

**Auswärtstransport von Phosphatidylserin in der
Zellmembran humaner Erythrozyten: Einflussfaktoren und
Regulationsmechanismen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Lisa Wagner
Saarbrücken
2015

Tag des Kolloquiums:	11.05.2015
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. Ingolf Bernhardt
	Prof. Dr. Claus Michael Lehr
Vorsitz:	Prof. Dr. Claus Jacob
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Frank Hannemann

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	Seite 4
Abbildungsverzeichnis	Seite 5
Zusammenfassung	Seite 10
Summary	Seite 11
I. Einleitung	Seite 12
I.1 Historische Entwicklung der Erythrozytenforschung	Seite 12
I.2 Allgemeiner Aufbau der Erythrozyten	Seite 13
I.3 Erythropoese, Alterungsprozess und Eryptose	Seite 14
I.4 Aufbau der Erythrozytenmembran	Seite 17
I.4.1 Lipide	Seite 19
I.4.2 Proteine	Seite 21
I.5 Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und der PS-Exposition	Seite 23
I.5.1 Intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt	Seite 24
I.5.2 Bedeutung der PS-Exposition	Seite 25
I.5.3 Scramblase	Seite 27
I.5.4 Gardos-Kanal / transmembrane K^+ -Verteilung	Seite 28
I.5.5 PKC / PMA	Seite 30
I.5.6 Na^+ / H^+ -Exchanger (NHE)	Seite 32
I.5.7 Zwei Wege zur PS-Exposition	Seite 32
I.6 Zielstellung der Arbeit	Seite 34
II. Material und Methoden	Seite 35
II.1 Erythrozyten	Seite 35
II.2 Chemikalien	Seite 35
II.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	Seite 37
II.4 Verwendete Geräte	Seite 43
II.5 Methoden	Seite 44

II.5.1	Isolierung der Erythrozyten	Seite 44
II.5.2	Versuche zur Analyse der PS-Exposition / des Ca^{2+} -Gehaltes	Seite 44
II.5.3	Änderung des Zellvolumens	Seite 45
II.5.4	Änderung des intrazellulären pH-Wertes	Seite 46
II.5.4	Dichteseperation der Erythrozyten nach Zellalter	Seite 46
II.5.5	Drabkin's Assay zur Bestimmung der Hämolyserate	Seite 49
II.6	Statistik	Seite 49
III. Ergebnisse		Seite 50
III.1	Kalibrierungen	Seite 50
III.1.1	Kalibrierung A23187	Seite 52
III.1.2	Kalibrierung LPA	Seite 54
III.1.3	Kalibrierung PMA	Seite 57
III.1.4	Kalibrierung R5421	Seite 59
III.2	Aktivierung der Zellen mit A23187, LPA und PMA	Seite 62
III.2.1	Analyse von PS-Exposition und Ca^{2+} -Anstieg	Seite 62
III.2.2	Analyse des Zellvolumens nach Verwendung von A23187, LPA und PMA	Seite 64
III.2.3	Analyse der PS-Exposition bei gleichzeitiger LPA- und PMA-Aktivierung	Seite 65
III.3	Inhibierung der Scramblase mit R5421	Seite 66
III.4	Inhibierung der PKC mit Chelerythrin	Seite 69
III.5	Gleichzeitige Inhibierung von Scramblase und PKC	Seite 72
III.5.1	Kontrollmessungen	Seite 72
III.5.2	Inhibierung von Scramblase und PKC nach Aktivierung mit A23187	Seite 73
III.5.3	Inhibierung von Scramblase und PKC nach Aktivierung mit LPA	Seite 74
III.5.4	Inhibierung von Scramblase und PKC nach Aktivierung mit PMA	Seite 76
III.6	Inhibierung des K^+ -Effluxes durch den Gardos-Kanal	Seite 77
III.7	Einfluss des Zellvolumens auf die PS-Exposition	Seite 79

III.7.1 Messungen am Mikroskop	Seite 79
III.7.2 Kinetik zur PS-Exposition	Seite 81
III.8 Einfluss des pH-Wertes auf die PS-Exposition	Seite 81
III.9 Einfluss des Zellalters auf die PS-Exposition	Seite 82
III.9.1 Kontrollversuche zur Auftrennung der Erythrozytenpopulation mittels Percoll-Separation	Seite 84
III.9.2 Analyse der PS-Exposition in Erythrozyten unterschiedlichen Zellalters nach Aktivierung der Zellen mit A231287, LPA und PMA	Seite 90
IV. Diskussion	Seite 94
Literaturverzeichnis	Seite 104
Publikationen, Vorträge, Poster	Seite 114
Danksagung	Seite 116

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetomethyl
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GMP	Guanosinmonophosphat
hPLSCR	humane Phospholipidscramblase
IP ₃	Inositoltriphosphat
LPA	Lysophosphatidsäure
MRP1	Multidrug resistance protein-1
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Phosphatidylinosital-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMRS	Plasmamembran-Redoxsystem
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SM	Sphingomyelin

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Quartärstruktur des Hämoglobins
- Abb. 2 Bildung und Entwicklung von Erythrozyten
- Abb. 3 Physiologische Regulation der Erythropoese
- Abb. 4 Schematischer Aufbau der Erythrozytenmembran
- Abb. 5 Schematische Abbildung der Verankerung der Erythrozytenmembran
- Abb. 6 Die vier Hauptphospholipide in der Plasmamembran humaner Erythrozyten
- Abb. 7 Transporter, die verantwortlich sind für den Austausch der Phospholipide zwischen innerem und äußerem Membranleaflet
- Abb. 8 Möglichkeiten des Ionentransports durch biologische Membranen
- Abb. 9 Modellhafte Darstellung der Kaskade, die dazu führt, dass Erythrozyten prokoagulante Eigenschaften entwickeln
- Abb. 10 Geschwindigkeiten der Lipidbewegung in Membranen unterschiedlicher Zellen
- Abb. 11 Ionentransportwege die verantwortlich sind für die transmembrane K^+ -Verteilung.
- Abb. 12 Schematische Darstellung der monomeren Untereinheit des Gardos-Kanals
- Abb. 13 Aktivierung einer konventionellen PKC in organellhaltigen Zellen
- Abb. 14 Verschiedene Signalwege, die in Thrombozyten zur PS-Exposition führen
- Abb. 15 Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration
- Abb. 16 Eichgerade zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration
- Abb. 17 Verwendetes FACS und verwendetes Mikroskop
- Abb. 18 Darstellung der Ergebnisse einer FACS-Analyse.
- Abb. 19 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten während der Inkubation mit 2 μ M A23187
- Abb. 20 Kinetik Annexin V-positiver Zellen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an A23187
- Abb. 21 Kinetik von Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an A23187

