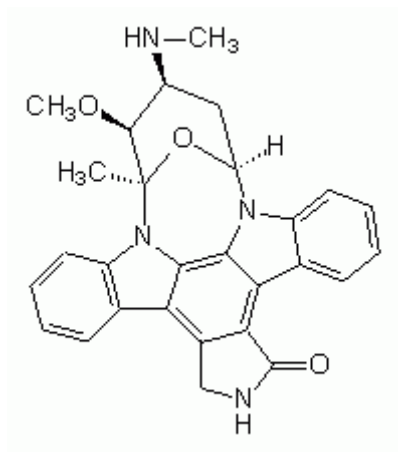


Abbildung 8: Staurosporin (Calbiochem, Deutschland)

2.2.4 K252a

Ebenso wie Staurosporin ist K252a ein nicht- selektiver Inhibitor der Proteinkinase C.

Die eingesetzte Konzentration betrug 1 μ M und als Lösungsmittel diente ebenfalls DMSO

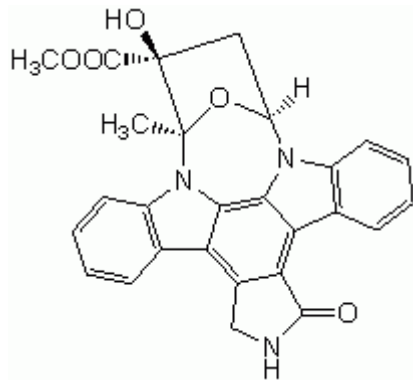


Abbildung 9: K252a (Calbiochem, Deutschland)

2.2.5 Fluo-3/AM

1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N, N, N',N'-tetraacetic Acid Pentaacetoxymethyl Ester. Fluo-3/AM ist ein Ca²⁺-Indikator, welcher membranpermeabel ist. Anders als die übrigen Indikatoren fluoresziert er nicht, ehe er durch die zelluläre Esterase hydrolysiert worden ist.

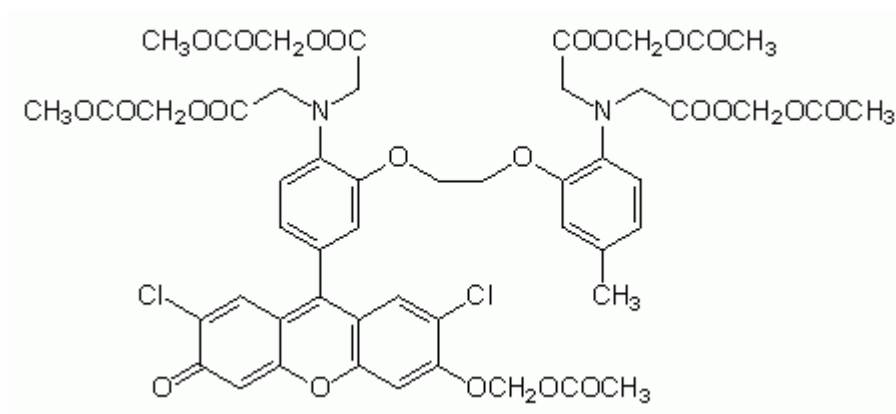


Abbildung 10: Fluo-3/AM (Calbiochem, Deutschland)

2.2.6 Okadaic acid

Okadaic acid, ein von Marine algae produziertes Gift, ist ein komplexer, sehr lipophiler Polyether.

Gelöst in DMSO wurde er in einer Konzentration von 1µM und 10µM eingesetzt.

Die Substanzen Ionomycin, PMA und Staurosporin wurden bei der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) gekauft,

Okadaic acid, K252a und Fluo-3/AM Lösung stammen von der Firma Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

2.2.7 Annexin – V – Fluos

Wie bereits bei Andree et al. (1990) beschrieben, ist das Merkmal der frühen Apoptose durch einen Verlust der asymmetrischen Anordnung der Membranphospholipide gekennzeichnet (*Andree et al., 1990; Fadok et al., 1992; Creutz, 1992*). Es kommt zu einem „flip-flop“ von Phosphatidylserin, welches sich daraufhin auf der Membranaußenseite befindet (*Vermes et al., 1995*). Diese Tatsache wird bei der durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen ausgenutzt.

Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin (*Andree et al., 1990*). Durch Anfärbung der Proben mit diesem Protein können somit apoptotische Zellen in einem Zellgemisch nachgewiesen werden (*Koopman et al., 1994; Homburg et al., 1995; Verhoven et al., 1995*). Um die Menge an gebundenem Annexin – V zu erfassen, wird es mit dem Fluorochrom Fluoreszeinthiocyanat (FITC) konjugiert. Für die vorliegenden Versuche wurde ein Produkt der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Das Annexin-V-Fluos wurde vor dem Gebrauch mit dem Waschpuffer (s. Tab. 12) in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt.

2.3 Verwendete Lösungen

2.3.1 Ringerlösung

Die Ringerlösung (s. Tab. 8) diente als Grundlage für alle Versuche. Mit N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure (HEPES) und Natronlauge (NaOH) wurde die Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Ringerlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	11
HEPES	32
Glukose	5
CaCl ₂	1
NaOH	nach Bedarf

2.3.2 Ca²⁺-freie Lösung

In nominal Ca²⁺-freien Lösungen wurde CaCl₂ durch 1 mM Ethylenglycol-bis (β-aminoethyl Ether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA) ersetzt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Ca²⁺-freien Lösung
pH = 7,4, Osmolarität = 300 mOsm

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	127.5
KCl	5
MgSO ₄	1
HEPES	32
Glukose	5
CaCl ₂	1
NaOH	nach Bedarf

2.3.3. Glukose-freie Lösung

Zur Energiedepletion wurde Glukose (5 mM) aus der NaCl-Ringerlösung entfernt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Glukose-freien Lösung
pH = 7,4, Osmolarität = 300 mOsm

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	1
HEPES	32
EGTA	1
CaCl ₂	1
NaOH	nach Bedarf

2.3.4 Hypertone Lösung 850 mOsm

Die Osmolarität wurde auf 850 mOsm durch Zugabe von Sucrose zur NaCl-Ringerlösung gesteigert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der hypertonen Lösung 850 mOsm

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	1
HEPES	32
Glukose	5
CaCl ₂	1
Sucrose	500
NaOH	nach Bedarf

Die Osmolarität der Lösungen betrug jeweils 300 mOsm, ausgenommen die hypertone Lösung mit 850 mOsm. Kontrolliert wurden die Osmolaritäten der Lösungen mit Hilfe eines VAPRO 5520 Dampfdruck Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA).

2.3.5 Annexin- Waschpuffer

Nach Inkubation der Proben wurde ein speziell für den Annexin- Assay hergestellter Puffer zum Waschen und Verdünnen der Erythrozyten verwendet. Dieser Puffer wurde ebenfalls zur Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes Annexin-V-Fluos (1:50) (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) benutzt.

Die pH-Justierung erfolgte mit N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure und Kalilauge (NaOH) auf pH 7,4

Tabelle 12: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	140
CaCl ₂	5
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

2.4 FACS – Analyse

Der Begriff „FACS“ ist eigentlich ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton – Dickinson und steht für „Fluorescence Activated Cell Sorting“. Inzwischen hat sich der Begriff aber als allgemeine Bezeichnung für die Durchflusszytometrie eingebürgert.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom und ist somit ein

Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen Seine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen - im vorliegenden Fall von Erythrozyten - auf Einzelzellebene zu analysieren.

2.4.1 Geschichtliches

Die Grundlagen für die Durchflusszytometrie, so wie wir sie heute kennen, wurden 1949 von *Wallace Coulter* gelegt. Er beantragte ein Patent für ein Instrument, mit dem man Zellzahl und Zellgröße elektronisch bestimmen konnte. Durch die Entwicklung dieses Gerätes wurde das Zählen von gelösten Partikeln und somit z.B. die Leukozytenzählung für eine Blutanalyse wesentlich erleichtert (*McCarthy et al., 2001*).

2.4.2 Aufbau und Beschreibung

Das typische Durchflusszytometer besteht aus drei funktionellen Einheiten:

- 1.) einer Lichtquelle (meist Laser) mit Messkammer und optischer Einheit
- 2.) einem hydraulischen System, welches die Passage der Partikel regelt
- 3.) einem Computer, der die elektrischen Signale sammelt und auswertet

Im Physiologischen Institut der Universität Tübingen wird das FACS – Calibur der Firma Becton – Dickinson, Heidelberg, Deutschland für die Durchflusszytometrie verwendet (s. Abb. 11).



Abbildung 11: FACS-Calibur der Firma Becton-Dickinson

Dieses Analysegerät ist mit einem Argonlaser (488 nm) ausgestattet. Durch einen zusätzlichen Diodenlaser, welcher auch Farben im roten Spektralbereich erfassen kann, ist eine gleichzeitige Analyse von bis zu vier Farben möglich. Die Flussgeschwindigkeit durch die Messkammer beträgt 6 m/s.

Um bei dem emittierenden Licht die verschiedenen Wellenlängen unterscheiden zu können, werden Interferenz – Filter verwendet. Dadurch werden die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren jeweils verschiedenen Kanälen zugeordnet. In der Regel sind das für 515 - 545nm (grün) der Fluoreszenzkanal „FL1“, für 564 - 606nm (gelb) „FL2“ für >670nm (rot) „FL3“ und für Wellenlängen von 653 – 669nm (rot) FL4 (*Shapiro et al., 2003*).

2.4.3 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Messprinzip beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung. Die zu untersuchenden Zellen wandern in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander, wie an einer Perlenkette, durch eine dünne Messkammer an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbei.

Dadurch, dass die Zellen von dem Laserstrahl getroffen werden, erzeugen sie je nach Zellgröße und – struktur ein ganz bestimmtes Streulicht. Dieses Streulicht, welches dann aus verschiedenen Winkeln von dem FACS – Gerät gemessen wird, liefert mehrere Informationen über die Eigenschaften

(wie z.B. Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der verwendeten Zellen. Meist wird das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) in einem Winkel von $0,7^\circ$ - 10° und das Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter, SSC) etwa im 90° -Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen. Die Größe des Forward – Scatters hängt vor allem von der Größe der Zellen ab, während der Side – Scatter auch von der Binnenstruktur der Zelle und der Membranfaltung bestimmt wird (*Brunsting et al., 1974*).

Die Hauptanwendung der FACS – Analyse besteht in der Erfassung bestimmter Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen wie Zelltyp, Präsentation von Rezeptoren oder Antigenen an der Zelloberfläche, Enzymaktivitäten oder DNA – Gehalt. Dies gelingt durch Konjugation mit spezifischen Fluorochromen. Die Zellen werden hierbei 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 (*McCarthy et al., 2001*).

Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle (*Darzynkiewicz et al., 1994; McCarthy et al., 2001*). Die Messergebnisse werden dann graphisch in einem sog. Dot Plot dargestellt, wobei jeder abgebildete Punkt einem Messwert entspricht (s. Abb. 12).

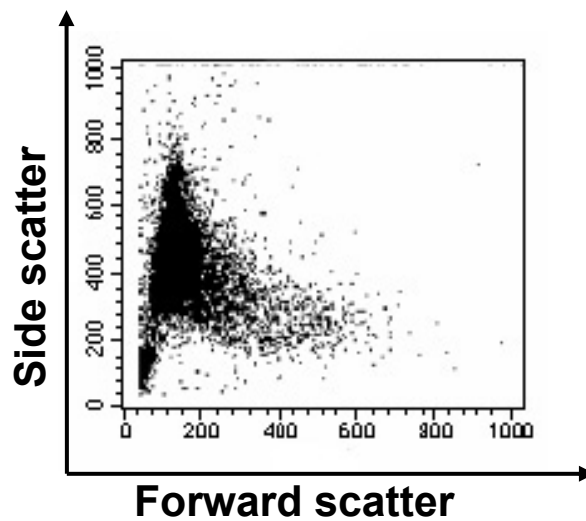


Abbildung 12: Dot Plot (Physiologisches Institut Tübingen)

2.4.4 Durchführung einer FACS – Analyse

- Nach Inkubation der Proben bei 37 °C wurden jeweils 100µl Zellsuspension in 1ml Annexin – Waschpuffer (s. 2.3) gewaschen. Dazu wurden die Proben 5 Minuten lang bei 3600 Umdrehungen zentrifugiert.
- Anschließend wurden die Erythrozyten in 100µl einer Lösung bestehend aus Annexin – V – Fluos und Annexin – Waschpuffer (1:50) resuspendiert.
- Dann folgte eine 10 – minütige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur.
- Schließlich wurden die Proben mit Annexin – Waschpuffer 1:5 verdünnt und mit dem FACS – Calibur (Beckton Dickinson) gemessen (FL1, FSC).

2.4.5 Auswertung der Messdaten

Die Datenerfassung und – weiterverarbeitung erfolgte an einem Macintosh – Computer mit Hilfe der Cell Quest Software, ebenfalls ein Produkt der Firma Becton - Dickinson.

2.5 Intrazelluläre Ca²⁺- Messungen -Fluo-3/AM

Mittels der FACS-Analyse kann auch der intrazelluläre Ca²⁺-Gehalt ermittelt werden. Dazu wurde die Methode nach Andrews et al. (2002) verwendet. Die Erythrozyten werden dabei mit Fluo-3/AM beladen (Calbiochem; Bad Soden, Deutschland).

Vorgehensweise

- Inkubation von 1 ml einer Erythrozytensuspension (0,16 % Hämatokrit in Ringer) mit 2 µl einer Fluo-3/AM Stammlösung (2,0 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO)) bei 37 °C für 15 Minuten unter Schütteln und Lichtausschluss.
- Anschließend wurden noch einmal 2 µl der Fluo-3/AM–Stammlösung zu den Proben pipettiert und die Zellen erneut für 25 Minuten inkubiert.
- Die mit Fluo-3/AM-beladenen Erythrozyten wurden dann bei 22 °C fünf Minuten lang zentrifugiert (1000 g) und danach zuerst zweimal mit einer Ringerlösung, die 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA) enthielt, dann einmal mit reiner Ringerlösung gewaschen.
- Für die Durchflusszytometrie wurden Fluo-3/AM - beladene Erythrozyten in 1 ml Ringerlösung (0,16 % Hämatokrit) resuspendiert und alle Proben bis auf die Kontrollen mit Okadaic acid (10 µM) bzw. mit dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin (1 µM) versetzt und für unterschiedliche Zeitabschnitte bei 37 °C inkubiert.

- Danach wurde die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-1 bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

2.6 Proteinkinase C-Aktivitäts- Nachweis

2.6.1 Beschreibung des Nachweisverfahren

Der PKC Assay dient sowohl zum Screenen von Inhibitoren als auch von Aktivatoren der Proteinkinase C und zur Quantifizierung der PKC Aktivität in aufgereinigten, teilweise aufgereinigten oder unbehandelten Enzympräparaten. Er basiert auf dem Prinzip eines ELISAs (enzyme-linked-immuno-adsorbance-assay), indem ein für die PKC spezifisches synthetischen Peptid als Substrat dient und die Phosphorylierung dessen von einem polyklonalen Antikörper erkannt wird.

Dieser Assay wurde zur Analyse der PKC in flüssigen Phasen entwickelt (Stressgen Biotechnologies).

2.6.2 Inhalt des Proteinkinase C-Kits

- PKC Substrat Mikrotiter Platte
- Phosphorspezifischer Substrat Antikörper
- Anti-Rabbit IgG: HRP Konjugat
- Antibody Dilution Buffer
- Kinase Assay Dilution Buffer
- ATP
- 10X Waschpuffer
- Aktive PKC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- TMB Substrat
- Acid Stop Solution

Alle im Kit vorhandenen Substanzen, ausgenommen die PKC, welche man bei -70 °Grad einfrieren musste, wurden im Kühlschrank bei 4-8 °Grad aufbewahrt.

2.6.3 Durchführung

Das Erythrozytenkonzentrat mit einem Hämatokrit von 5% wurde für einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden jeweils in Ringer und in einer Glukose-freien Lösung (s. 2.3.) bei 37 °Grad inkubiert.

Danach wurden die Erythrozyten für 5 Minuten bei 1100g und 4 °Grad herunterzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Pellet nach Zugabe von 1 ml PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline) gewaschen.

Daraufhin wurden 150µl des Protease-Lysis-Puffer (s. Tabelle 13) zupipettiert, die Proben gevortext und für 30 Minuten auf Eis gestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Protease-Lysis-Puffers

Substanz	Konzentration (mM)
Sodium-ortho-Vanadat	5
Tris/HCL (pH 7.4)	20
EGTA	5
Triton X-100	1%
Protease- Inhibitoren Cocktail (Roche Diagnostics)	1Tablette
➤ Pepstatin A	10 µg/ml
➤ Leupeptin	10 µg/ml
➤ Aprotinin	5 µg/ml
➤ Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	0.1mM

Es folgte eine Zentrifugation bei 22000g und 4 °C für 15 Minuten zur Sedimentation des Zell-Detritus.

Zur Bestimmung der Proteinmenge im klaren Überstand wurde die Bradford-Methode (Biorad, München, Germany) mit Rinderserumalbumin (BSA; Sigma, Taufkirchen Deutschland), Stammlösung 10mM, als Standart angewandt.

PKC – Aktivität in den Erythrozytenextrakten wurde mit dem StressXpress PKC Kinase Activity Assay Kit von Stressgen, hergestellt von BIOMOL GmbH (Hamburg, Deutschland) bestimmt.

Dafür wurden 5-20 µg zelluläres Protein in PKC- Substrat Mikrotiter Platten pipettiert, in welchen sich schon der Protein- Kinase- Assay- Dilution- Buffer befand.

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM ATP.

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei einer Temperatur von 30°C wurde die Reaktion durch starkes Ausklopfen der einzelnen Platten gestoppt.

Danach wurde 40 µl des phosphospezifischen Antikörpers hinzupipetiert, die Proben bei Raumtemperatur weitere 45 Minuten inkubiert und 4 Mal mit Waschpuffer gewaschen.

Es folgte eine erneute Inkubation von 30 Minuten, ebenfalls bei Raumtemperatur, mit 40 µl des verdünnten Anti- Rabbit IgG: Peroxidase (HRP) Konjugats (1:1000) und danach ein 4 maliges Waschen mit dem Waschpuffer.

60 µl Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat wurde zu den einzelnen Platten hinzu gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl der Acid- Stopp- Solution gestoppt.

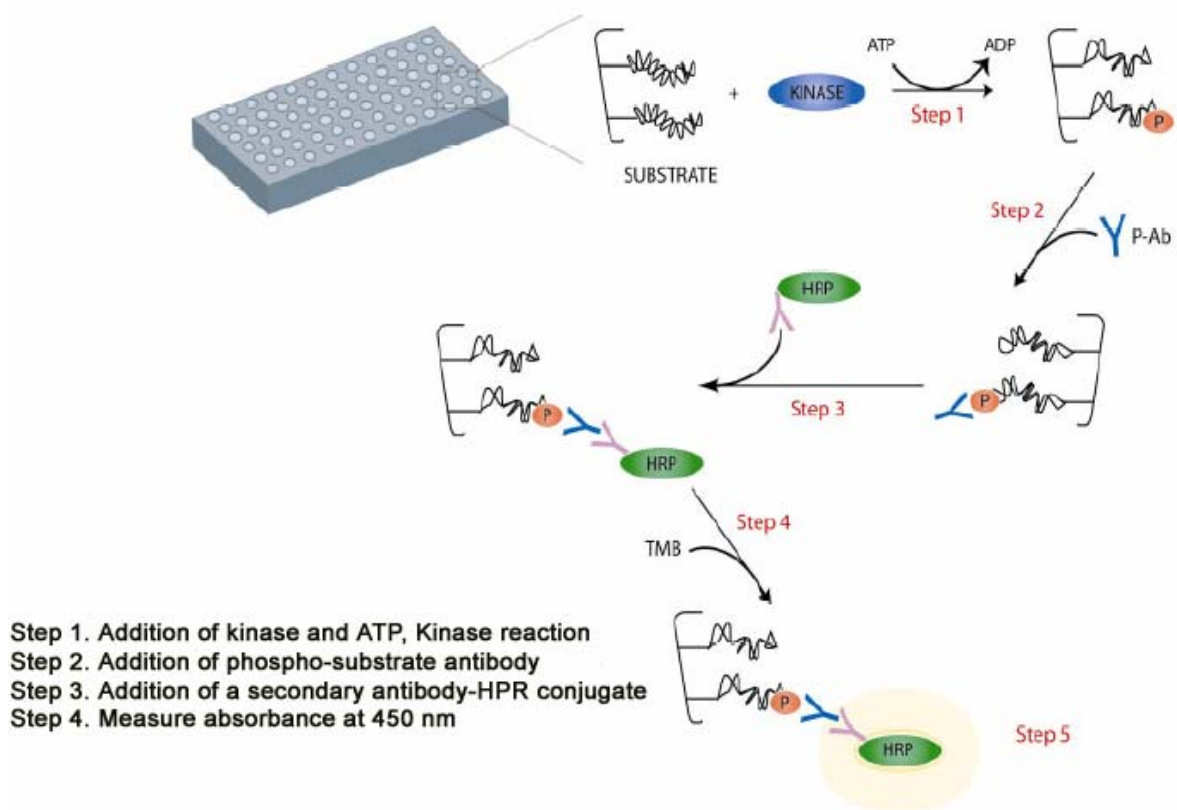
Das Absorbtionsspektrum bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde durch den Sunrise Microplate Reader von Tecan (Crailsheim, Deutschland) gemessen.

Ein PKC-freier Lysis Puffer als Negativkontrolle und 20ng der aufgereinigten PKC als Positivkontrolle liefen in jeder Serie mit.

Der Absorbtionswert der Negativkontrolle wurde von den Werten der jeweiligen Proben subtrahiert.

Die PKC Aktivität in den mit Glukose- freier Lösung behandelten Erythrozyten wurde in Prozent gegenüber den mit Ringer (5 mM Glukose enthaltend) behandelten angegeben.

Weiter wurde durch den Einsatz steigender Konzentrationen von Staurosporin (0.1 - 3 μM) zu dem Kinase- Assay- Dilution- Buffer während der Substrat- Phosphorylierungsphase die Selektivität der PKC- abhängigen Erythorzytenapoptose des Assays getestet.



Step 1. Addition of kinase and ATP, Kinase reaction
Step 2. Addition of phospho-substrate antibody
Step 3. Addition of a secondary antibody-HRP conjugate
Step 4. Measure absorbance at 450 nm

Abbildung 13: Durchführung eines PKC-Assays (Stressgen Biomol)

2.7 ATP- Messung

Adenosintriphosphat ist ein zur Gruppe der Mononukleotide gehöriges Molekül, das über Anhydridbindungen gebundene, energiereiche Phosphatreste enthält und damit als Hauptenergiespeicher innerhalb von Zellen dient.

Adenosintriphosphat besteht aus dem Molekül Adenin, das über eine O-glykosidische Bindung an den Fünferzucker Ribose gebunden ist. Am 5'-Ende des Zuckermoleküls befindet sich ein Triphosphatrest, dessen erste Phosphatgruppe als Ester und die beiden anderen anhydridisch gebunden sind.

2.7.1 Durchführung

Für die Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts wurden die Erythrozyten 3 Mal für jeweils 5 Minuten in einem PBS Ca^{2+} -freien Medium gewaschen, herunterzentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

100 μl des Blutzellpellet wurden für 1,5, 6, 12 und 24 Stunden bei 37°C in Standard- Ringer- Lösung und einer O-Glukose-Lösung, jeweils mit oder ohne 2-Deoxyglukose (2-DOG) in einer Konzentration von 10 mM inkubiert. 2-DOG ist ein nicht-metabolisierbarer Zucker, der die Glykolyse vergiftet und dadurch die in der Zelle vorhandene Menge an ATP sehr schnell herunterreguliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit destilliertem Wasser lysiert und die vorhandenen Proteine durch Zugabe von Perchlorsäure (HClO_4) (5%) ausgefällt.

Daraufhin wurden die Proben erneut zentrifugiert und 400 μl klarer Überstand abgenommen. Dieser wurde mit einer aufgesättigten Kaliumtrihydrogenkarbonatlösung auf pH 7,7 eingestellt.

Alle oben beschriebenen Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt um einen Abbau von ATP zu verhindern. Die ATP-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe des Luciferin-Luciferase Assay Kit (Roche Diagnostics, Mannheim,

Deutschland) und eines Luminometers (Berthold Biolumat LB9500 Bad Wildbad, Deutschland) gemäß des Herstellerprotokolls bestimmt.

Angegeben wurden die ATP-Konzentrationen in mM/ Erythrozytenvolumen.

2.8 Statistik

Von den gemessenen Daten wurden das arithmetische Mittel und der Standardfehler (SEM) bestimmt. „n“ gibt dabei 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 ANOVA¹ – Test beim Vergleich mehrerer Versuche durchgeführt. Dabei wurden nur p – Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

¹ Analysis of variance

3. Ergebnisse

3.1 Exposition von Phosphatidylserin

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in Ringerlösung wiesen die humanen Erythrozyten nur einen geringen Anteil an Phosphatidylserin-exponierenden Zellen auf (Abb. 14; linkes Histogramm).

Die Anzahl der geschädigten roten Blutkörperchen wurde mittels Durchflusszytometrie aus $n = 6$ Messungen ermittelt und diente als Kontrollwert.

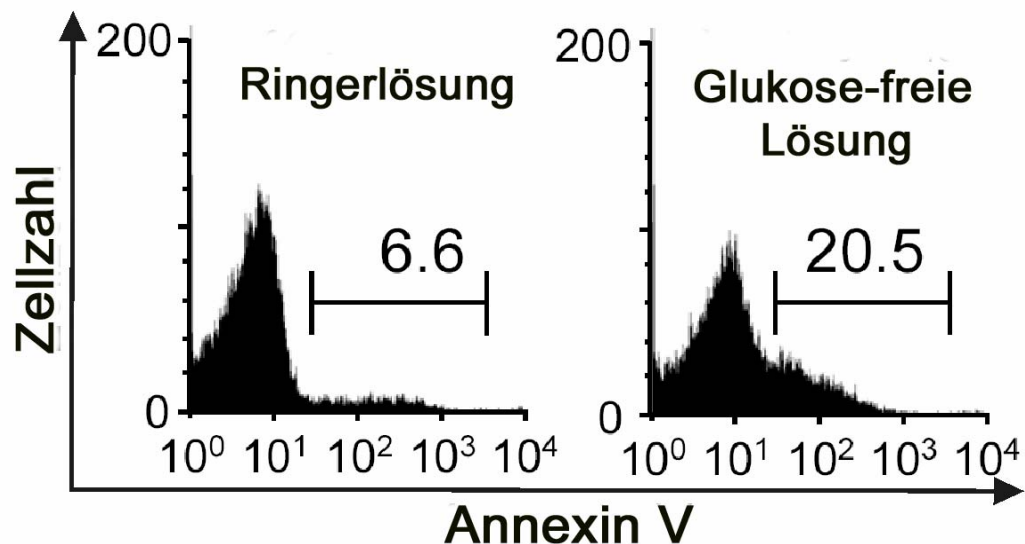


Abbildung 14: Stimulation der Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Erythrozytenmembran nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in Ringerlösung und in einer Glukose-freien Ringerlösung. Die Histogramme zeigen den jeweiligen Anteil an Annexin- bindenden Zellen in einem repräsentativen Experiment. Links befindet sich das Messergebnis nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in Ringerlösung. Rechts ist der Wert für eine ebenfalls 48 stündige Inkubation in einer Glukose-freien Lösung aufgetragen. Ermittelt wurden diese Daten mittels Durchflusszytometrie.

Inkubierte man jedoch die humanen Erythrozyten in einer Glukose-freien Lösung für den oben genannten Zeitraum, so trat, hervorgerufen durch die Energiedepletion, ein signifikanter Anstieg der Phosphatidylserinexposition auf der Membranaußenseite der Zellen auf (Abb.14; rechtes Histogramm).

Um der Frage nachzugehen, ob die Proteinkinase C an der Exposition von Phosphatidylserin nach Energiedepletion beteiligt ist, versuchten wir als erstes, den durch Energiedepletion hervorgerufenen Anteil an geschädigten Zellen durch den Einsatz von Staurosporin, einem PKC-Inhibitor, in einer Konzentration von 1 μM zu hemmen. Wie aus *Abbildung hervorgeht, konnte durch den Einsatz von Staurosporin der Anstieg an Annexin-positiven Zellen deutlich reduziert, jedoch nicht völlig unterbunden werden.

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist von einer Beteiligung der Proteinkinase C bei der Auslösung der Phosphatidylserinexposition nach Energiedepletion auszugehen.

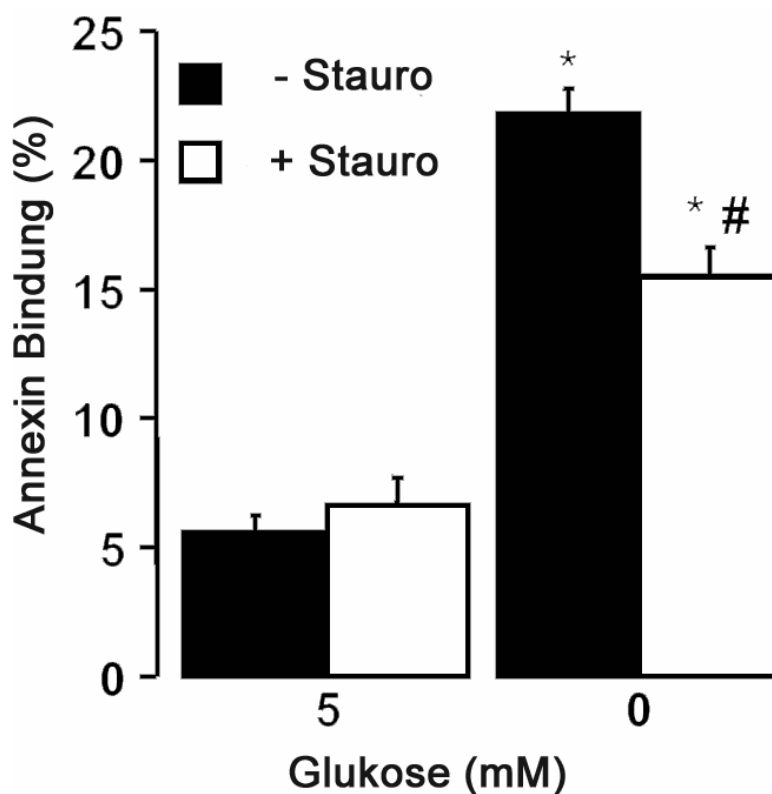


Abbildung 15: Anzahl der Annexin-bindenden Erythrozyten nach 48 Stunden Inkubation in Ringerlösung und einer Glukose-freien Lösung jeweils in An- oder Abwesenheit von Staurosporin (1 μM). Die Daten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst und über einen Zeitraum von 48 h aufgezeichnet. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=6$. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Glukose-freien Ringerlösung ($p \leq 0,05$; ANOVA).

3.2 Bestimmung der Zellgröße

Wie bereits aus anderen Arbeiten bekannt ist, führt Energiedepletion zu einer Zellschrumpfung durch osmotisch bedingten Wasserverlust.