- Abb. 22 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten während der Inkubation mit 2,5 μ M LPA
- Abb. 23 Hämolyserate der Erythrozyten bei unterschiedlichen LPA-Konzentrationen
- Abb. 24 Kinetik Annexin V-positiver Zellen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an LPA
- Abb. 25 Kinetik von Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an LPA
- Abb. 26 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten während der Inkubation mit 6 μ M PMA
- Abb. 27 Kinetik Annexin V-positiver Zellen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an PMA
- Abb. 28 Kinetik von Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an PMA
- Abb. 29 Strukturformel R5421
- Abb. 30 Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen bzw. nach Inkubation mit R5421
- Abb. 31 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit LPA, wenn zuvor die Scramblase mit verschiedenen Konzentrationen an R5421 inhibiert wurde
- Abb. 32 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit LPA, wenn zuvor die Scramblase mit verschiedenen Konzentrationen an R5421 inhibiert wurde
- Abb. 33 Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen und nach der Inkubation mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA, 6 μ M PMA
- Abb. 34 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA, 6 μ M PMA
- Abb. 35 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA, 6 μ M PMA
- Abb. 36 Durch die Trocknungs-Methode ermitteltes relatives Zellvolumen nach Inkubation mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA, 6 μ M PMA
- Abb. 37 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit LPA und PMA

- Abb. 38 Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten nach Inkubation mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA und 6 μ M PMA, nach vorheriger Inhibierung der Scramblase mit 100 μ M R5421 für 30 min
- Abb. 39 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA und 6 μ M PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 inhibiert wurde
- Abb. 40 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA und 6 μ M PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 inhibiert wurde
- Abb. 41 Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen bzw. nach Inkubation mit Chelerythrin
- Abb. 42 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA und 6 μ M PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurde
- Abb. 43 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung 2 μ M A23187, 2,5 μ M LPA und 6 μ M PMA, wenn zuvor die PKC mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurde
- Abb. 44 Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen bzw. nach Inkubation mit Chelerythrin und R5421
- Abb. 45 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μ M A23187, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 und die PKC mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurden
- Abb. 46 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 μ M A23187, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 und die PKC mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurden
- Abb. 47 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2,5 μ M LPA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 und die PKC mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurden
- Abb. 48 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2,5 μ M LPA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 und die PKC mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurden
- Abb. 49 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 6 μ M PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μ M R5421 und die PKC mit 10 μ M Chelerythrin inhibiert wurden

- Abb. 50 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 6 μM PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μM R5421 und die PKC mit 10 μM Chelerythrin inhibiert wurden
- Abb. 51 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μM A23187, 2,5 μM LPA, 6 μM PMA, wenn der K^+ -Efflux geblockt wurde
- Abb. 52 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 μM A23187, 2,5 μM LPA, 6 μM PMA, wenn der K^+ -Efflux geblockt wurde
- Abb. 53 Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten, deren Zellvolumen verändert wurde
- Abb. 54 Kinetik Annexin V-positiver Zellen, deren Zellvolumen verändert wurde
- Abb. 55 Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μM A23187, 2,5 μM LPA, 6 μM PMA, wenn der Intrazellularraum azidifiziert wurde
- Abb. 56 Fotografie der in Percoll-Lösung in verschiedene Altersfraktionen separierten Erythrozyten
- Abb. 57 Annexin V-positive Zellen der verschiedenen Fraktionen unter Kontrollbedingungen
- Abb. 58 Zellen der verschiedenen Fraktionen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter Kontrollbedingungen
- Abb. 59 Gehalt an Retikulozyten in den einzelnen Fraktionen
- Abb. 60 Redox-Aktivitäts-Assay zur Bestimmung der Redoxaktivität der Erythrozyten in den einzelnen Fraktionen
- Abb. 61 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten der verschiedenen Altersklassen
- Abb. 62 Relatives Zellvolumen der Erythrozyten in den einzelnen Fraktionen
- Abb. 63 Gelelektrophoretische Auftrennung der Membranproteine dichteseparierter Erythrozyten
- Abb. 64 Western Blot gegen das Protein Bande 4.1
- Abb. 65 Intensitätsverhältnisse der Banden 4.1a und 4.1b der einzelnen Fraktionen
- Abb. 66 Annexin V-positive Zellen der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2 μM A23187
- Abb. 67 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2 μM A23187

- Abb. 68 Annexin V-positive Zellen der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2,5 μ M LPA
- Abb. 69 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2,5 μ M LPA
- Abb. 70 Annexin V-positive Zellen der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 6 μ M PMA
- Abb. 71 Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 6 μ M PMA

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untermauert die Hypothese, dass es in Erythrozyten zwei unterschiedliche Wege zur PS-Exposition geben muss. Durch Vergleich verschiedener Methoden (Anregung zur PS-Exposition und Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes durch A23187, LPA und PMA sowie Inhibierung von Scramblase, PKC und Gardos-Kanal) war es möglich, Unterschiede im Reaktionsverhalten der Zellen zu analysieren. Es wurde deutlich, dass sich das Reaktionsverhalten der Zellen klar unterscheidet, wenn verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Hierbei steht der durch A23187 und LPA aktivierte Signalweg dem durch PMA aktivierten Signalweg gegenüber.

Weiter wurden Parameter, die in der Literatur als mögliche Trigger für die PS-Exposition diskutiert werden, analysiert. Der Efflux von K^+ -Ionen konnte, zumindest im durch A23187 und LPA induzierten Signalweg, als für die PS-Exposition mitverantwortlicher Faktor identifiziert werden. Im PMA-induzierten Signalweg hingegen spielt er keine Rolle. Eine Änderung des Zellvolumens sowie eine Alkalisierung des intrazellulären pH-Wertes konnten als Trigger für die PS-Exposition ausgeschlossen werden.

Es wurde der Nachweis erbracht, dass die Auftrennung der Erythrozyten in unterschiedliche Altersklassen mittels Percoll-Separation verlässliche Ergebnisse liefert. Dass die Unterschiede im Reaktionsverhalten der Erythrozyten einer Population im unterschiedlichen Zellalter begründet sein könnte, kann jedoch ausgeschlossen werden und muss andere Ursachen haben.

Summary

It is known that erythrocytes have 2 different pathways leading to PS exposure. The presented work strongly supports this hypothesis. To analyse differences in their reactions behavior cells were treated under different experimental conditions (PS exposure and influx of extracellular Ca^{2+} were stimulated using A23187, LPA and PMA. Furthermore, Scramblase, PKC and Gardos channel were inhibited). The results show that activation of the different pathways leads to diverse cellular responses: the signal pathway activated by A23187 and LPA is different from the pathway activated by PMA.

In literature, different parameters are taken into consideration for PS exposure (K^+ efflux, changes in cell volume and alkalization of intracellular pH). These parameters were analysed in the presented work, too. The results show that an efflux of K^+ is involved in the mechanism of PS exposure in the case of the A23187- and LPA-activated pathway. However, K^+ efflux does not play a role in the PMA-activated pathway. Changes in cell volume and alkalization of intracellular pH can be excluded as possible causes for PS exposure.

Separation of erythrocytes into fractions of different cell age was performed. It was proven that the method gives reliable results. The presented data clearly show that the cell age is not responsible for these differences. In addition, erythrocytes from one donor react different after stimulation for PS exposure.

I. Einleitung

I.1 Historische Entwicklung der Erythrozytenforschung

Erythrozyten, die mit 5 bis 6 Millionen Zellen je ml^3 den größten Anteil an Zellen im Blut darstellen [1], wurden in ihrem Aufbau und ihrer Komplexität lange Zeit unterschätzt. Galten sie zunächst lediglich als „Bläschen mit flüssigem Blutfarbstoffgehalt“ [2] bzw. später auch als „Maschengefüge mit eingelagertem Hämoglobin“ [3], wurden sie zum Teil bis vor wenigen Jahrzehnten fälschlicherweise als bloße „Hämoglobinsäcke“ angesehen. Sie seien lediglich verantwortlich für den Transport von O_2/CO_2 und an der Pufferung des Blutes beteiligt. Man ging davon aus, dass sie zu keiner inter- bzw. extrazellulären Kommunikation fähig seien. Grund für diese Annahme ist das Fehlen des Zellkerns in ausgereiften Erythrozyten, sowie das Fehlen der meisten intrazellulären Organellen. Dass man Erythrozyten mit dieser veralteten Sichtweise nicht gerecht wurde, bzw. vielmehr diese zu zellulären Antworten fähigen und mit einer Maschinerie an intrazellulären Signalen ausgestatteten Blutzellen dramatisch unterschätzte, gilt heutzutage in Fachkreisen als unumstritten. Seit über 20 Jahren gilt als gesichert, dass Erythrozyten mit der Maschinerie ausgestattet sind, die notwendig ist für die intrazelluläre Kommunikation. Hierbei spielen Komponenten wie Kinasen, Phosphatasen, Phospholipasen, Cyclasen, Hormonrezeptoren und Ligand-gesteuerte bzw. mechanisch-aktivierte Ionenkanäle eine Hauptrolle [4]. Die zellulären Antworten von Erythrozyten werden reguliert durch post-translationale Modifikationen bereits vorhandener Proteine. Bei diesem Prozess spielt vor allem die PKC-vermittelte Phosphorylierung eine wichtige Rolle [5].

Die Beteiligung von Erythrozyten an der Entstehung eines Thrombus wird in der medizinischen Literatur oft immer noch als lediglich passiv betrachtet. Die Rolle der Erythrozyten wird beschrieben als „passive Teilnehmer, die den Clot lediglich mit Masse unterstützen“ [6]. Bildlich geht man davon aus, dass die im Blutstrom befindlichen Erythrozyten in einem Netz aus Fibrin „eingefangen“ werden. Thrombosen, die zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Schlaganfall, Herzinfarkt oder Embolien führen können, stellen in der westlichen Welt die mit Abstand häufigste Todesursache dar. Daher war es naheliegend, die im Blut mit Abstand am häufigsten vorkommenden Zellen hinsichtlich ihrer Beteiligung an der

Thrombusbildung eingehender zu untersuchen. Denn bei einer aktiven Beteiligung der Zellen ist es naheliegend, in der Thrombusprävention / -behandlung therapeutisch direkt auch an diesen Zellen anzusetzen. Klinische Untersuchungen bestätigten dann die aktive Beteiligung von Erythrozyten an der Entstehung eines Thrombus. Ihre Beteiligung wurde schließlich nachgewiesen durch Studien, in denen gezeigt wurde, dass Anämien das Risiko für Blutungen erhöhen, wohingegen eine erhöhte Erythrozytenzahl das Risiko für Thrombosen erhöht [6]. Zudem wird ein erhöhter Hämatokrit in Zusammenhang gebracht mit dem gehäuften Auftreten von Schlaganfällen und Artherosklerose der Halsschlagader [6, 7]. Horne et al. beschrieben 2006 erstmals die Adhäsion von Erythrozyten an Thrombozyten als mitentscheidenden Faktor für die Thrombusbildung [6]. Weiterhin unklar war zunächst, welche Komponenten der Zellmembran verantwortlich waren für die erhöhte Adhäsivität der Zellen bzw. welche intrazellulären Signalwege in diesem Prozess eine Rolle spielen.

I.2 Allgemeiner Aufbau der Erythrozyten

Die roten Blutzellen sind umhüllt von einer flexiblen Zellmembran. Ihre Form wird über ein Membranskelett aus Spektrin- und Aktinfilamenten aufrechterhalten. Die spezielle bikonkave Form der Erythrozyten hat eine vergrößerte Zelloberfläche zur Folge, was zum einen eine hohe Flexibilität der Zellen beim Durchtritt durch enge Kapillare erlaubt. Zum anderen verbessert die vergrößerte Oberfläche den Gasaustausch.

Ausgereifte Erythrozyten enthalten keine Organellen wie Nukleus, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien oder Ribosomen. Der Energiegewinn erfolgt über anaerobe Glykolyse [8].

Im Innern der Erythrozyten befindet sich das Hämoglobin, welches 90% ihrer Trockenmasse ausmacht und für den O_2 -Transport verantwortlich ist (s. Abb. 1). Nichtkovalente Kräfte halten das Hämoglobin, bestehend aus zwei α - und zwei β -Ketten, zusammen. Zudem stehen sie miteinander in kooperativer Wechselwirkung. Bindet ein Molekül O_2 an eine der Ketten, wird die Affinität der verbliebenen Ketten für O_2 erhöht. Das in den Muskelzellen vorhandene, nur aus einer Kette bestehende Myoglobin besitzt eine höhere Affinität für O_2 , was die Abgabe des Sauerstoffs an die Muskelzellen ermöglicht.

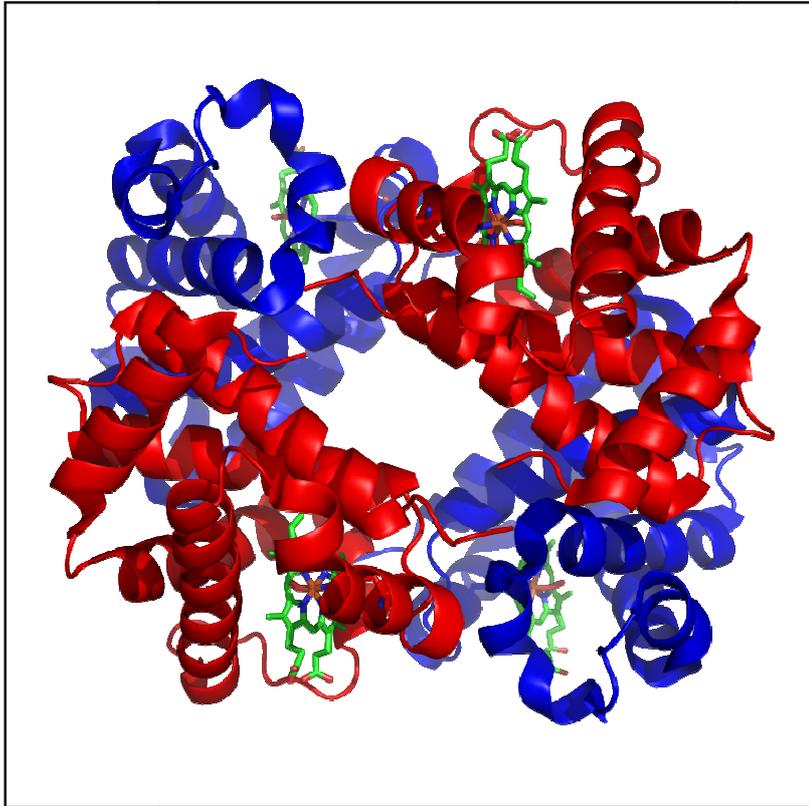


Abb. 1: Quartärstruktur des Hämoglobins. In rot: α -Ketten, in blau: β -Ketten, in grün: Häm-Gruppen. Aus: [9].