Da wie oben gesehen, Staurosporin die Phosphatidylserinexposition nach Energiedepletion minimiert, lag der Verdacht nahe, dass Staurosporin auch Einfluss auf die Zellgröße der in Glukose-freier Lösung inkubierten Erythrozyten nehmen könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden weitere durchflusszytometrische Messungen durchgeführt und der Forward-Scatter analysiert. So konnte gezeigt werden, dass Staurosporin, eingesetzt in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ auch die nach Energiedepletion auftretende Zellschrumpfung um bis zu 24% inhibieren kann.

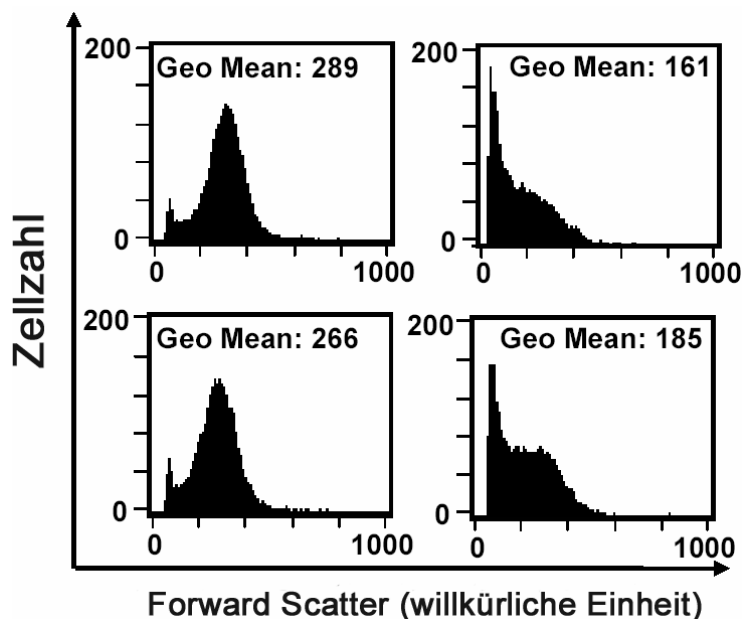


Abbildung 16: Abnahme des Forward Scatters hervorgerufen durch Energiedepletion nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in einer Glukose-freier Lösung in An- oder Abwesenheit von Staurosporin. Die Histogramme zeigen den Forward-Scatter in einem typischen Experiment. Dabei wurden die Erythrozyten unterschiedlichen Lösungen ausgesetzt. Die Diagramme zeigen Werte für die Inkubation in reiner Ringerlösung (linkes oberes Bild) bzw. in Ringerlösung versetzt mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin (rechtes oberes Bild) und nach Inkubation in reiner O- Glukoselösung (linkes unteres Bild) bzw. in O- Glukoselösung versetzt mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin (rechtes unteres Bild). Die Anzahl der Versuche betrug $n=10$.

3.3 Messung der PKC-Aktivität in Erythrozytenextrakten unter verschiedenen Bedingungen

Als erstes wurde ein Vorversuch durchgeführt, um den zur Messung der PKC Aktivität verwendeten Assay zu verifizieren und um herauszufinden, ob und wenn ja in welcher Größenordnung die von uns verwendeten Erythrozytenextrakte aktivierte PKC besitzen.

Dafür wurde das zelluläre Protein in steigenden Mengen von 5-20 μg in die dafür vorgesehenen PKC- Substrat Mikrotiter Platten zupipetiert und der Versuch nach dem in Materialien und Methoden beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Ausgewertet wurden alle Versuche mit dem Sunrise Microplate Reader von Tecan (Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm.

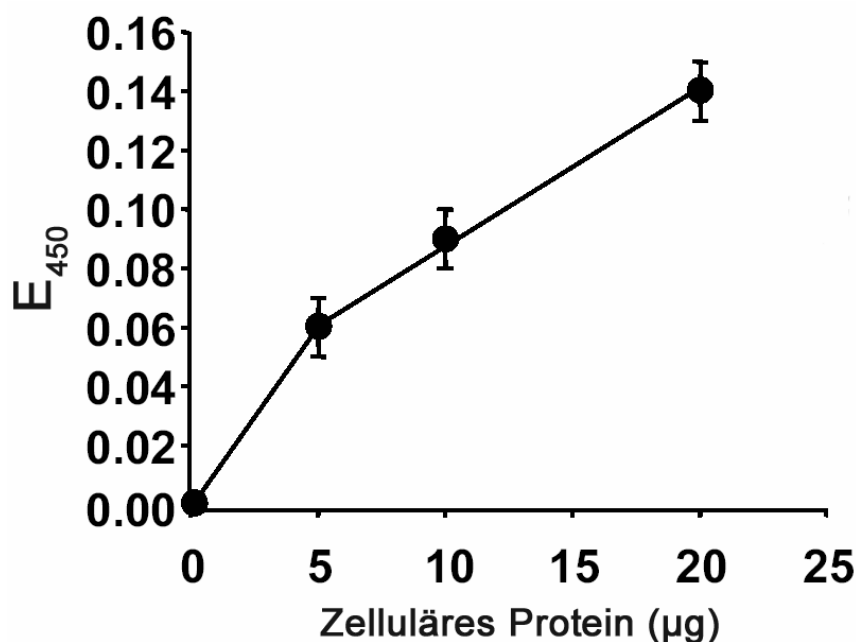


Abbildung 17: Messung der PKC- Aktivität von Erythrozytenextrakten. In diesem Versuch wurde die Menge an aktivierter Proteinkinase ermittelt. Hierfür wurden verschiedene Mengen an zellulärem Protein verwendet und mittels eines spezifischen Assay wurde die PKC-Aktivität ermittelt. Gemessen wurde bei einem Absorptionsmaximum von 450. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt bei $n=3$. Wie in Abb. 17 gezeigt, enthalten Erythrozytenextrakte eine von der Proteinmenge abhängige PKC- Aktivität.

Nun ging es darum herauszufinden, wie sich die PKC Aktivität der Erythrozyten unter Energiedepletion ändert. Hierfür wurden die roten Blutkörperchen in Ringer oder Glukose- freier Lösung für 24 und 48 Stunden inkubiert. Wie aus Figur 18 zu entnehmen ist, kommt es zu einem signifikanten Anstieg der PKC Aktivität nach Inkubation in einer Glukose-freien Lösung.

So wurde bereits nach 24 Stunden ein Zuwachs an Aktivität um 31% und nach 48 Stunden sogar um 65% in den verwendeten Proteinextrakten verzeichnet.

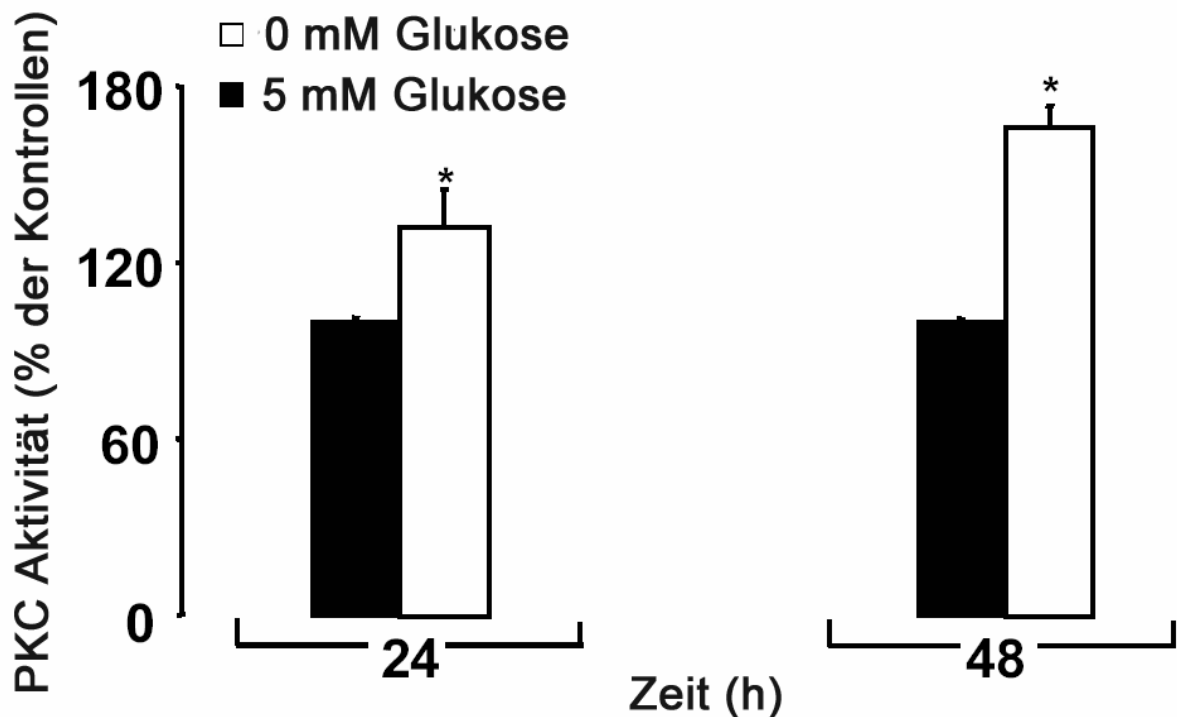


Abbildung 18: PKC Aktivität nach Inkubation für 24 und 48 Stunden in reiner Ringerlösung und in einer Glukose-freier Ringerlösung. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=6-9$) der PKC Aktivität von Erythrozyten nach 24 stündiger Inkubation (linke Säulen) und nach 48 Stunden (rechte Säulen) in reiner Ringerlösung (schwarze Säulen) oder Glukose- freier Lösung (weiße Säulen) Die PKC-Aktivität ist ausgedrückt in Prozent der Kontrollen (in Ringerlösung inkubierte Erythrozyten). * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung ($p \leq 0,05$; ANOVA).

Die oben beschriebene Aktivitätszunahme bei Zellextrakten, welche in Glukose-freiem Medium inkubiert worden sind, war Staurosporin sensitiv. So konnte durch die in vitro Zugabe von Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen (0.25-3 μM) die Aktivität der Proteinkinase C in 20 μg Erythrozytenextrakt fast vollständig unterbunden werden, was die oben beschriebenen Ergebnisse stützt.

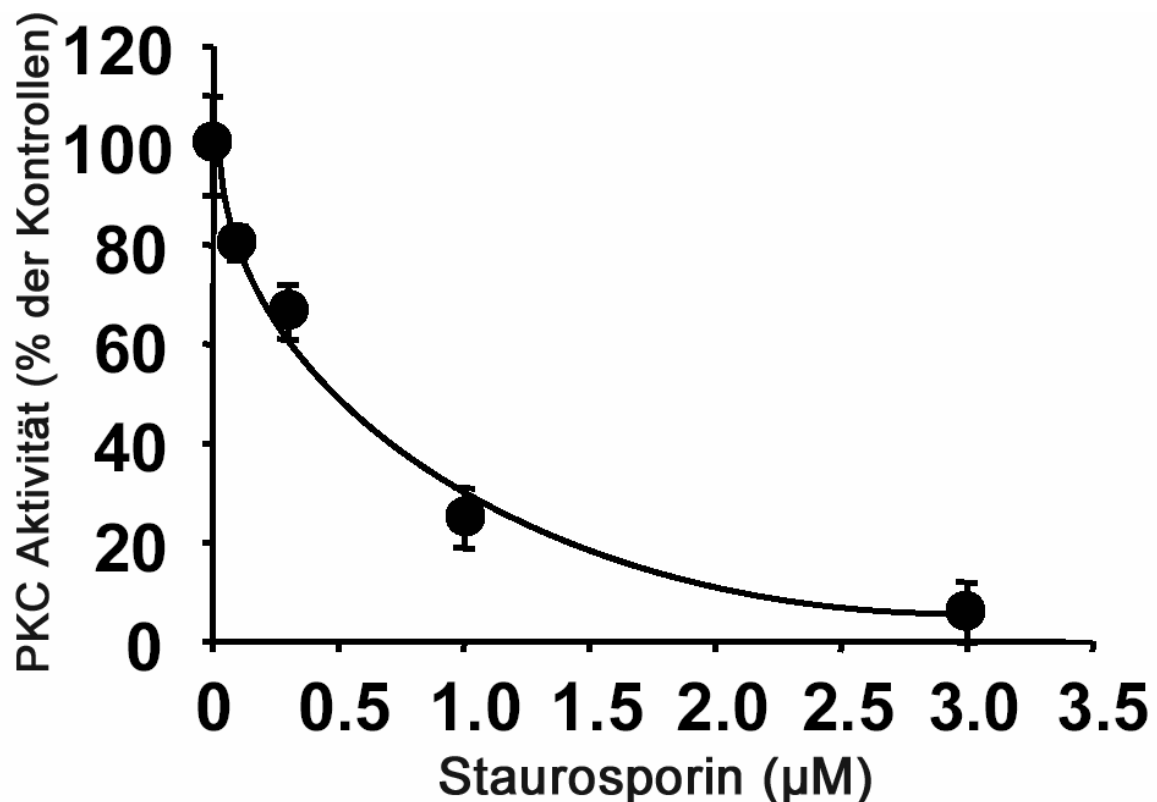


Abbildung 19: Messung der in vitro PKC Aktivität in 20 μg erythrozytärem Proteinextrakt, welches für 48 Stunden mit Glukose-freier Ringerlösung behandelt wurde, in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Staurosporin. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt mit $n=4$.

Um eine Positiv- und Negativkontrolle zu Vergleichszwecken zu erhalten, liefen in allen Serien ein PKC-freier Lysis Puffer als Negativkontrolle und 20ng einer aufgereinigten PKC (Enzym -) Präparation als Positivkontrolle mit.

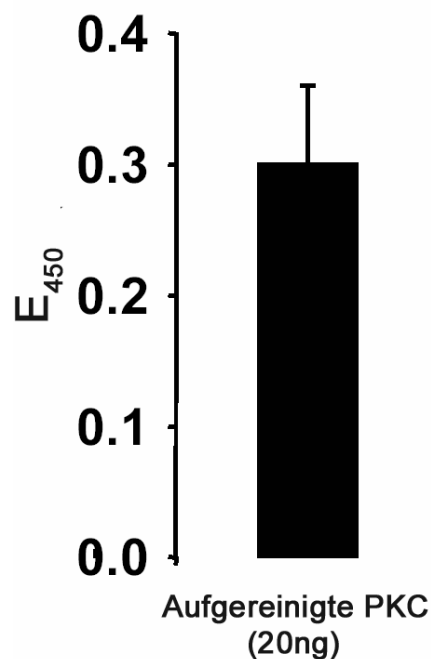


Abbildung 20: Die Aktivität von 20 ng aufgereinigter PKC als Positivkontrolle. Gemessen wurde bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm (E_{450}).

3.4 ATP- Messung

Wie aber kann man erklären, dass es unter Energiedepletion, das heißt trotz einer signifikanten Erniedrigung der ATP Menge in den Erythrozyten, zu einer Aktivierung der ATP-verbrauchenden Proteinkinase C kommt? Um dies besser einschätzen zu können, wurde zunächst die ATP Konzentration nach Wegnahme der Glukose aus dem Medium gemessen. Dafür wurden die Erythrozyten in reiner Ringerlösung oder in einer Glukose- freien Ringerlösung für unterschiedliche Zeiträume inkubiert.

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, kommt es zwar unter dem Einsatz der Glukose-freien Lösung zu einem drastischen Absinken der ATP Menge, jedoch sind nach 20 stündiger Inkubation immer noch ungefähr 200 μM ATP vorhanden. Diese Menge an ATP scheint für die Aktivität der PKC ausreichend zu sein, da nach 20 Stunden in Anwesenheit von PMA immer noch eine Erhöhung der Serin-phosphorylierten Proteine im Western Blot nachzuweisen

war (im Vergleich mit entsprechend behandelten Kontrollzellen). Diese Daten werden hier nicht gezeigt.