I.3 Erythropoese, Alterungsprozess und Eryptose

Bei der Erythropoese, der Bildung und Entwicklung von Erythrozyten, handelt es sich um einen komplexen Prozess. In zahlreichen Schritten entsteht aus den hämatopoietischen Stammzellen zunächst der Erythroblast, dann der Normoblast und schließlich der Retikulozyt. Abbildung 2 zeigt die Entwicklung der Zellen in mehreren Schritten. Die frühen Vorläuferzellen, die Erythroblasten, differenzieren hierbei zunächst in Normoblasten. Ein Schlüsselereignis im Reifungsprozess stellt die Kondensierung des Nukleus dar, auf die der Verlust des Kerns folgt. Es entsteht der Retikulozyt. Retikulozyten enthalten noch Reste von DNA und RNA und sind mit einem Durchmesser von 8 μM noch etwas größer als ausgereifte Erythrozyten [10]. Als Retikulozyten verlassen die Zellen schließlich das rote Knochenmark und treten in den Blutstrom ein [11].

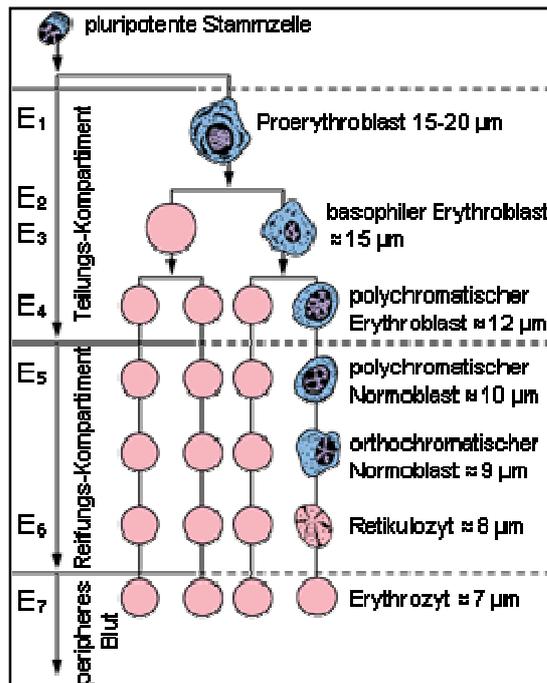


Abb. 2: Bildung und Entwicklung von Erythrozyten. Unterschieden wird zwischen der Teilungsphase, die die Erythroblasten durchlaufen. Es folgt die Reifungsphase, in der die entstandenen Normoblasten ausdifferenzieren und ihren Zellkern verlieren. Als Retikulozyten gehen die Zellen dann in den Blutstrom über, wo sie zu reifen Erythrozyten werden. Aus: [10].

Die Weiterentwicklung vom Retikulozyten zum Erythrozyten geschieht in einer Zeitspanne von 72 Stunden. Während dieser Zeitspanne finden Veränderungen im Membranaufbau und der Proteinzusammensetzung statt. Retikulozyten verlieren 90% ihrer Insulinrezeptoren, all ihre Transferrinrezeptoren und 60% ihrer Na⁺/K⁺-Pumpen [12]. Es kommt zu einem Verlust an Membran-Phospholipiden und Zellwasser, aber zu keinem Verlust an Hämoglobin. Folgen sind ein vermindertes Zellvolumen und eine erhöhte Zelldichte. Organellen wie Mitochondrien und Ribosomen gehen vollständig verloren [12, 13].

Die Menge neu gebildeter Erythrozyten wird streng reguliert, da die Anzahl an Erythrozyten im Blutstrom von enormer Wichtigkeit ist. Ein ausgewogenes hämostatisches Gleichgewicht mit einer definierten Erythrozytenmenge ist nötig, damit einerseits Blutungen zuverlässig gestoppt werden können, andererseits jedoch auch keine Thrombosen aufgrund eines erhöhten Hämatokrits auftreten. Eine normale Hämostase benötigt daher eine vernünftige Balance zwischen der Rate der Erythrozytenproduktion und dem Erythrozytenabbau [11]. Die Neuproduktion der Erythrozyten wird geregelt durch das Hormon Erythropoetin [14]. Abbildung 3 zeigt Faktoren, die einen Einfluss auf die Erythropoese haben:

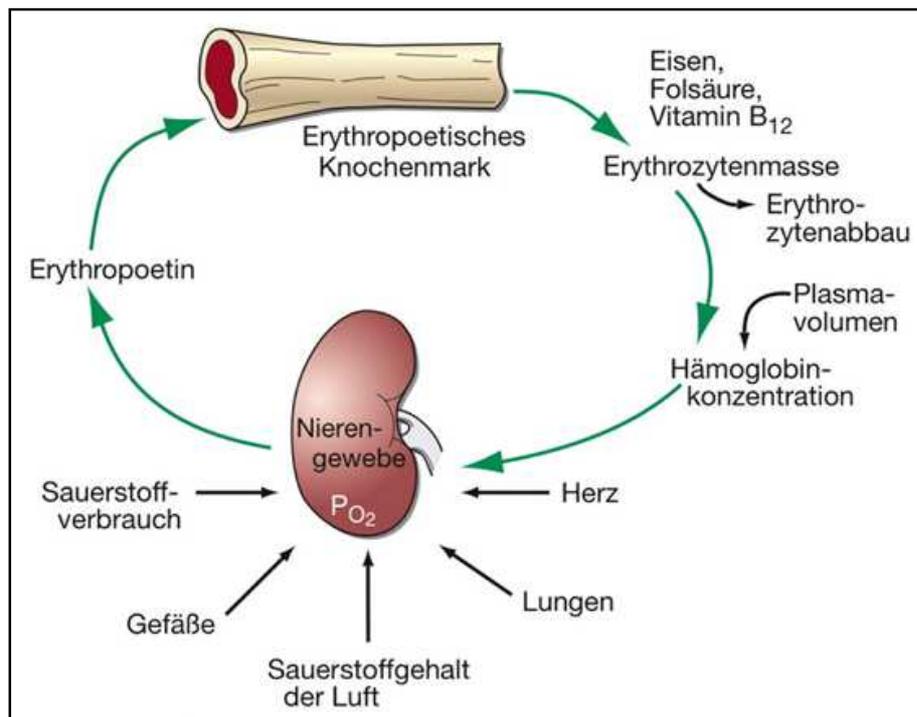


Abb. 3: Physiologische Regulation der Erythropoese durch den Sauerstoffgehalt der Gewebe. Das in den Nieren produzierte Hormon Erythropoetin reguliert die Bildung der Erythrozyten. Aus: [15].