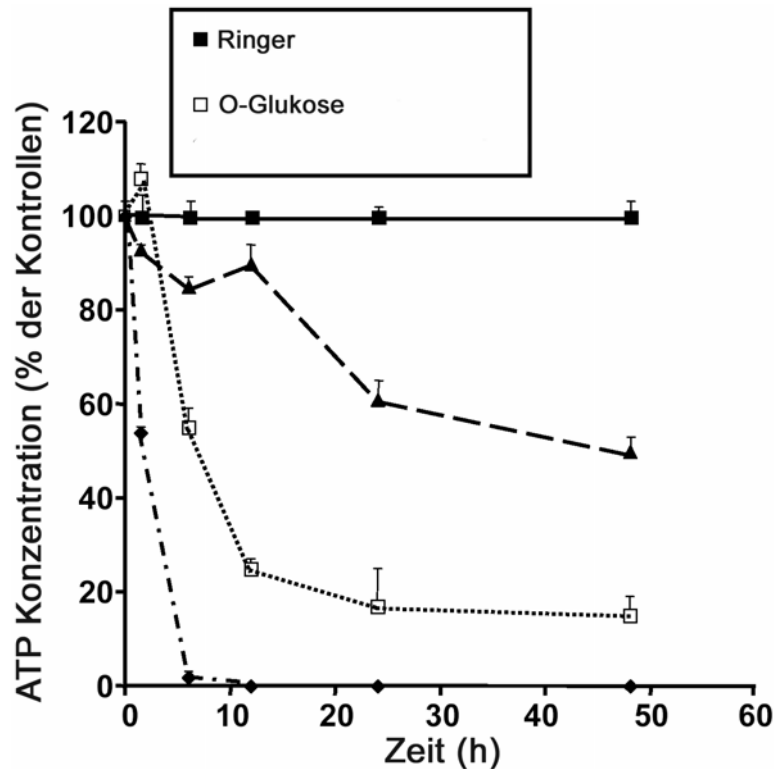


Abbildung 21: ATP- Messung nach Inkubation in reiner Ringerlösung und in einer Glukose-freien Lösung für unterschiedliche Zeiträume. Angegeben werden die Konzentrationen an ATP als Prozentwerte im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=4).

3.5 Einfluss des Phosphorylierungsgrades von Proteinen auf die Eryptose

3.5.1 Inkubation der Erythrozyten mit Phorbolster und/oder Okadaic acid

Die hier aufgeführten Versuche wurden durchgeführt, um sich Klarheit darüber zu verschaffen, ob eine PKC- abhängige Proteinphosphorylierung und/ oder eine reduzierte Proteindephosphorylierung Einfluss auf die Exposition von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite der Erythrozyten hat. Dafür erfolgte eine Inkubation der Erythrozyten in Ringerlösung für 24 Stunden unter

Zugabe von 3 μM Phorbol ester, welcher zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und folglich zu einer Phosphorylierung von Proteinen führt.

Gleichzeitig wurden Erythrozyten für denselben Zeitraum in Ringerlösung, unter Zugabe von 1 μM Okadaic acid inkubiert. Okadaic acid ist ein Inhibitor der Serin- Threonin Phosphatase und verhindert die Dephosphorylierung von Proteinen.

Wie aus Abbildung 22 zu entnehmen ist, führt der Einsatz sowohl von Phorbol ester (mittleres Schaubild), als auch Okadaic acid (rechtes Schaubild) zu einer vermehrten Phosphatidylserinexposition.

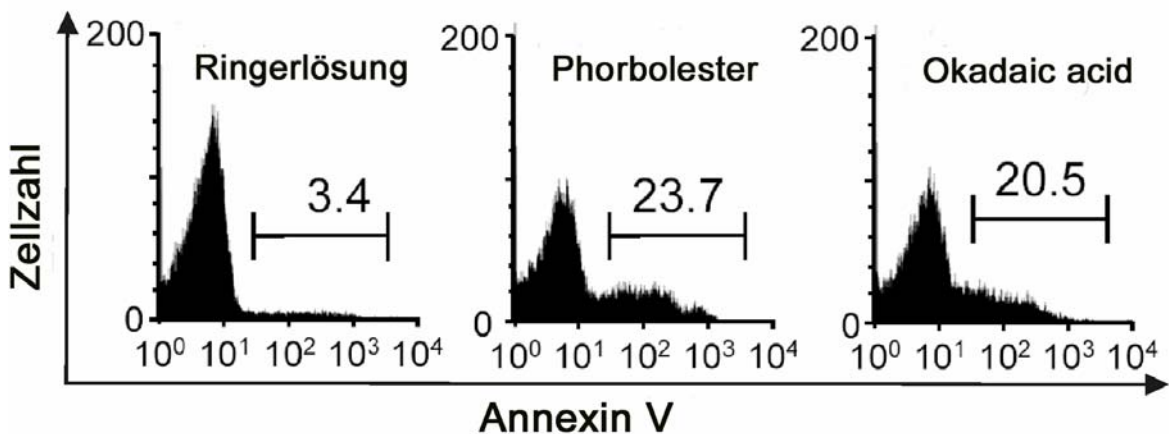


Abbildung 22: Stimulation der Phosphatidylserinexposition auf der Außenseite der Erythrozytenmembran nach Behandlung mit Phorbol ester PMA und dem Phosphataseinhibitor Okadaic acid. Die Histogramme zeigen den jeweiligen Anteil an Annexin-bindenden Zellen in einem repräsentativen Experiment. Links befindet sich das Messergebnis nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in reiner Ringerlösung. Die folgenden zwei Diagramme sind Originalhistogramme für eine ebenfalls 24 stündige Inkubation in Ringerlösung, welche jedoch noch zusätzlich 3 μM PMA (mittleres Diagramm) und 1 μM Okadaic acid (rechtes Diagramm) enthalten.

Erfolgte eine Inkubation der Erythrozyten mit beiden Substanzen gleichzeitig, so kam es zu einer gegenseitigen Verstärkung der oben gesehenen Effekte.

Der Anteil an Annexin- positiven Zellen stieg bei Kombination der beiden Substanzen stark an (auf ca. 50% der Gesamtpopulation).

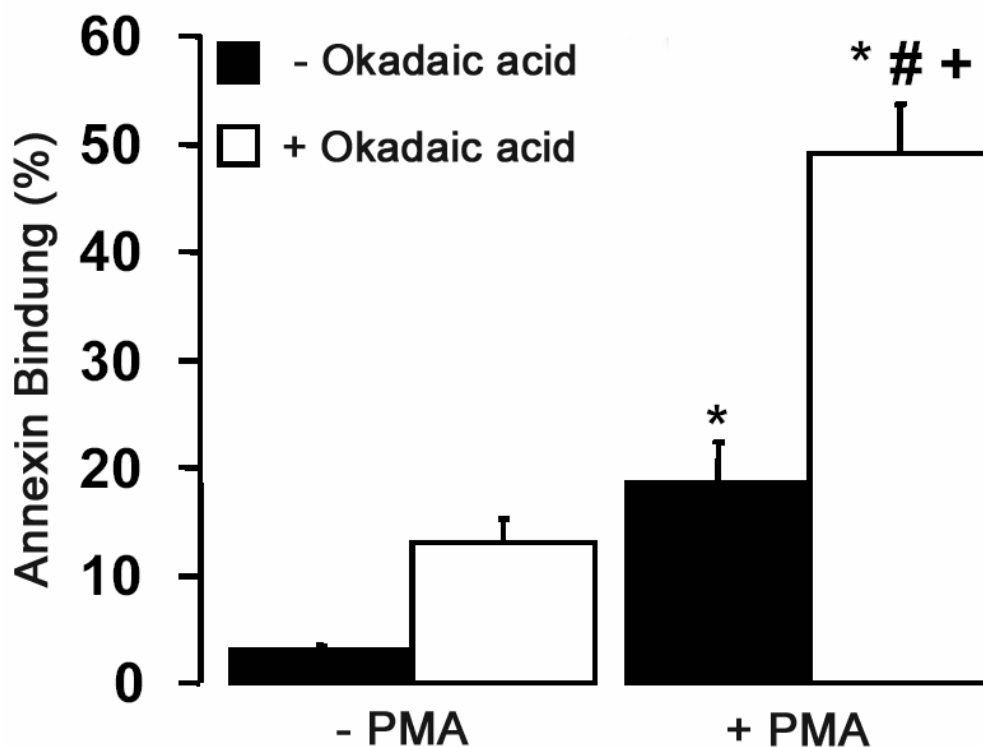


Abbildung 23: Stimulation der Phosphatidylserinexposition auf der Außenseite der Erythrozytenmembran nach Behandlung mit Phorbol ester (PMA) in An- oder Abwesenheit von Okadaic acid. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=10$) an Annexin-bindenden Zellen nach 24 stündiger Inkubation in Ringerlösung (linke Säulen) oder 3 μM Phorbol ester PMA (rechte Säulen) in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von 1 μM Okadaic acid. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Okadaic acid und + einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu einer 3 μM PMA enthaltenden Ringerlösung ($p \leq 0,05$ ANOVA).

Parallel zu dem Effekt auf den Anteil Annexin-bindender Zellen nach Inkubation mit Phorbol ester oder Okadaic acid, verhielt sich der Forward Scatter. Es kam zu einer deutlichen Verkleinerung des Zellvolumens.

Ebenso wie bei der Phosphatidylserinexposition konnte nach Inkubation mit beiden Substanzen auch bei dieser Messung eine Verstärkung der zellschädigenden Effekte beobachtet werden.

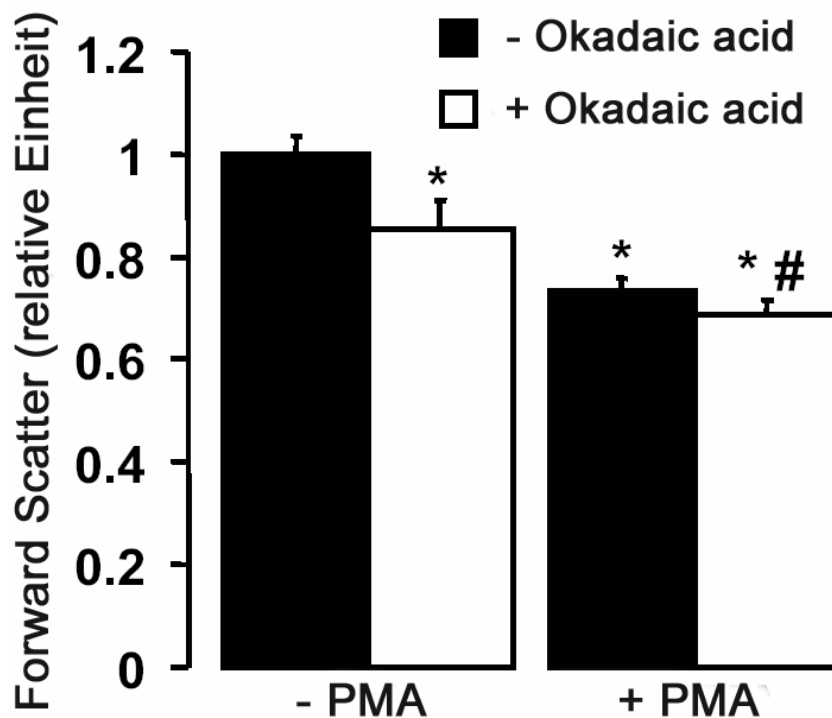


Abbildung 24: Forward Scatter nach Behandlung der Erythrozyten mit Phorbol ester (PMA) und dem Phosphataseinhibitor Okadaic acid. Vergleich des Forward-Scatters von Erythrozyten in Ringerlösung (linke Säulen) oder Phorbol ester-haltiger Ringerlösung (rechte Säulen) nach 24 Stunden Inkubation jeweils in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von Okadaic acid. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei jeweils $n = 10$. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Okadaic acid ($p \leq 0,05$ ANOVA).

Somit begünstigt sowohl eine Stimulierung der Proteinphosphorylierung durch die PKC, als auch eine Inhibierung der Proteindephosphorylierung, hier durch den Einsatz von Okadaic acid verursacht, den Tod der Erythrozyten.

3.5.2 Inkubation der Erythrozyten mit K252a- einem Serin-Threonin-Kinasen Inhibitor

Aus dem oben Beschriebenen abgeleitet müsste eine Inhibierung der aktivierten Proteinkinase C zu einem verminderten Anteil an Annexin-bindenden Zellen führen. Um dieser Vermutung nachzugehen, inkubierten wir die Erythrozyten mit einem Breitband PKC- Inhibitor.

K252a verhindert die Aktivierung der Proteinkinase C, sowie der PKA und der Ca^{2+} /Calmodulin – abhängigen Proteinkinase.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen, war der Effekt von 1 μ M Okadaic acid auf die Erythrozyten unter dem Einsatz von 1 μ M K252a nach 24 Stunden Inkubation in Ringerlösung vollständig aufgehoben. K252a senkte den Anteil an Phosphatidylserin- exponierenden Zellen um 9.7 ± 3.1 % auf den Wert der Kontrollzellen.

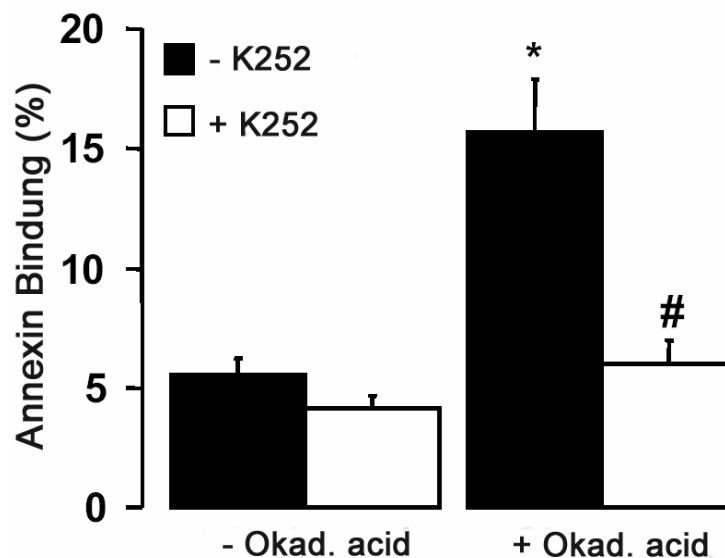


Abbildung 25: Stimulation der Phosphatidylserinexposition auf der Außenseite der Erythrozytenmembran durch den Phosphataseinhibitor Okadaic acid in An- oder Abwesenheit des Kinaseinhibitors K252a. Darstellung der Annexin- bindenden Zellen nach 24 stündiger Inkubation in Ringerlösung (linke Säulen) oder Okadaic acid-haltiger Ringer (rechte Säulen) jeweils in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von K252a. Angegeben sind die Werte als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei jeweils $n = 6$. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Okadaic acid ($p \leq 0,05$ ANOVA).

Bei der Bestimmung des Zellvolumens mit Hilfe des Forward Scatters konnte ebenfalls eine Hemmung der durch Okadaic acid hervorgerufenen Zellschrumpfung beobachtet werden (Abb. 26).

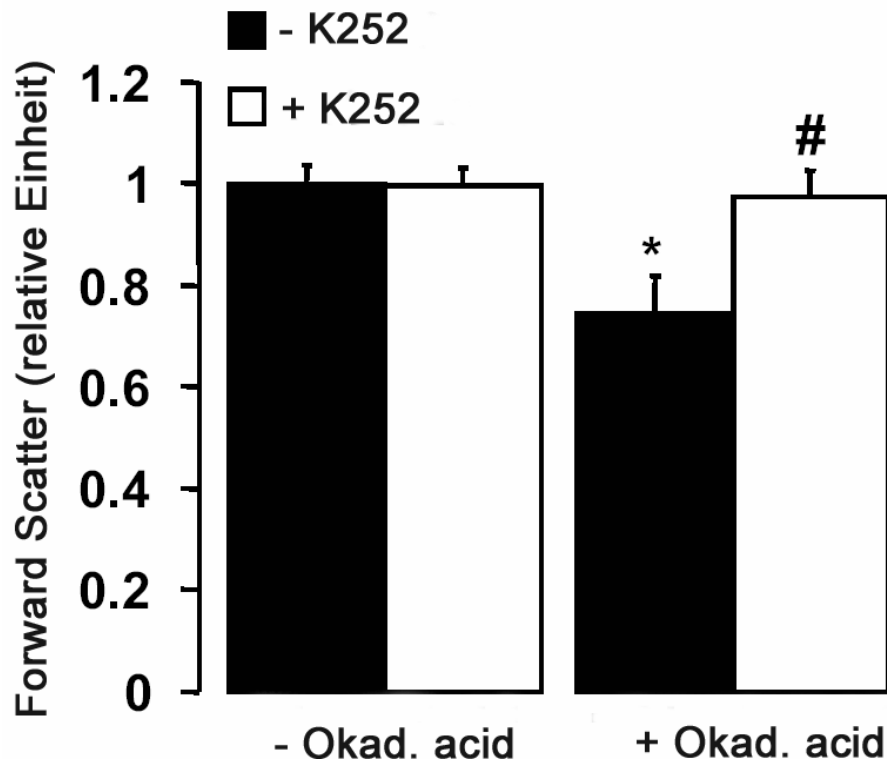


Abbildung 26: Forward Scatter der Erythrozyten nach Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Okadaic acid in An- oder Abwesenheit des Kinaseinhibitors K252a. Dargestellt sind die Daten als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=6$ nach 24 stündiger Inkubation in Ringerlösung (linke Säulen) oder Okadaic acid-haltiger Ringerlösung (rechte Säulen) jeweils in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von K252a. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Okadaic acid ($p \leq 0,05$ ANOVA).

3.5.3 Inkubation der Erythrozyten mit dem PKC- Inhibitor Staurosporin

Dieses Mal erfolgte eine 24 stündige Inkubation mit 3 μ M Phorbol ester in An- oder Abwesenheit von Staurosporin. Unter dem Einsatz dieses PKC Inhibitors ließ sich der oben unter Einsatz von K252a beschriebene Effekt sowohl auf die Anzahl von Annexin-positiven Zellen (Abb. 27), als auch auf das Zellvolumen (Abb. 28) wiederholen. Die Annexin-positiven Zellen konnten auf 4.72 ± 0.5 % reduziert und das Zellvolumen auf das Niveau der Kontrollzellen gesteigert werden.

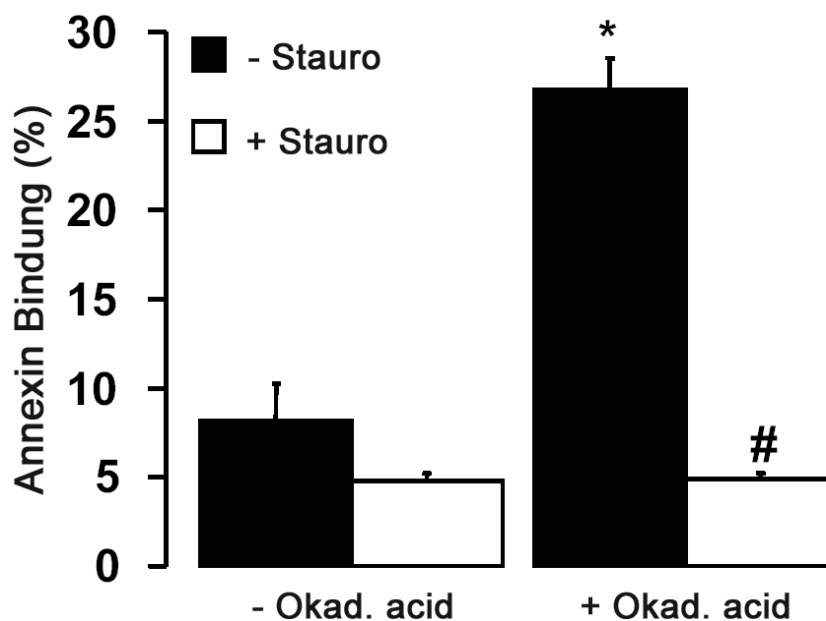


Abbildung 27: Stimulation der Phosphatidylserinexposition auf der Membranaußenseite von Erythrozyten durch Inkubation mit dem Phosphataseinhibitor Okadaic acid in An- und Abwesenheit des Kinaseinhibitors Staurosporin. Darstellung der Annexin- bindenden Zellen nach 48 stündiger Inkubation in Ringerlösung (linke Säulen) oder Okadaic acid- haltigen Ringer (rechte Säulen) jeweils in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von Staurosporin. Angegeben sind die Werte als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei jeweils $n = 6$. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Okadaic acid ($p \leq 0,05$ ANOVA).

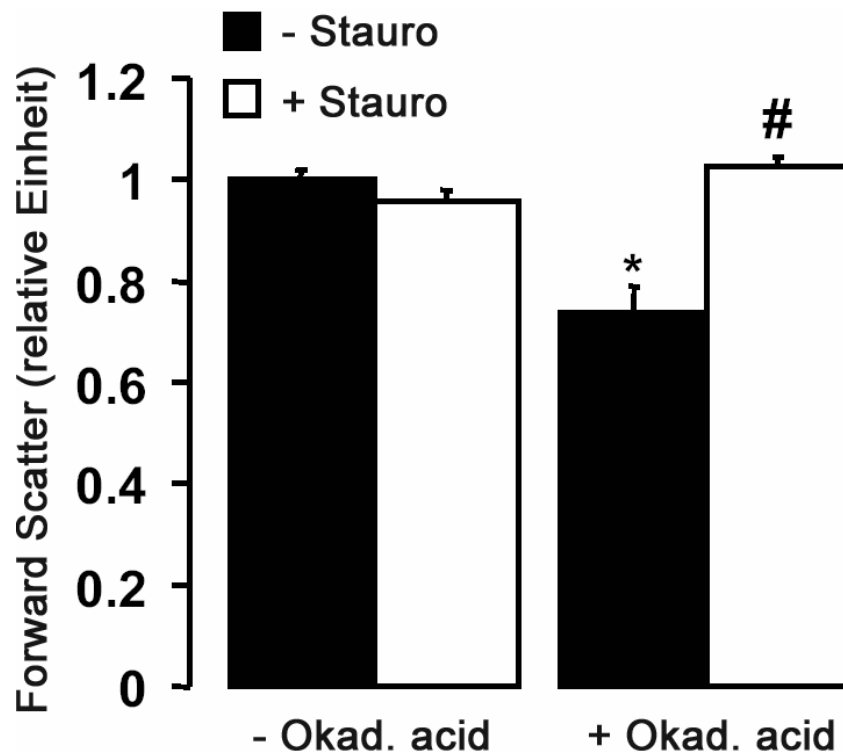


Abbildung 28: Forward Scatter der Erythrozyten nach Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Okadaic acid in An- oder Abwesenheit des Kinaseinhibitors Staurosporin. Dargestellt sind die Daten als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=6$ nach 48 stündiger Inkubation in Ringerlösung (linke Säulen) oder Okadaic acid- haltigen Ringer (rechte Säulen) jeweils in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von Staurosporin. * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von Okadaic acid ($p \leq 0,05$ ANOVA).

3.6 Wirkungsmechanismus von Okadaic acid

3.6.1 Bestimmung des Ca^{2+} -Einstroms- und Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den Mechanismus aufzuklären, über den Okadaic acid den Tod der Erythrozyten verursacht. Da bekannt ist, dass der programmierte Zelltod bei den Erythrozyten vor allem über Ca^{2+} -abhängige Mechanismen initiiert wird, sollte untersucht werden, ob die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der Erythrozyten nach Einwirkung von Okadaic acid ansteigt. Deshalb wurden Versuche mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo 3/AM durchgeführt. Dazu wurden Erythrozyten mit Fluo 3/AM beladen und die Fluoreszenz anhand der FACS-Analyse ermittelt. Nach Inkubation mit Okadaic acid ($0,3 \mu\text{M}$) zeigten die beladenen Zellen eine deutlich gesteigerte Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 29). Als Positivkontrolle wurde der Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin in der Konzentration von $1 \mu\text{M}$ verwendet.

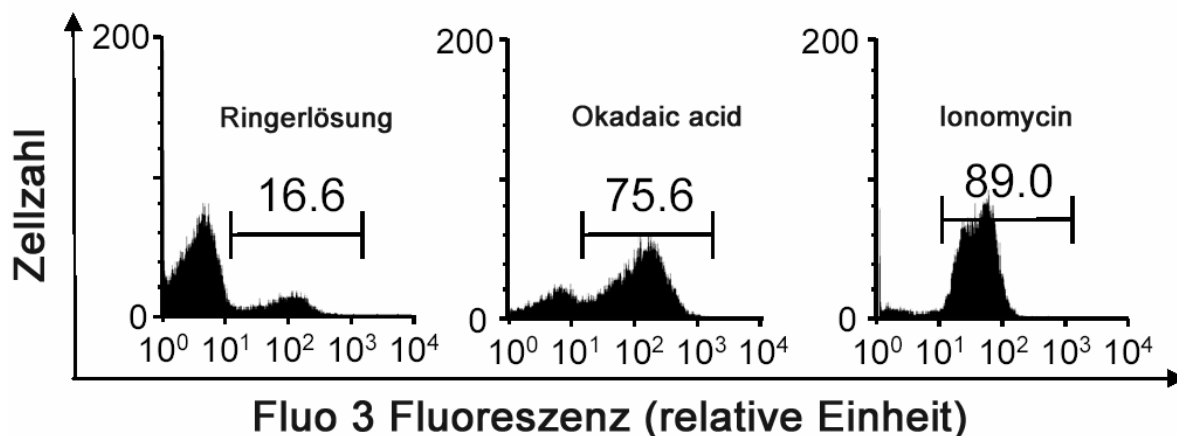


Abbildung 29: Okadaic acid-induzierter Anstieg der zytosolischen, freien Ca^{2+} -Konzentration. Repräsentative FACS Histogramme, die die Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenz Fluo 3/AM-beladener Erythrozyten zeigen. Die Zellen wurden entweder Ringerlösung (linkes Histogramm) oder in einer mit $10 \mu\text{M}$ Okadaic acid versetzten Ringerlösung (mittleres Histogramm) für 48 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle dienten 20 Minuten in $1 \mu\text{M}$ Ionomycin-enthaltender Ringerlösung inkubierte Erythrozyten (rechtes Histogramm).

Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzkanal FL-1 bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Um die Auswirkung von Okadaic acid auf die Fluo 3/AM Fluoreszenz besser erfassen zu können, zeigt Abbildung 30 den aus verschiedenen Versuchen ermittelten mittleren Anstieg der erythrozytären Fluoreszenz nach Einwirkung von Okadaic acid im Vergleich zur ermittelten Intensität nach Einsatz des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) und Inkubation in reiner Ringerlösung.

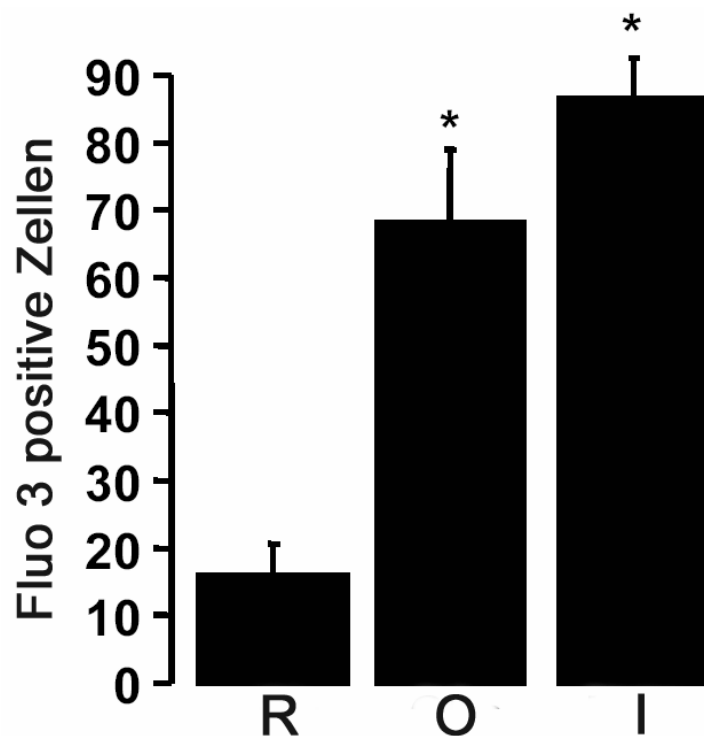


Abbildung 30: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz \pm Standardabweichung Fluo 3/AM beladener Erythrozyten. Die Zellen wurden in reiner Ringerlösung (R), sowie in einer $10 \mu\text{M}$ Okadaic acid-enthaltenen (O) oder $1 \mu\text{M}$ Ionomycin enthaltenden Ringerlösung (I) inkubiert. *kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$ ANOVA) im Vergleich zur Ringerlösung.

3.6.2 Vergleich der Phosphatidylserinexposition durch Okadaic acid jeweils in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}

Um die oben beschriebenen Daten zu überprüfen, wurden Erythrozyten in einer Ca^{2+} -freien Lösung für 48 Stunden in An- oder Abwesenheit von Okadaic acid inkubiert.

Dabei zeigte sich eine signifikante Abschwächung des durch Okadaic acid verursachten Effektes durch den Einsatz einer Ca^{2+} -freien Lösung (Abb. 31), was die Ergebnisse der Fluo 3/AM Messung untermauert.

Verglichen jedoch mit der reinen Ca^{2+} -freien Lösung steigerte Okadaic acid die Anzahl an Annexin-positiven Zellen. Somit scheint Okadaic acid neben der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der Scramblase noch über einen Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierungsweg den Tod der Erythrozyten zu bewirken.

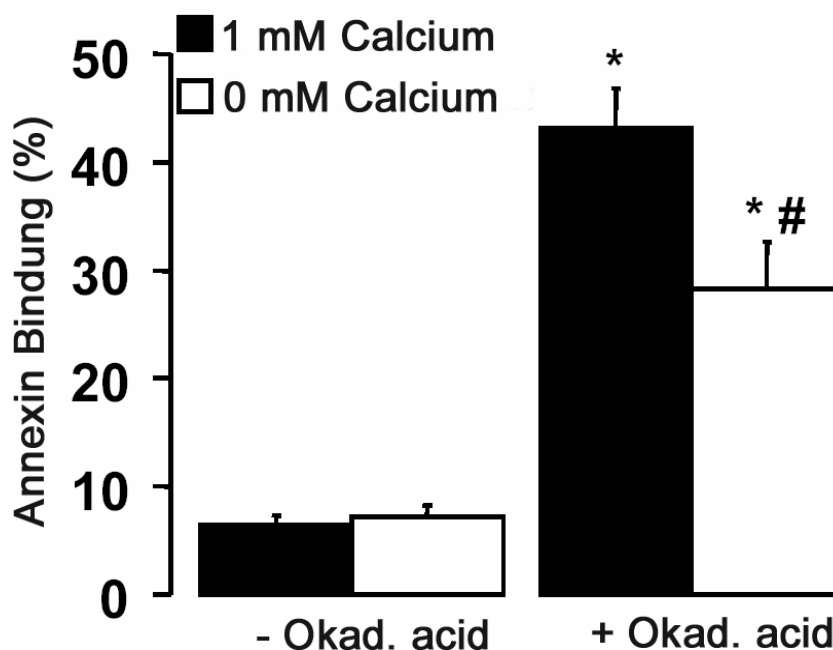


Abbildung 31: Stimulation der Phosphatidylserinexposition auf der Außenseite der Erythrozytenmembran durch den Phosphataseinhibitor Okadaic acid in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} . Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei jeweils $n = 8$ nach einer 48 stündigen Inkubation ohne (linke Säulen) oder mit Okadaic acid (rechte Säulen) jeweils in Anwesenheit (weiße Säulen) oder Abwesenheit (schwarze Säulen) von extrazellulärem Ca^{2+} . * beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringerlösung, # beschreibt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Anwesenheit von Okadaic acid und extrazellulärem Ca^{2+} ($p \leq 0,05$ ANOVA).