Im Blutstrom haben Erythrozyten eine mittlere Lebensdauer von 120 Tagen [12, 16]. Wie alle Blutzellen unterliegen sie, da sie ständig durch das Adersystem des Körpers gepumpt werden, einer gewissen Abnutzung. In der Milz erfolgt die Überprüfung der Erythrozyten. Werden sie als „zu alt“ bzw. „abgenutzt“ klassifiziert, erfolgt ihr Abbau mittels Phagozytose durch Makrophagen in Knochenmark, Lymphknoten, Milz oder Leber [17]. Hierbei wird unter anderem exponiertes Phosphatidylserin (PS) als Signal erkannt, welches zur Entfernung beschädigter oder alter Zellen dient [18]. Nach üblicherweise 110 Tagen beginnt der Abbau der ersten Zellen, nach 120 Tagen sind 50% der Zellen abgebaut und nach 130 Tagen sind auch die ältesten Zellen aus dem Blutstrom entfernt [19]. Die Seneszenz von Erythrozyten ist begleitet von einer reduzierten Aktivität der Ca²⁺-ATPase. Dies führt zur intrazellulären Akkumulation des Kations. Begleitend kommt es zu einem Verlust an intrazellulärem K⁺ auf weniger als 10 mM (vorher 100-140 mmol/l) [20].

Ging man lange Zeit davon aus, dass Zerstörung durch Phagozytose die einzige Art des Zelltods bei Erythrozyten sei, weiß man heute, dass Erythrozyten sehr wohl zu Mechanismen fähig sind, die ihren Abbau durch Makrophagen triggern. Bei anderen Zelltypen sind viele intrazelluläre Organellen, darunter Mitochondrien und Zellkern,

an der Apoptose beteiligt. Obwohl Erythrozyten nicht über diese Organellen verfügen, zeigen sie typische Zeichen der Apoptose kernhaltiger Zellen, wie erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} , K^+ -Efflux, Schrumpfen, Vesikelbildung und PS-Exposition [20, 21]. Werden zirkulierende Erythrozyten beschädigt, so unterlaufen diese Zellen den gesteuerten Zelltod [16]. Lang et al. prägten daher den Begriff „Eryptose“, der einerseits die Unterschiede zu kernhaltigen Zellen unterstreichen soll, andererseits jedoch auch die Gemeinsamkeiten im Ablauf hervorhebt [16]. Entfernt werden eryptotische Zellen, indem Makrophagen das exponierte PS an der Membranaußenseite über spezifische Rezeptoren erkennen und diese Erythrozyten phagozytieren und aus dem Blutstrom entfernen [21-25]. Die Eryptose wird ausgelöst durch mehrere Faktoren. Dazu gehört als wichtigster Trigger ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt. Dieser führt zu Scrambling, Vesikelbildung, Ausstrom von KCl und einem damit verbundenen Verlust an H_2O . Es kommt zum Schrumpfen der Zelle. Ein weiterer auslösender Faktor ist Ceramid. Es erhöht die Ca^{2+} -Sensitivität für das Scrambling und das Schrumpfen, wodurch es ebenfalls zur Eryptose kommt. Produziert wird das Ceramid vermutlich aus Sphingomyelin durch die Sphingomyelinase. Es ist möglich, dass es dann entweder direkt in den Erythrozyten wirkt oder es wird ins Plasma transportiert und wirkt von außen [23]. Weitere Mechanismen, die die Eryptose auslösen können sind: Energie-Depletion, oxidativer Stress und osmotischer Schock [21]. Die Eryptose wird reguliert durch verschiedene Kinasen, u.a. cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I, AMP-aktivierte Kinase [16].

I.4 Aufbau der Erythrozytenmembran

Auf ihrer Reise im Blutstrom sind Erythrozyten großem Stress und ständigen Deformationen ausgesetzt. So müssen die Erythrozyten, die einen Durchmesser von ca. $7\ \mu\text{M}$ besitzen, teilweise Kapillaren passieren, die lediglich einen Durchmesser von nur $1,5\ \mu\text{M}$ aufweisen [26]. Ihre Zellmembran muss also nicht nur im Blutstrom den ständigen Einwirkungen standhalten, sondern auch größte Deformationen hinnehmen können. Zusammengesetzt ist die Zellmembran von Erythrozyten aus Proteinen (52%), Lipiden (41%) und Kohlenhydraten (7%) [27]. Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau der Erythrozytenmembran mit ihren vielen Komponenten.

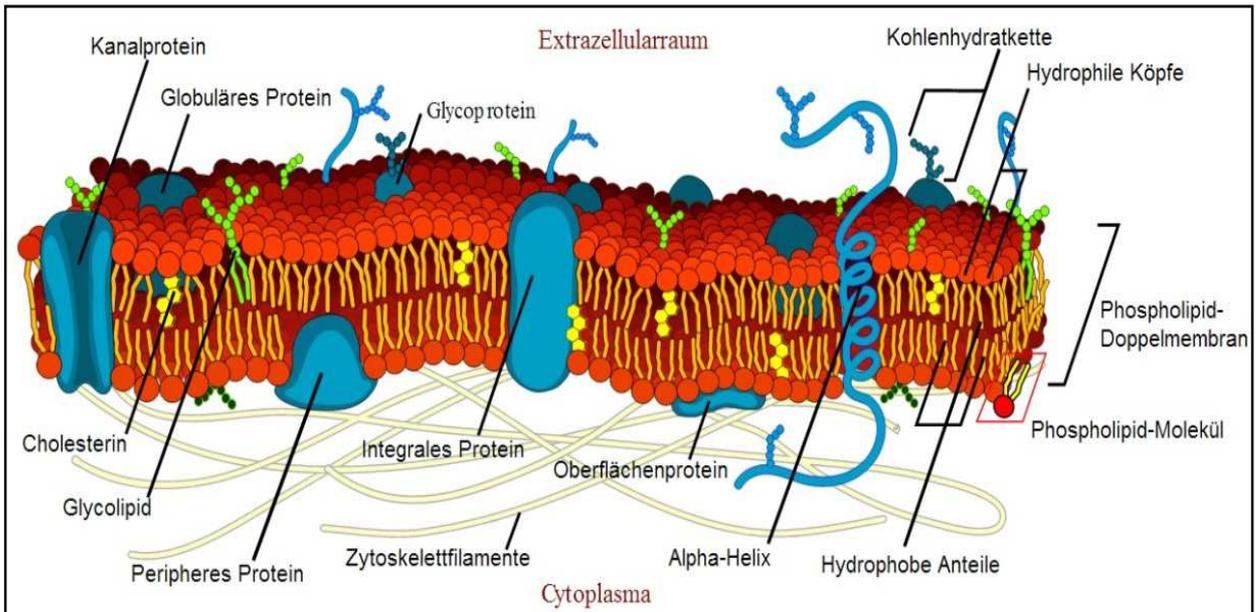


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Erythrozytenmembran, bestehend aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Aus: [28].