4. Diskussion

4.1 Rolle der Proteinkinase C im Apoptoseprogramm von Erythrozyten

Obgleich reife Erythrozyten weder Zellkerne noch Mitochondrien besitzen, sind diese Zellen doch in der Lage, bestimmte morphologische und biochemische Veränderungen zu durchlaufen, wie sie für das apoptotische Programm kernhaltiger Zellen typisch sind. So zeigen sie die Umlagerung und externe Präsentation von Phosphatidylserin, Membranausbuchtungen und Zellschrumpfung (*Daugas et al., 2001*). All diese Ereignisse können durch Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst werden (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001a*). Erythrozyten sind andererseits resistent gegenüber Serumdeprivation und die pro-apoptotische Wirkung von Staurosporin, die als effektive Stimulatoren der Apoptose in kernhaltigen Zellen gelten (*Daugas et al., 2001*).

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde und bereits aus anderen Arbeiten bekannt ist, bewirkt der Einsatz von Phorbol ester einen Ca^{2+} -Einstrom (*Andrews et al., 2002*) in die Zellen und daraufhin die Exposition von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite der Erythrozyten (*de Jong et al., 2002*). Beide Vorgänge, Ca^{2+} -Einstrom und Phosphatidylserinexposition, werden durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung reguliert.

Eine große Rolle dabei scheint die Aktivierung der Proteinkinase C zu spielen. So zeigten die Erythrozyten nach Gabe von 3 μM Phorbol ester (PMA) einen signifikanten Anstieg an Annexin-positiven Zellen. PMA, welches zur Gruppe der Proteinkinase C Aktivatoren gehört, ließ den Anteil an geschädigten Erythrozyten auf $500 \pm 12\%$ steigen. Den gleichen Effekt erzielten wir unter Einsatz von 1 μM Okadaic acid. Dieses von Marine algae produzierte Gift ist ein sehr lipophiler Polyether und hemmt zelluläre Phosphatasen, was zu einer verminderten Dephosphorylierung führt und somit zu einer Erhöhung des Anteils phosphorylierter Proteine. Weiterhin kam es nach Okadaic acid-Gabe

ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg an geschädigten Erythrozyten. Unterbunden werden konnten die unter Okadaic acid-Behandlung auftretenden Effekte durch den Einsatz der Kinase-Inhibitoren Staurosporin und K252a. Beide Stoffe stellen „Breitbandinhibitoren“ mit einem relativ breiten Wirkungsspektrum dar und führen zu einer verminderten Proteinphosphorylierung.

Aus den oben beschriebenen Befunden wird klar ersichtlich, dass der jeweilige Phosphorylierungszustand einzelner Proteine über Leben und Tod der Erythrozyten entscheidet, und dass die Proteinkinase C (PKC) dabei eine Schlüsselfunktion spielt.

Noch interessanter war die Entdeckung, dass die Energiedepletion in Erythrozyten zu einer Staurosporin-sensitiven Aktivierung der Proteinkinase C führt.

Wie aber kann man erklären, dass es unter Energiedepletion, das heißt, trotz einer signifikanten Erniedrigung der ATP Menge in den Erythrozyten, zu einer Aktivierung der ATP-verbrauchenden Proteinkinase C kommt? Um dies besser einschätzen zu können, wurde zunächst die ATP Konzentration nach Wegnahme der Glukose aus dem Medium gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass nach 24 Stunden immer noch ca. 200 μM ATP vorhanden sind. Diese Menge an ATP ist für die Aktivität der PKC ausreichend, da nach 20 Stunden in Anwesenheit von PMA immer noch eine Erhöhung der Serin-phosphorylierten Proteine (im Vergleich mit entsprechend behandelten Kontrollzellen) im Western Blot nachzuweisen war (Daten sind nicht gezeigt).

Unter Einsatz einer Glukose-freien Lösung konnte mittels eines ELISA-basierten Verfahrens ein signifikanter Anstieg der PKC- Aktivität im Vergleich zur reinen Ringerlösung gemessen werden, was die Aktivierung der PKC nach Glukosedepletion bestätigte.

Ein ähnlicher Effekt wurde bereits in endothelialen Schichten der Koronargefäße nachgewiesen. Dabei führte ein durch Energiedepletion hervorgerufener Ca^{2+} -Einstrom zu einer Aktivierung der Proteinkinase C,

welche dann einen frühzeitigen Verlust der endothelialen Barrierefunktion hervorrief (*Muhs et al., 1997*).

Die durch Energiedepletion hervorgerufene Aktivierung der PKC, konnte in vitro durch Zugabe von Staurosporin Konzentrations-abhängig (0.25-3 μM) nahezu vollständig unterdrückt werden.

Neben dem hemmenden Effekt auf die Aktivierung der PKC, verringerte Staurosporin sowohl die Anzahl an Phosphatidylserin-exponierenden Zellen als auch die Zellschrumpfung, welche nach Energiedepletion der Erythrozyten auftrat.

Beide Effekte sind sichere Zeichen der erythrozytären Apoptose und lassen somit auf eine Beteiligung der PKC im erythrozytären Apoptosesignalweg nach Energiedepletion schließen.

Zustande kommt die massive erythrozytäre Schrumpfung wahrscheinlich als Folge einer Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver K^+ -Kanäle, welche sich in der erythrozytären Zellmembran befinden.

Die Aktivierung dieser Kanäle hyperpolarisiert die Zellmembran und führt so zu einem Verlust von KCl und zur Abnahme der zellulären Osmolarität und damit zur Zellschrumpfung (*Bookchin et al., 1987; Brugnara et al., 1993b; Franco et al., 1996*).

Die Beobachtung jedoch, dass Staurosporin den stimulierenden Effekt der Glukosedepriuation auf die Erythrozytenapoptose nur teilweise hemmen und im Kontrast dazu den Anteil an Annexin-positiven Zellen nach Behandlung mit Okadaic acid nahezu vollständig unterbinden konnte, führte uns zu dem Schluss, dass eine durch Energiedepletion hervorgerufene Annexin-Bindung nicht ausschließlich durch die Aktivierung der PKC hervorgerufen wird, sondern dass noch ein zweiter, davon unabhängiger Mechanismus existieren muss.

Unterstützt wird diese Vermutung durch unsere Experimente mit Okadaic acid in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} .

Dabei zeigte sich, dass der Effekt von Okadaic acid auf die Annexin-Bindung nicht gänzlich durch das Fehlen von extrazellulärem Ca^{2+} aufgehoben werden konnte.

So kam es zwar zu einer sichtbaren Abschwächung des durch Okadaic acid verursachten Effekts unter dem Einsatz einer Ca^{2+} -freien Lösung, verglichen jedoch mit der reinen Ca^{2+} -freien Lösung war die Anzahl an Annexin-positiven Zellen bei der Inkubation mit Okadaic acid immer noch erhöht.

Diese Beobachtung führte uns zu der Annahme, dass neben dem Ca^{2+} -abhängigen Apoptoseweg noch ein Ca^{2+} -unabhängiger Mechanismus durch Okadaic acid ausgelöst wird, ähnlich wie es schon beim hyperosmotischen Schock beobachtet werden konnte (Lang et al., 2003a).

Vorangehende Studien haben weiterhin gezeigt, dass die erythrozytäre Scramblase durch zwei unterschiedliche zelluläre Mechanismen aktiviert werden kann.

Der erste Aktivierungsweg ist Ca^{2+} -abhängig und führt durch den Ca^{2+} -Einstrom über permeable Kationenkanäle zu einer Scramblaseaktivierung (Duranton et al., 2002; Huber et al., 2001). Die Aktivierung dieser Kanäle kann durch die Entfernung von Cl^- , durch hyperosmotischen Schock (Zunahme der extrazellulären Osmolarität), oxidativen Stress (Applikation von *t*-Butylhydroperoxid (*t*-BHP)) und durch Energiemangel (Entfernung von extrazellulärer Glukose) hervorgerufen werden (Lang et al., 2003a; Lang et al., 2003b). Analog dazu weisen gealterte Erythrozyten eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und damit ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Scramblase auf (Kiefer und Snyder, 2000; Romero und Romero, 1999).

Der zweite Aktivierungsweg ist Ca^{2+} -unabhängig und führt über die Aktivierung einer Schrumpfungs-abhängigen Sphingomyelinase zur Bildung von Ceramid, woraus wiederum eine Sensibilisierung der erythrozytären Scramblase resultiert (Lang et al., 2004a; Lang et al., 2003a; Lang et al., 2004b; Duranton et al., 2003).

Beide Wege jedoch kulminieren in der Phosphatidylserin-Umlagerung auf die Membranaußenseite.

Diese Exposition von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite der Zellmembran hat verschiedene Reaktionen zu Folge.

So wird durch den Zusammenbruch der Membranasymmetrie die Bindung an Makrophagen, welche mit einem entsprechenden Phosphatidylserin-Rezeptor ausgestattet sind, begünstigt (*Fadok et al., 2000; Henson et al., 2001; Messmer und Pfeilschifter, 2000*).

Durch diese Rezeptorbindung wird letztendlich gewährleistet, dass beschädigte Erythrozyten rasch erkannt, phagozytiert und abgebaut werden und die Beseitigung der betroffenen Erythrozyten aus dem Blut und letztendlich aus dem Organismus beschleunigt wird (*Boas et al., 1998; Eda und Sherman, 2002; Romero und Romero, 1999*).

Außerdem ermöglicht die Präsentation von Phosphatidylserin Interaktionen zwischen Zellen und die Bildung von Zellaggregaten (*Eda und Sherman, 2002*).

So wird auch die Adhärenz der Erythrozyten an Endothelzellen gefördert, wodurch die Entfernung geschädigter Zellen aus dem Blutkreislauf ebenfalls beschleunigt wird.

Darüber hinaus können diese Erythrozyten an Rezeptoren in den Gefäßwänden binden und dort zu einer Behinderung der Mikrozirkulation führen (*Andrews und Low, 1999; Andrews et al., 2002; Ellsworth et al., 1995; Romero und Romero, 1999; Sprague et al., 1996; Sprague et al., 1995*).

Aufgrund dieser Tatsachen beobachteten wir das vermehrte Abfangen von Erythrozyten im Nierenmark, welches sich nach einer Ischämie in den Nieren von Mäusen zeigte (*Lang et al., 2004b*).

Phosphatidylserin-exprimierende Zellen dürften ferner an der Hämostase beteiligt sein (*Andrews und Low, 1999; Bergfeld und Forrester, 1992; Luthje et al., 1988; Pawloski et al., 1998; Valles et al., 1998*).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Proteinkinase C im Apoptoseprogramm der Erythrozyten eine Schlüsselrolle zukommt.

Durch Stressoren, wie zum Beispiel Energiedepletion oder Phorbol ester, aktiviert bewirkt sie über eine direkte Kanalphosphorylierung einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, der über die Scramblasenaktivierung zu einer Exposition von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite führt.

Weiterhin aktiviert Ca^{2+} den Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal, wodurch es zum K^+ -Ausstrom und zur Schrumpfung der Zellen kommt.

Beide Ereignisse, Zellschrumpfung und die oben genannte Phosphatidylserinexposition, werden als Signale erkannt und führen zum Aussortieren der geschädigten Erythrozyten.

Jedoch scheint die durch Energiedepletion hervorgerufene Annexinbindung nicht ausschließlich durch eine Aktivierung der PKC zustande zu kommen, sondern es muss noch ein zweiter, davon unabhängiger Mechanismus existieren, wie in unseren Experimenten mit Staurosporin und Ocadaic acid zu sehen ist.

4.2 Fehlerdiskussion

4.2.1. Detektion der Apoptose durch Annexin-Bindung

Üblicherweise wird bei der Verwendung von FITC-Annexin-V zur Erfassung der Apoptoserate auch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt.

Propidiumiodid ist ein fluoreszierendes Molekül und ein hochspezifischer Farbstoff für DNA. Es interkaliert in doppelsträngige DNA und verändert anschließend sowohl die Anregungs-, als auch die Emissionswellenlänge. Da Propidiumiodid die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann, dient es zur Erfassung von totem Zellmaterial. Dadurch soll die fälschliche Detektion von nekrotischen Zellen im Rahmen der Apoptoseerfassung vermieden werden.

Da die Erythrozyten jedoch keine DNA enthalten, kann die Färbemethode in diesem Fall nicht angewandt werden. Um eine fälschlicherweise zu hohe Anzahl apoptotischer Zellen zu vermeiden, wurden deshalb zusätzlich die Zellzahl und die Hämoglobinkonzentration im Überstand bestimmt.

Dadurch konnte eine die Ergebnisse beeinflussende Hämolyserate der Erythrozyten ausgeschlossen werden.

Des Weiteren scheint Annexin-V-Fluos auch nicht an Zelltrümmer zu binden, da in Versuchsansätzen mit überwiegend nekrotischem Zellmaterial unter Anwendung der Durchflusszytometrie die erfasste Zellzahl gegen Null geht. Grund dafür ist die Zellgröße. Die Zelltrümmer sind zu klein und werden nicht erfasst.

4.2.2 Begriffsdefinition: Apoptose

Inzwischen ist bekannt, dass Erythrozyten im Gegensatz zur früheren Lehrmeinung durchaus in der Lage sind, eine Form des programmierten Zelltods zu durchlaufen. Aufgrund ihres morphologischen Aufbaus können sie jedoch bestimmte Kriterien der Apoptose, wie sie in kernhaltigen Zellen auftauchen, nicht erfüllen. Dazu gehören unter anderem die Kondensation und anschließende Fragmentierung der DNA des Zellkerns und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials. Deshalb ist gegenwärtig die Diskussion um eine passende Begriffsfindung im Gange. Im Raum steht derzeit die Bezeichnung „Eryptose“, welche die durchaus vorhandenen Ähnlichkeiten des in Erythrozyten ablaufenden programmierten Zelltods zur Apoptose verdeutlichen soll.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit liefert den Beweis dafür, dass von einer Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der erythrozytären Apoptose ausgegangen werden muss (Abb. 32).

Stressoren, wie die Energiedepletion oder die Behandlung mit Phorbolestern, führen zu einer Aktivierung dieser Proteinkinase, welche dann in ihrem aktivierten Zustand den Kationenkanal auf direktem Weg phosphoryliert. Der durch die Phosphorylierung aktivierte Kanal öffnet sich und bedingt dadurch einen massiven Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, was daraufhin in der Aktivierung der Ca^{2+} -sensitiven Scramblase mündet. Diese wiederum bewirkt die Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite.

Weiterhin aktiviert Ca^{2+} den Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal, was zum K^+ -Ausstrom und zur Schrumpfung der Zellen führt.

Schrumpfung und Phosphatidylserinexposition werden dann als Signale erkannt, um die geschädigten Erythrozyten auszusortieren.