Aufrechterhalten wird die Form der Erythrozyten durch ein Membranskelett aus Aktin- und Spektrinfilamenten. Dieses stabile Filamentnetz wird über Adapterproteine wie Ankyrin und das Protein 4.1 verankert [28, 29]. Abb. 5 zeigt den schematischen Aufbau dieser Filamente:

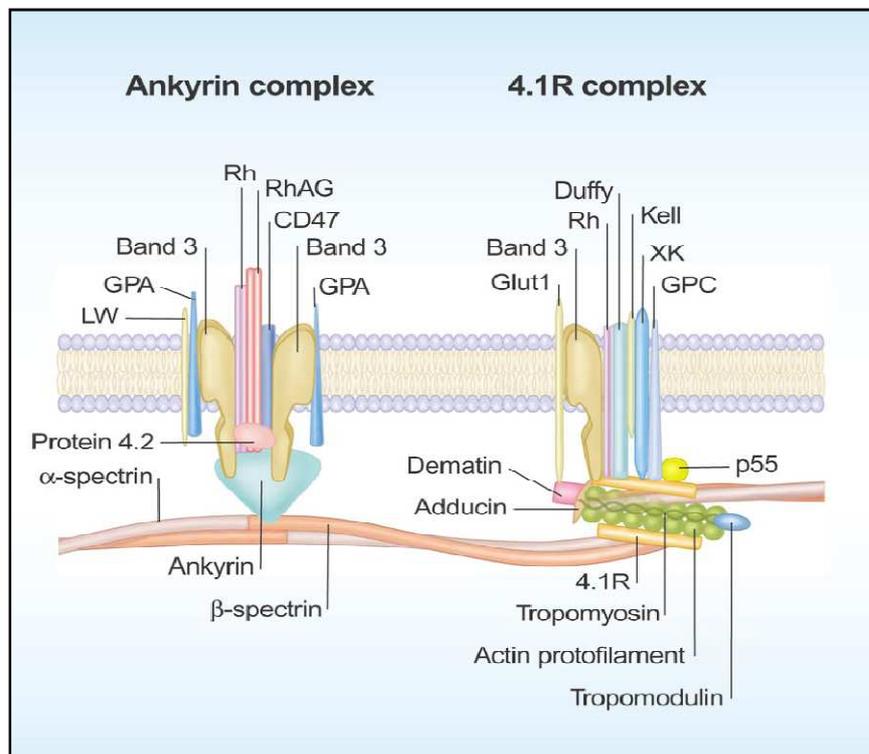


Abb. 5: Schematische Abbildung der Verankerung der Erythrozytenmembran. Aus: [30].

I.4.1 Lipide

Man unterscheidet zwischen Phospholipiden (62,7%), neutralen Lipiden / Cholesterol (25,2%) und Glykosphingolipiden (12%) [31]. Die Lipidzusammensetzung der Membran bleibt während der Lebensdauer der Erythrozyten weitestgehend konstant und schwankt nur in geringem Ausmaß. Dies liegt daran, dass aufgrund fehlender Organelle keine *de novo* Synthese möglich ist [32]. Den Hauptbestandteil der Zellmembran bilden die Phospholipide (s. Abb. 6).

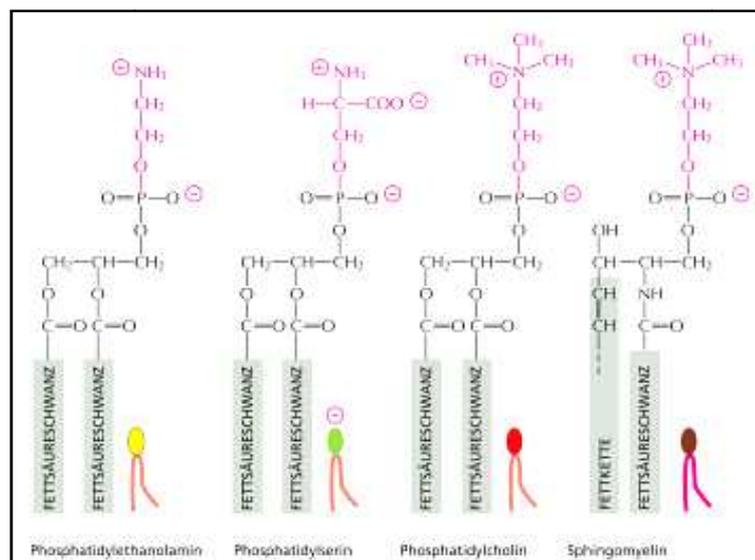


Abb. 6: Die vier Hauptphospholipide in der Plasmamembran humaner Erythrozyten. Dargestellt sind die Glycerinderivate PE, PS und PC, sowie das von Sphingosin abgeleitete SM. Aus: [33].

Es besteht eine Ungleichverteilung der Phospholipide zwischen dem inneren und dem äußeren Membranleaflet. Das äußere Leaflet humaner Erythrozyten enthält hauptsächlich die neutralen Cholinphospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM), während das innere Leaflet die anionischen Aminophospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) (8-15 mol%, [34]) enthält [35-39]. Ebenfalls im inneren Leaflet vorhanden sind die Phospholipide Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). Bei humanen Erythrozyten enthält die äußere Membran 75-80% des PC und SM, 20% des PE, PA, PI und PIP₂ und keine detektierbaren Mengen an PS und PIP [38].

Die Verteilung der Phospholipide zwischen innerem und äußerem Leaflet beeinflusst nicht nur die Struktur der Zellmembran, sondern hat auch funktionellen Charakter. So

fördert PS die Ca^{2+} -induzierte Membranfusion, die bei der Exozytose auftritt. Es fungiert als Cofaktor für zahlreiche membrangebundene Proteine wie PKC und Na^+/K^+ -ATPase und ermöglicht die Bindung von Membranproteinen an die endofaziale Oberfläche [34].

Bewegung der Phospholipide:

Die unkatalysierte transbilayer Bewegung der Phospholipide ist sehr langsam [37]. Es gibt 3 Arten von Lipidtransportern, die die asymmetrische Verteilung der Phospholipide aufrechterhalten und die Lipide zurücktransportieren (siehe Abb. 7).

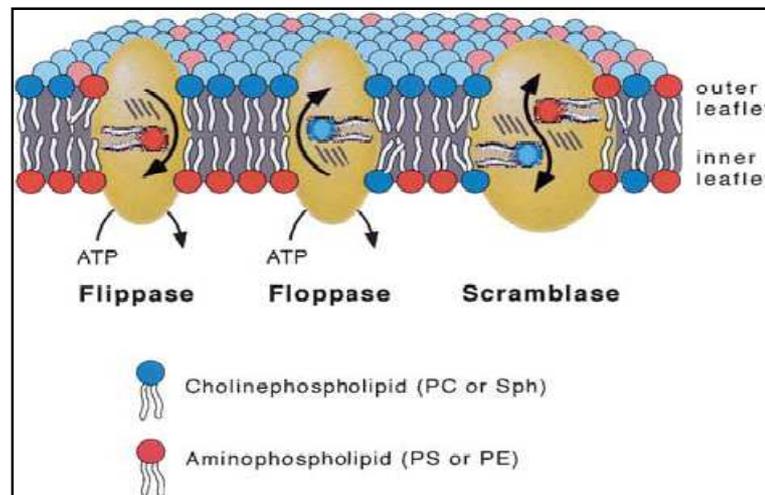


Abb. 7: Transporter, die verantwortlich sind für den Austausch der Phospholipide zwischen innerem und äußerem Membranleaflet. Flippase und Floppase sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Lipidverteilung, wohingegen eine Aktivierung der Scramblase zum Zusammenbruch der Lipid-Asymmetrie führt. Aus: [34].