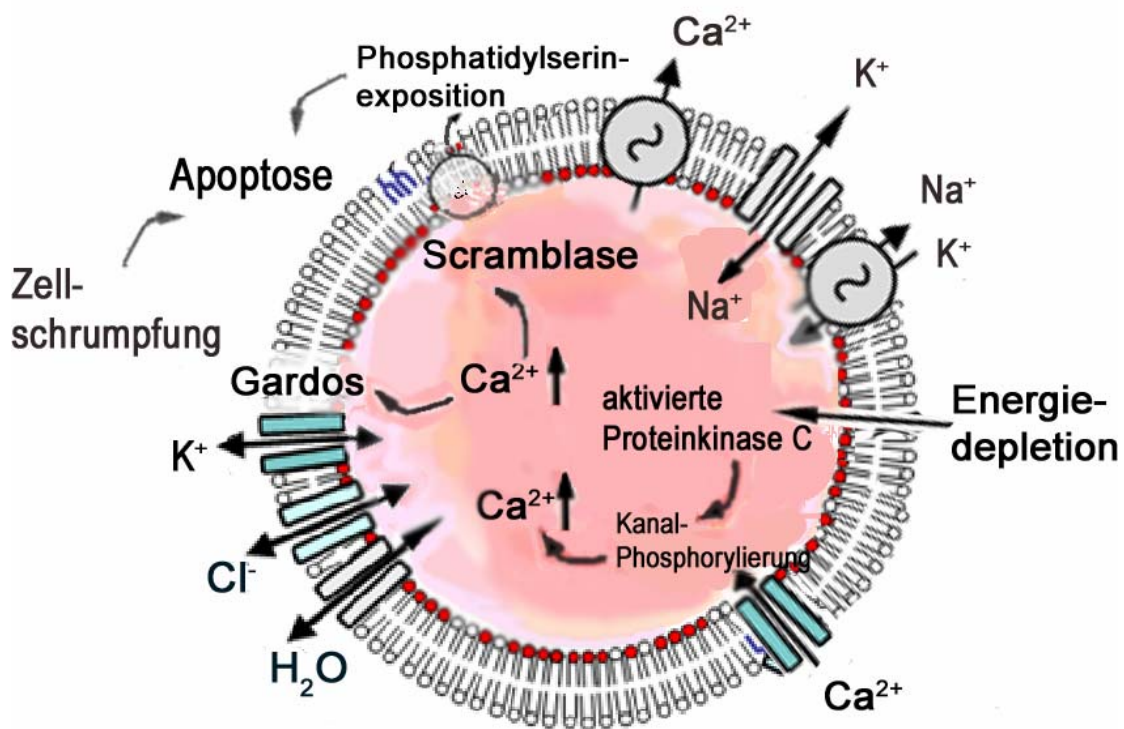


Abbildung 32: Verdeutlichung des durch Energiedepletion hervorgerufenen Signalwegs der Eryptose.

Die Beobachtungen jedoch, dass Staurosporin den stimulierenden Effekt der Glukosedepletion auf die Erythrozytenapoptose nur teilweise hemmt und in Kontrast dazu den Anteil an Annexin-positiven Zellen nach Behandlung mit Okadaic acid vollständig unterbindet, wie auch die Versuche mit Okadaic acid unter Wegnahme von extrazellulärem Ca^{2+} , führten uns zu dem Schluss, dass eine durch Energiedepletion hervorgerufene Annexin-Bindung nicht ausschließlich durch die Aktivierung der PKC hervorgerufen wird, sondern dass noch ein zweiter, davon unabhängiger Mechanismus existieren muss.

6. Literatur

6.1 Publikationsverzeichnis

- Klarl B.A.**, Lang P.A., Kempe D.S., Niemöller O., 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.
- Eisele K., Lang P.A., Kempe D.S., **Klarl B.A.**, Niemöller O., Wieder T., Huber S.M., Duranton C., Lang F. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol*; **210**:116-22.
- Kempe D.S., Lang P.A., Eisele K., **Klarl B.A.**, Wieder T., Huber S.M., Duranton C., Lang F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol*; **288**:C396-402.
- 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 Science*; **118**(Pt 6):1233-43
- Lang P.A., Kempe D.S., Akel A., **Klarl B.A.**, Eisele K., Podolski M., Hermle T., Niemöller O., 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.
- Lang P.A., Huober J., Bachmann C., Kempe D.S., Sobiesiak M., Akel A., Niemoeller O.M., Dreischer P., Eisele K., **Klarl B.A.**, Gulbins E., Lang F., Wieder T. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem*; **18**:151-64.

6.2 Literaturverzeichnis

- Afford S., Randhawa S. (2000). Apoptosis. *Mol Pathol*; **53**: 55-63.
- Aggarwal B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*; **3**:745-56.
- Allan D., Billah M.M., Finean J.B., Mitchell R.H. (1976a). Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular (Ca²⁺). *Nature*; **261**: 58-60.

- Allan D., Watts R., Michell R.H. (1976b). Production of 1,2-diacylglycerol and phosphatidate in human erythrocytes treated with calcium ions and ionophore A23187. *Biochem J*; **156**: 225-232.
- Alnemri E. S. (1999). Hidden powers of the mitochondria. *Nature Cell Biol*; **1**:E40- E42.
- 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**:6617-23.
- 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.
- 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.
- Andrews D.A., Low P.S. (1999). Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol*; **6**:76-82.
- Ashkenazi A., Dixit V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*; **281**:1305-8.
- 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.
- Barrett M.J., Goll DE., Thompson V.F. (1991). Effect of substrate on Ca²⁺(+)-concentration required for activity of the Ca²⁺(+)-dependent proteinases, mu- and m-calpain. *Life Sci*; **48**:1659-1669.
- Baud V., Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*; **11**:372-7.
- Beere H. M., Wolf B. B., Cain K., Mosser D. D., Mahboubi A., Kuwana T., Tailor P., Morimoto R. I., Cohen G. M., Green D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*; **2**:469-75.
- Bennekou P. (1993) The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochim Biophys Acta*; **1147**:165-7.

- 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**:1197-206.
- Bergfeld G.R., Forrester T. (1992). Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res*; **26**: 40-47.
- Beutler B., van Huffel C. (1994). Unraveling function in the TNF ligand and receptor Families. *Science*; **264**:667-8.
- Bevers E., Comfurius P., Dekkers D., Zwaal R. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*; **1439**: 317-30.
- 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**:83-6.
- 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**:1125-33.
- Blobe G.C., Stribling D.S., Fabbro D., Stabel S., Hannun Y.A., (1996). "Protein kinase C β II specifically binds to and is activated by F-actin." *J Biol Chem*; **271**:15823-15830.
- 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 U S A*; **95**:3077-3081.
- Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G., Thompson C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*; **74**:597-608.
- 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.
- Bortner C.D., Hughes F.M. Jr., Cidlowski J.A. (1997). A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*; **272**:32436-42.
- Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1998). A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol*; **56**:1549-59.

- Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K^{+} , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem*; **274**:21953-62.
- Bourikas D., Kaloyianni M., Bougoulia M., Zolota Z., Koliakos G. (2003). Modulation of the Na^{+} - H^{+} antiport activity by adrenaline on erythrocytes from normal and obese individuals. *Mol Cell Endocrinol*; **205**:141-150.
- Boyd J.M., Gallo G.J., Elangovan B., Houghton A.B., Malstrom S., Avery B.J., Ebb R.G., Subramanian T., Chittenden T., Lutz R.J., et al. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*; **11**:1921-8.
- 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 JC. (2001a). 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.
- Bredesen D.E. (2000). Apoptosis: overview and signal transduction in pathways. *J Neurotrauma*; **17**(10):801-10.
- Bruey J. M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S. A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A. P., Kroemer G., Solary E. et al. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*; **2**:645-52.
- Brugnara C., de Franceschi L., Alper S.L. (1993b). Inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*; **92**:520-26.
- Brunsting A., Mullaney P.F. (1974). Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J*; **14**:439-53.
- Cai J., Jones D.P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*; **273**:11401-4.
- 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**:179-86.
- 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**:3666-70.

- 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.
- 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**:855-62.
- Chai J., Wu Q., Shiozaki E., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Shi Y. (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*; **107**:399-407.
- Chan S.L., Mattson M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*; **58**:167-90.
- 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**:505-12.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan B., Chinnadurai G., Lutz R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*; **14**:5589-96.
- Christophersen P., Bennekou P. (1991). Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta*; **1065**:103-6.
- Cohen C.M., Gascard P. (1992). Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol*; **29**: 244-292.
- Cotman C.W., Anderson A.J. (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*; **10**:19-45.
- Coultas L., Pellegrini M., Visvader J.E., Lindeman G.J., Chen L., Adams J.M., Huang D.C., Strasser A. (2003). Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ*; **10**:185-92.
- Creutz C.E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science*; **258**:924-31.
- Crompton M., Virji S., Doyle V., Johnson N., Ward J.M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp*; **66**:167-79.

- Daniel N.N., Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*; **116**:205-219.
- 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**(7):1022-32. Review.
- Danilov Y.N., Cohen C.M. (1989). Wheat germ agglutinin but not concanavalin A modulates protein kinase C-mediated phosphorylation of red cell skeletal proteins. *FEBS Lett*; **257**: 431-434
- Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A. **Flow Cytometry**. 2nd Edition. 1994. Academic Press: San Diego
- Daugas E., Cande C., Kroemer G. (2001). Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*; **8**:1131-3.
- de Jong K., Rettig M.P., Low P.S., Kuypers F.A. (2002). Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry*; **41**:12562-12567.
- Dekker L.V., Parker P.J. (1994). Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci*; **19**(2):73-7. Review.
- Del Bino G., Skierski J.S., Darzynkiewicz Z. (1990). Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-4) and myelogenous (HL-60, KG1) leukemic cells. *Cancer Research*; **50**: 5746-5750.
- Del Carlo B., Pellegrini M., Pellegrino M. (2002). Calmodulin antagonists do not inhibit IK(Ca) channels of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; **1558**:133-41.
- Deveraux Q.L., Reed J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*; **13**:239-52.
- Dive C., Gregory C.D., Phipps D.J., Evans D.L., Milner A.E., Wyllie A.H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*; **1133**:275-85.
- 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.
- Dunn P.M. (1998). The action of blocking agents applied to the inner face of Ca(2+)-activated K⁺ channels from human erythrocytes. *J Membr Biol*; **165**:133-43.

- Duranton C., Huber S.M., Lang F. (2002). Oxidation induces a Cl⁻-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*; **539**:847-855.
- Duranton C., Huber S., Tanneur V., Lang K., Brand V., Sandu C., Lang F. (2003): Electrophysiological properties of the Plasmodium Falciparum-induced cation conductance of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*; **13**:189-198.
- Eck M.J., Ultsch M., Rinderknecht E., de Vos A.M., Sprang S.R.(1992). The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem*; **267**:2119-22.
- Eda S., Sherman I.W. (2002). Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem*; **12**:373-84.
- Eldadah B.A., Faden A.L.(2000). Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury. *J Neurotrauma*; **17**:811-829
- Ellsworth M.L., Forrester T., Ellis C.G. and Dietrich H.H. (1995). The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol*; **269**:H2155-H2161.
- Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A., Henson P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*; **405**:85-90.
- 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.
- 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.
- 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.
- Floros K.V., Thomadaki H., Lallas G., Katsaros N., Talieri M., Scorilas A. (2003). Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Ann N Y Acad Sci*; **1010**:153-8.
- 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**(Pt 5):549-556.

- Franco R.S., Palascak M., Thompson H., Rucknagel D.L., Joiner C.H. (1996). Dehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium. *Blood*; **88**:4359-4365.
- Gao G., Dou Q.P. (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18 kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem*; **80**:53-72.
- Gardos G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; **30**:653.
- 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**:671-81.
- Ghribi O., Herman M.M., De Witt D.A., Forbes M.S., Savory J. (2001). Abeta(1-42) and aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of gadd 153 and NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res*; **96**:30-8.
- Gibson L., Holmgren S.P., Huang D.C., Bernard O., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sutherland G.R., Baker E., Adams J.M., Cory S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*; **13**:665-75.
- Goldkorn T., Balaban N., Shannon M., Chea V., Matsukuma K., Gilchrist D., Wang H., Chan C. (1998). H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci*; **111**(Pt 21):3209-3220.
- 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**:156-62.
- Golstein P., Ojcius D.M., Young J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*; **121**:29-65.
- Goping I. S., Gross A., Lavoie J. N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S. J., Shore G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*; **143**:207-15.
- Govekar R.B., Zingde S.M. (2001). Protein kinase C isoforms in human erythrocytes. *Ann Hematol*; **80**: 531-534.
- Green D.R. (1998 b). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*; **94**:695-8.

- Green D.R., Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*; **305**:626-9.
- Green D.R., Reed J.C. (1998 a). Mitochondria and apoptosis. *Science*; **281**:1309-12.
- Gross A., Jockel J., Wei M. C., Korsmeyer S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J*; **17**:3878-85.
- Gruss H.J., Dower S.K.(1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*; **85**:3378-404.
- Grygorczyk R. ,Schwarz W. (1983). Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium*; **4**:499-510
- Guo B., Godzik A., Reed J.C. (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*; **276**:2780-2785.
- Han J., Sabbatini P., White E. (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol*; **16**:5857-64.
- Haworth R. A., Hunter D. R. (1980). Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J Membr Biol*; **54**:231-6.
- Henson P.M., Bratton D.L., Fadok V.A. (2001): The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*; **2**:627-633.
- Hoffman J.F., Joiner W., Nehrke K., Potapova O., Foye K. ,Wickrema A.(2003). The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100**:7366-71.
- 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**:532-40.
- Hsu S.Y., Kaipia A., McGee E., Lomeli M., Hsueh A.J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:12401-6.

- 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.
- 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**:551-8.
- Inohara N., Ding L., Chen S., Nunez G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J*; **16**:1686-94.
- Itoh N., Nagata S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*; **268**:10932-7.
- Johnson P. (1990). Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. *Int J Biochem*; **22**:811-22.
- 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**:C734-44.
- Jolobe O.M. (2000). Prevalence of hypochromia (without microcytosis) vs microcytosis (without hypochromia) in iron deficiency. *Clin Lab Haematol*; **22**:79-80.
- 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**:549-54.
- Kataoka T., Holler N., Micheau O., Martinon F., Tinel A., Hofmann K., Tschopp J. (2001). Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *J Biol Chem*; **276**:19548-54.
- Ke N., Godzik A., Reed J.C. (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem*; **276**:12481-4.
- Kelekar A., Thompson C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*; **8**:324-30.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; **26**:239-57.

- Kiefer C.R., Snyder L.M. (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol*; **7**:113-6.
- Kiefer M.C., Brauer M.J., Powers V.C., Wu J.J., Umansky S.R., Tomei L.D., Barr P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*; **374**:736-9.
- Kim J.K., Kim K.S., Ahn J.Y., Kim N.K., Chung H.M., Yun H.J., Cha K.Y. (2004). Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain. *Biochem Biophys Res Commun*; **316**:18-23.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*; **276**:46639-46.
- 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.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, 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**:1132-6.
- Kolesnick R., Fuks Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*; **22**:5897-5906.
- 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.
- Kozopas K.M., Yang T., Buchan H.L., Zhou P., Craig R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90**:3516-20.
- Krammer P.H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*; **71**:163-210.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q. L., Salvesen, G. S., Bredesen, D. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G. et al. (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**:5752-7.
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*; **60**:619-42.

- Kroemer, G., Reed J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*; **6**:513-9.
- Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*; **18**:44-51.
- Lang F., Lang P.A., Lang K.S., Brand V., Tanneur V., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. (2004). Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria. *Pflugers Arch*; **448**: 319-324.
- Lang F., Lepple-Wienhues A., Paulmichl M., Szabo I., Siemen D., Gulbins E. (1998 a). Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*; **8**:285-92.
- 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**:417-28.
- Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M. (2003a) Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*; **10**:249-256.
- Lang K.S., Fillon S., Schneider D., Rammensee H.G., Lang F. (2002a). Stimulation of TNF alpha expression by hyperosmotic stress. *Pflugers Arch*; **443**:798-803.
- Lang K.S., Myssina S., Brand V., Sandu C., Lang P.A., Berchtold S., Huber S.M., Lang F., Wieder T. (2004a). Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*; **11**:231-243.
- Lang K.S., Myssina S., Lang P.A., Tanneur V., Kempe D.S., Mack A.F., Huber S.M., Wieder T., Lang F. and Duranton C. (2004b). Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻. *Am J Physiol Renal Physiol*; **286**: F1046-F1053.
- Lang K.S., Myssina S., Tanneur V., Wieder T., Huber S.M., Lang F., Duranton C. (2003b): Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; **367**:391-396.
- Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H.G., Kanz L., Fritz J., Lang F., Huber S.M., Wieder T. (2002b). Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem*; **12**:365-372.
- Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. (2003). Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*; **285**:C1553-60.

- Leinders T., van Kleef R.G., Vijverberg H.P. (1992). Single Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocytes: Ca²⁺ dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim Biophys Acta*; **1112**:67-74.
- Li C. Y., Lee J. S., Ko Y. G., Kim J. I., Seo J. S. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*; **275**:25665-71.
- Li L.Y., Luo X., Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; **412**:95-9.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*; **91**:479-89.
- Lin E.Y., Orlofsky A., Wang H.G., Reed J.C., Prystowsky M.B. (1996). A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*; **87**:983-92.
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; **104**:487-501.
- Loeffler M., Kroemer G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*; **256**:19-26.
- Lopez-Lluch G., Bird M. M., Canas B., Godovac-Zimmerman J., Ridley A., Segal A. W., Dekker L. V. (2001). Protein kinase C-delta C2-like domain is a binding site for actin and enables actin redistribution in neutrophils. *Biochem J*; **357**:39-47.
- Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*; **10**: 629-39.
- 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**:481-90.
- Luthje J., Schomburg A., Ogilvie A. (1988). Demonstration of a novel ecto-enzyme on human erythrocytes, capable of degrading ADP and of inhibiting ADP-induced platelet aggregation. *Eur J Biochem*; **175**: 285-289.
- Mach-Pascual S., Darbellay R., Pilotto P.A., Beris P. (1996) Investigation of microcytosis: a comprehensive approach. *Eur J Haematol*; **57**:54-61.

- 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**:9487-92.
- Mancini M., Nicholson D. W., Roy S., Thornberry N. A., Peterson E. P., Casciola-Rosen L. A., Rosen A. (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*; **140**: 1485-95.
- Mancini M., Machamer C. E., Roy S., Nicholson D. W., Thornberry N. A., Casciola-Rosen L. A., Rosen A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol*; **149**:603-12.
- Mandal D., Moitra P., Saha S., Basu J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett*; **513(2-3)**:184-8.
- Mandal D., Baudin-Creuzat V., Bhattacharyya A., Pathak S., Delaunay J., Kundu M., Basu J. (2003). Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem*; **278(52)**:52551-8.
- Martinou J.C., Green D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **2**:63-7.
- Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S. A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie Z. H., Reed J. C., Kroemer G. (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*; **187**:1261-71.
- Matsushima M., Fujiwara T., Takahashi E., Minaguchi T., Eguchi Y., Tsujimoto Y., Suzumori K., Nakamura Y. (1998). Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer*; **21**:230-5.
- McCarthy D.A., Macey M.G. (2001). Cytometric analysis of cell phenotype and function. *Cambridge University Press*.
- McDonnell T.J., Nunez G., Platt F.M., Hockenberry D., London L., McKearn J.P., Korsmeyer S.J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol*; **10**:1901-7.
- McGeehan G.M., Becherer J.D., Bast R.C. Jr., Boyer C.M., Champion B., Connolly K.M., Conway J.G., Furdon P., Karp S., Kidao S., et al (1994). Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*; **370**:558-61.

- Messmer U.K., Pfeilschifter J. (2000). New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays*; **22**:878-881.
- 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**:F209-18.
- Minetti G., Piccinini G., Balduini C., Seppi C. and Brovelli A. (1996). Tyrosine phosphorylation of band 3 protein in Ca²⁺/A23187-treated human erythrocytes. *Biochem J*; 320(Pt 2):**445**-450.
- Mohler K.M., Sleath P.R., Fitzner J.N., Cerretti D.P., Alderson M., Kerwar S.S., Torrance D.S., Otten-Evans C., Greenstreet T., Weerawarna K., et al. (1994). Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature*; **370**:218-20.
- Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*; **277**:34287-94.
- Mühlenbeck F., Haas E., Schwenzer R., Schubert G., Grell M., Smith C., Scheurich P., Wajant H. (1998). TRAIL/Apo2L Activates c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) via Caspase-dependent and Caspase-independent Pathways. *J Biol Chem*; **273**: 33091–33098. (Abbildung)
- Murchison D., Griffith W. H. (2000). Mitochondria buffer non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Res*; **854**:139-51.
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*; **85**:817-27.
- 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**:2750-7.
- Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*; **88**:355-65.
- Nakagawa T., Yuan J. (2000 b). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*; **150**:887-94.

- Nakagawa T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J. (2000a). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; **403**:98-103.
- Nakhost A., Forscher P., Sossin W. (1998). Binding of protein kinase C isoforms to actin in *Aplysia* *J Neurochem*; **71**: 1221-1231.
- Nguyen M., Millar D.G., Yong V.W., Korsmeyer S.J., Shore G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem*; **268**:25265-8.
- Nicholson D.W., Thornberry N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*; **22**:299-306.
- Nishizuka Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*; **233**:305-12. Review.
- Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*; **258**:607-14. Review
- Nishizuka Y. (2003). Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue. *J Biochem (Tokyo)*; **133**:155-158
- Nunomura W., Takakuwa Y., Tokimitsu R., Krauss S.W., Kawashima M. and Mohandas N. (1997). Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem*; **272**:30322-30328.
- O'Connor L., Strasser A., O'Reilly L.A., Hausmann G., Adams J.M., Cory S., Huang D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*; **17**:384-95.
- Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*; **288**:1053-8.
- Ogretmen B., Hannun Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*; **4**:604-616.
- Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*; **74**:609-19.
- 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**:2580-8.

- Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S. M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E. S., Kufe D. et al. (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J*; **19**:4310-22.
- Pastorino J. G., Chen S. T., Tafani M., Snyder J. W., Farber J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*; **273**: 7770-5.
- Pawloski J.R., Swaminathan R.V. and Stamler J.S. (1998). Cell-free and erythrocytic Snitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*; **97**: 263-267.
- Pellegrino M., Pellegrini M. (1998). Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch*; **436**:749-56.
- Petit P.X., Zamzami N., Vayssiere J.L., Mignotte B., Kroemer G., Castedo M. (1997). Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem*; **174**:185-8.
- 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.
- Puthalakath H., Strasser A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*; **9**:505-12.
- Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L.A., Beaumont J.G., Coultas L., Cheney R.E., Huang D.C., Strasser A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*; **293**:1829-32.
- 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.
- Rano T.A., Timkey T., Peterson E.P., Rotonda J., Nicholson D.W., Becker J.W., Chapman K.T., Thornberry N.A. (1997). A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol*; **4**:149-55.
- Reed J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*; **17**:3225-36.

- Rodriguez J., Lazebnik Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*; **13**:3179-84.
- Romero P.J., Romero E.A. (1999). Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells. *Cell Calcium*; **26**:131-137.
- Rosette C., Karin M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*; **274**:1194-7.
- 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**:191-7.
- Saleh A., Srinivasula S. M., Balkir L., Robbins P. D., Alnemri E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*; **2**:476-83.
- Salvesen G.S., Dixit V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**:10964-7.
- Salvesen G.S., Duckett C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **3**:401-10.
- Sarasin A., Stary A. (1997). Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev*; **21**:406-11.
- Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*; **343**:170-3.
- Sedlak T.W., Oltvai Z.N., Yang E., Wang K., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **92**:7834-8.
- Shapiro, Howard M. (2003). Practical Flow Cytometry, 4. Ausgabe, *Wiley-Liss, New York*.
- Shi Y. (2002 a). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*; **9**:459-70.
- Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Waguri S., Uchiyama Y., Matsuda H., Tsujimoto Y. (1996). Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene*; **13**:21-9.
- Shindo M., Imai Y., Sohma Y. (2000). A novel type of ATP block on a Ca²⁺-activated K⁺ channel from bullfrog erythrocytes. *Biophys J*; **79**:287-97

- Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsien R.Y., Lenardo M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*; **288**:2354-7.
- Slater S. J., Milano S. K., Stagliano B. A., Gergich K. J., Curry J. P., Taddeo F. J., Stubbs C. D. (2000). Interaction of protein kinase C with filamentous actin: Isozyme specificity resulting from divergent phorbol ester and calcium dependencies. *Biochemistry*; **39**:271-280.
- Slee E.A., Adrain C., Martin S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*; **276**:7320-6.
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R., Martin S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*; **144**:281-92.
- Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*; **76**:959-62.
- Song Q., Kuang Y., Dixit V.M., Vincenz C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J*; **18**:167-78.
- Sorimachi H., Kawabata Y. (2003). Calpain and pathology in view of structure-function relationships. *Folia Pharmacol Jpn*; **122**:21-29.
- Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H. and Lonigro A.J. (1996). ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol*; **271**:H2717-H2722.
- Sprague R.S., Stephenson A.H., Dimmitt R.A., Weintraub N.L., Branch C.A., Mc Murdo L., Lonigro A.J. and Weintraub N.A. (1995). Effect of L-NAME on pressure-flow relationships in isolated rabbit lungs: role of red blood cells. *Am J Physiol*; **269**:H1941-H1948.
- Srinivasula S.M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R.A., Robbins P.D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., Alnemri E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*; **410**:112-6.
- Sulston J.R., Horvitz H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*; **56**:110-56.

- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M. C., Alzari P. M., Kroemer G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*; **189**:381-94.
- 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. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; **397**:441-6.
- Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*; **1010**:186-94.
- Schmitt E., Paquet C., Beauchemin M., Bertrand R. (2004). Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation. *Oncogene*; **23**:3915-31
- 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**:821-2.
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*; **254**:439-59.
- Stennicke H.R., Deveraux Q.L., Humke E.W., Reed J.C., Dixit V.M., Salvesen G.S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*; **274**:8359-62.
- Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*; **69**:217-45.
- Tan X., Wang Y.J. (1998). *The caspase-Rb connection in cell death*. *Trends Cell Biol*; **8**:116-120.
- Tanaka T., Kadowaki K., Lazarides E., Sobue K. (1991). Ca²⁺-dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem*; **266**:1134-40.
- Tao M., Bihovsky R., Wells G.J., Mallamo J.P. (1998). Novel peptidyl phosphorus derivatives as inhibitors of human calpain I. *J Med Chem*; **41**:3912-3916.
- 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.

- Thompson C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; **267**:1456-62.
- Thornberry N. A., Bull H. G., Calaycay J. R., Chapman K. T., Howard A. D., Kostura M. J., Miller D. K., Molineaux S. M., Weidner J. R., Aunins J. et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*; **356**:768-74.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*; **228**:1440-3.
- Vander Heiden M. G., Chandel N. S., Williamson E. K., Schumacker P. T., Thompson C. B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*; **91**:627-37.
- Valles J., Santos M.T., Aznar J., Osa A., Lago A., Cosin J., Sanchez E., Broekman M.J., Marcus A.J. (1998). Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation*; **97**:350-355.
- Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; **335**:440-2.
- 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.
- 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.
- Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*; **182**:1597-601.
- Vogt C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*), Solothurn.
- Voll R.E., Herrmann M., Roth E.A., Stach C., Kalden J.R., Girkontaite I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*; **390**:350-1.
- Wang K., Yin X.M., Chao D.T., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*; **10**:2859-69.

- Wang X. Z. et al. (1998). Cloning of mammalian IRE I reveals diversity in de ER stress responses. *EMBO J*; **17**:5708- 5717.
- Watt W., Koeplinger K.A., Mildner A.M., Henrikson R.L., Tomasselli A.G., Watenpaugh K.D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*; **7**:1135-43.
- 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**:1735-42.
- Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A., et al (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*; **3**:673-82.
- Wolf B.B., Green D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases *J Biol Chem*; **274**:20049-20052.
- Wu S., Haynes J., Jr., Taylor J.T., Obiako B.O., Stubbs J.R., Li M., Stevens T. (2003). Cav3.1 (alpha1G) T-type Ca²⁺ channels mediate vaso-occlusion of sickled erythrocytes in lung microcirculation. *Circ Res*; **93**:346-353.
- Xiang J., Chao D. T., Korsmeyer S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93**:14559-63.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*; **80**:285-91.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P., Wang X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*; **275**:1129-1132.
- 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.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*; **75**:641-52.
- Zhang H., Holzgreve W., De Geyter C. (2001). Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet*; **10**:2329-39.

- Zhivotovsky B., Samali A., Gahm A., Orrenius S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ*; **6**:644-51.
- Zhou Q., Zhao J., Stout J.G., Luhm R.A., Wiedmer T. and 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. Anhang

7.1 Danksagung

Auf dem Weg zu einem erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt. Jeder einzelne von ihnen hat seinen Beitrag zum Erfolg geleistet. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Florian Lang danken, der immer Zeit und ein offenes Ohr für alle Fragen hatte und dessen uneingeschränkter Unterstützung ich immer sicher sein konnte. Durch die Überlassung dieses überaus interessanten Themas und durch seine berufliche Begeisterung hat er mein Interesse an der Forschung geweckt.

Ganz herzlichen Dank auch an meinen Betreuer und Laborleiter PD Dr. rer. nat. Thomas Wieder. Durch seine Geduld und sein Vertrauen, das er mir während meiner gesamten Zeit entgegengebracht hat und durch seine wertvollen Ratschläge und Freundlichkeit bei der Lösung jeglicher Probleme hat er diese Arbeit erst möglich gemacht.

Besonderer Dank gilt auch meinem Team des „Erythrozytenlabors“. Die Arbeit mit euch hat mir sehr viel Freude bereitet und den Forschungsalltag näher gebracht. Zu jeder Zeit konnte ich mich auf euch verlassen und auch die etwas schwierigeren Zeiten haben wir gemeinsam gemeistert. Danke!

Auch Frau Dr. Susanne Berchtold und Frau Christine Lang, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, mich unterstützten und mich in so manch schwierigen Situationen immer wieder aufgemuntert haben, möchte ich danken. Aus vielen Stunden gemeinsamen Schaffens, Diskutierens und Problemedurchstehens haben sich echte Freundschaften entwickelt.

Ebenfalls großer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. Horst Apfel, der mich mit seiner Tasse Kaffee, seinen Geschichten und seiner guten Laune immer wieder

unterstützt hat und auch Frau Tanja Loch und Frau Lejla Subasic, die mir immer und zu jeder Zeit in organisatorischen Angelegenheiten beigestanden haben.

Zu guter letzt ein herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde für deren Unterstützung und Motivation in dieser Zeit. Vielen Dank!

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Barbara Annette Klarl
Geburtsdatum: 12.09.1980
Geburtsort: Ehingen /Do
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familie: Vater: Dr. med. Anselm Maria Klarl
geb.: 08.09.1946
gestorben: 19.11.1999
Arzt für Allgemeinmedizin
Mutter: Hannelore Rose Klarl; geborene Weber
geb.: 11.02.1950
Grund- und Hauptschullehrerin

Schulbildung

1987 – 1991 Längenfeld-Grundschule, Ehingen
1991 – 2000 Gymnasium, Ehingen
Juni 2000 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0)
Fremdsprachen: Latein, Englisch, Griechisch, Spanisch

Hochschulausbildung

Oktober 2000 Studienbeginn im Fach Humanmedizin an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
12.09.2002 Ärztliche Vorprüfung (Note: 1,6)
28.08.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
2004 - 2005 Doktorarbeit am Physiologischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Professor Dr. med. Florian Lang

28.03.2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,33)
11.05.2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
(Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,83)