1) Flippase (Aminophospholipid Translokase):

Sie katalysiert den Transport von PS und PE zurück nach innen [40] und hält die asymmetrische Lipidverteilung aufrecht. PS wird mit einer Halbwertszeit von 5 bis 10 min nach innen transportiert, wohingegen der Transport von PE langsamer erfolgt [41-43]. Bei Flippasen handelt es sich um P-Typ ATPasen, die keine anderen Phospholipide transportieren und somit auch als „Aminophospholipid Translokasen“ bezeichnet werden [34, 44, 45]. Sie besitzen eine erhöhte Selektivität für PS gegenüber PE [37]. Pro transportiertem Phospholipid wird ein Molekül ATP verbraucht. Flippasen werden geblockt durch erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} [47, 48].

2) Floppase (ABCC1):

Sie realisiert den Auswärtstransport von Cholin- und Aminophospholipiden. Mit einer Halbwertszeit von 1,5 Stunden [47] ist sie jedoch 10x langsamer als die Flippase [49, 50]. Sie ist ebenfalls ATP-abhängig. Floppasen gehören zur Familie der ATP-binding Cassette Proteinen (ABC Transporter) und wurden als Multidrug resistance protein-1 (MRP1) identifiziert [47, 51].

3) Scramblase:

Sie ist dazu in der Lage, Phospholipide über einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus schnell zwischen den Membranleaflets hin und her zu transportieren („Flip-Flop“). Die Scramblase erlaubt eine schnelle, bidirektionale Bewegung aller Phospholipid-Typen [52]. Innerhalb weniger Minuten führt ihre Aktivität zum Zusammenbruch der Lipid-Asymmetrie. Im Gegensatz zu Flippase und Floppase benötigt die Scramblase kein ATP. Es wird vermutet, dass die Scramblase konstitutiv phosphoryliert ist, um für die Stimulierung durch Ca^{2+} bereit zu sein [34]. Obwohl die Scramblase kein ATP benötigt, führt eine Verringerung des ATP-Gehaltes zu einer Verringerung der Scramblase-Aktivität. Es wird daher vermutet, dass eine phosphorylierte Komponente an diesem Prozess beteiligt ist [47, 53].

1.4.2 Proteine

Sie sind verantwortlich für einen Großteil der dynamischen Prozesse, die an Membranen ablaufen (Stofftransport, Elektronen- und Ionentransport, Signalübertragung, Zell-Zell-Kontakt, Verankerung des Zytoskeletts, etc.). In Erythrozyten werden Membranproteine in frühen Entwicklungsstadien exprimiert. Später sind sie nur noch durch posttranslationale Modifikationen modifizierbar. Membranproteine lassen sich in drei Klassen einteilen: Integrale Membranproteine, periphere Membranproteine und lipidverankerte Membranproteine (vgl. Abb. 4) [54]. Da die Zellmembran undurchlässig ist für große Moleküle (z.B. Glucose, Saccharose) und geladene Moleküle (z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), müssen diese Stoffe mit Hilfe spezieller Transporter durch die Membran transportiert werden. Unterschieden wird zwischen Diffusion (z.B. O_2 , CO_2) und vier verschiedenen Transportmechanismen (siehe Abb. 8):

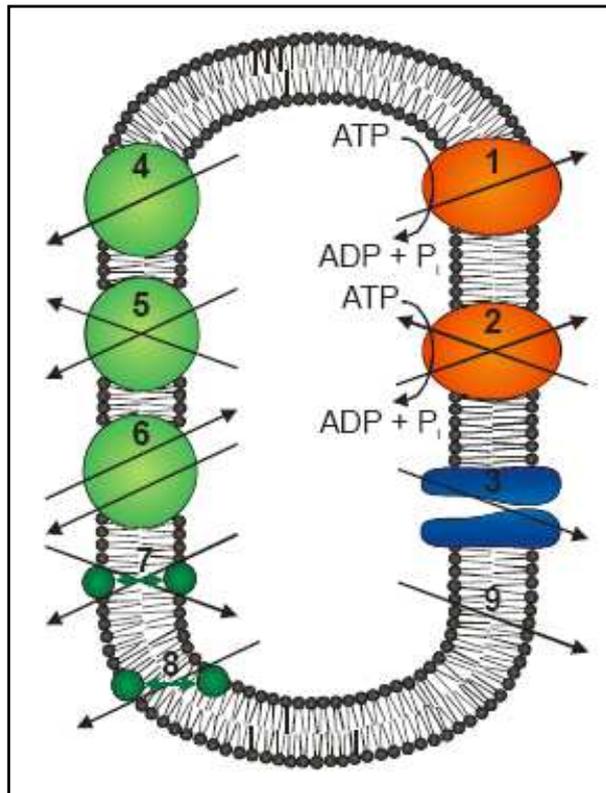


Abb. 8: Möglichkeiten des Ionentransports durch biologische Membranen. Dargestellt sind die vier möglichen Transportarten. 1,2: Aktiver Transport, 3: Transport durch Kanäle, 4 bis 6: Carrier-vermittelter Transport (4: Uniport, 5: Symport, 6: Antiport), 7, 8: Carrier-vermittelter Transport durch Ionophore (7: Antiporter, 8: Uniport), 9: Leaktreiber. Aus: [55].

1) Aktiver Transport über Pumpen:

Ermöglicht den Transport eines gelösten Stoffes unter Energieverbrauch (z.B. ATP-Hydrolyse). Hierbei unterscheidet man zwischen: P-Typ ATPasen (besitzen als Zwischenprodukt einen phosphorylierten Aspartatrest, z.B.: Na^+/K^+ -ATPase), V-Typ-ATPasen (transportieren ausschließlich H^+ , H^+ -ATPasen), F-Typ-ATPasen (katalysieren eine Reaktion, die für den Transport von H^+ verantwortlich ist, H^+ -ATPasen, aber auch ATP-Synthasen), ABC-Transporter (6 der 7 Familien transportieren unterschiedliche Substanzen unter ATP-Hydrolyse) [55].

2) Ionenkanäle:

Bei ihnen handelt es sich um kanalbildende Proteine. Sie sind stark selektiv und transportieren entlang des Konzentrationsgefälles. Ihre Regulation erfolgt auf vier unterschiedlichen Arten: Regulation über das Membranpotenzial (spannungsabhängige Kanäle), Regulation über spezifische Substanzen

(Ligand-gesteuerte Kanäle), Regulation über mechanischen Stress (Druck, Zellvolumen), Regulation durch Licht [55].

3) Carrier-vermittelter Transport:

Bei Carriern handelt es sich um Transportproteine, welche die zu transportierende Substanz (Ionen, größere Moleküle) stöchiometrisch binden und durch Konformationsänderungen durch die Membran transportieren. Man unterscheidet zwischen: Uniport (Transport einer Substanz entlang ihres Konzentrationsgefälles), Cotransport (Symporter und Antiporter, stöchiometrisch gekoppelter Transport zweier / mehrerer Substanzen / Ionen) [55].

4) „Leaktransport“:

Fasst alle übrigen Transportmechanismen von Substanzen / Ionen zusammen, die sich keiner der drei anderen Kategorien zuordnen lassen. Man geht davon aus, dass es sich hierbei um Diffusionsprozesse handelt, die an speziellen Stellen in der Zellmembran auftreten (Grenzflächen zwischen Lipiden und Proteinen, Lipidstörstellen etc.) [55].

I.5 Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und der PS-Exposition

Dass eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und der PS-Exposition dazu führen, dass Erythrozyten adhärente Eigenschaften entwickeln, ist seit längerer Zeit bekannt. Mechanismen und Komponenten, die den Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Anstieg und PS-Exposition herstellen, sind seit etwas mehr als zehn Jahren genauer bekannt. Signalwegintermediate sowie weitere beteiligte Komponenten sind jedoch zum Großteil noch unbekannt bzw. werden aktuell erforscht.

Abbildung 9 zeigt übersichtlich, wie ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt zu Erythrozyten mit adhärenenten Eigenschaften führt. Aktivierte Thrombozyten setzen PGE_2 und LPA in großen Mengen frei. Beide Second Messenger stimulieren den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} [56, 57].

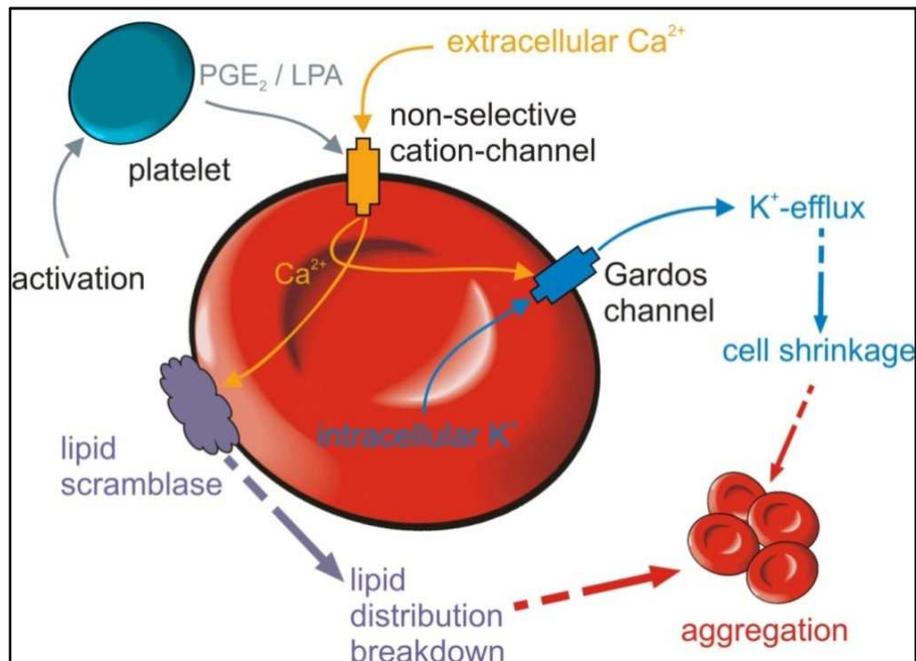


Abb. 9: Modellhafte Darstellung der Kaskade, die dazu führt, dass Erythrozyten prokoagulative Eigenschaften entwickeln. Aktivierte Thrombozyten setzen PGE₂ und LPA frei, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Gehaltes in Erythrozyten führen. Dies führt zu einer Aktivierung der Scramblase und als Folge zur PS-Exposition. Auch der Gardos-Kanal wird aktiviert, was zu einem Efflux von KCl und H₂O und somit zum Schrumpfen der Zellen führt. Aus: [56].

Der PGE₂-Effekt ist hierbei jedoch schwächer als der LPA-Effekt [57]. Low et al. vermuteten, dass eine Stimulation der Erythrozyten mit LPA eine aktive Beteiligung der Zellen an der Thrombusbildung zur Folge hat, da der induzierte Ca²⁺-Einstrom zur Dehydrierung führt, PS-Exposition induziert und weitere Veränderungen im Membranskelett bewirkt [56, 57]. Dies geschieht bei LPA-Konzentrationen, die *in vivo* nahe eines entstehenden Thrombus gemessen wurden (1-5 µM), wobei in der Nähe eines Thrombus auch weit höhere Konzentrationen bis 20 µM nachgewiesen wurden. Low et al. vermuteten, dass der Ca²⁺-Einstrom über einen spezifischen Kanal erfolgt, da die verwendeten LPA-Konzentrationen von 1-5 µM zu gering waren, um die Intaktheit der Membran zu zerstören. Detergent-ähnliche Effekte treten erst ab einer LPA-Konzentration von 70 µM bis 1 mM auf [57].

1.5.1 Intrazellulärer Ca²⁺-Gehalt

Humane Erythrozyten besitzen üblicherweise einen geringen intrazellulären Gehalt an freiem Ca²⁺ (60 nM). Ein Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ hat mehrere Folgen:

1) Aktivierung der Scramblase [58] und Inhibierung der Flippase:

Es kommt zur PS-Exposition und Bildung von prokoagulanten Mikrovesikeln. Eine Entfernung des überschüssigen Ca^{2+} bewirkt eine rasche Reaktivierung der Flippase. Exponiertes PS wird ins cytoplasmatische Leaflet zurücktransportiert [59].

2) Aktivierung des Gardos-Kanals:

Folge ist ein Ausstrom von KCl und osmotisch gebundenem Wasser. Die Erythrozyten schrumpfen [58, 60].

3) Aktivierung der PKC:

Die PKC ist verantwortlich für die Regulierung zellulärer Signalwege. Es kommt zu einer weiteren, verstärkten Aufnahme von Ca^{2+} . Darüber hinaus wird die PS-Exposition über einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus getriggert.

Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} resultiert aus einem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} , da Erythrozyten keine intrazellulären Ca^{2+} -Speicher besitzen [4]. Bereits nach wenigen Sekunden reagiert die Ca^{2+} -Pumpe auf den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} . Aufgrund ihrer hohen Pumpaktivität kommt es zu einem raschen Abfall des Ca^{2+} auf seinen Ursprungswert [60].

1.5.2 Bedeutung der PS-Exposition

Wird das Endothelium von Blutgefäßen beschädigt, kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten. Sie werden prokoagulant und schütten chemische Signalstoffe aus. Zudem transportieren sie (unter anderem) PS nach außen. „Dieses dient als katalytische Oberfläche zur Bildung aktiver Enzym-Substrat-Komplexe, vor allem für den Tenase- und Prothrombinase-Komplex. Dies führt zu einer erhöhten Bildung von Thrombin und schließlich zum Clotting“ [61]. Die Thrombozyten-Aktivierung stellt einen wichtigen Mechanismus dar zur Blutstillung und Wundheilung. Deutlich wird dies vor allem bei Krankheitsbildern, bei denen dieser Mechanismus gestört ist, wie z.B. bei Hämophilie. Es ist nachgewiesen, dass exponiertes PS die Blutkoagulation fördert. Es schafft eine Plattform für den Aufbau hoch-aktiver Protease-Cofaktor-

Komplexe, was zwei folgegebundene Reaktionen der Koagulationskaskade beschleunigt: Die Aktivierung von Faktor X und die sich anschließende Bildung von Thrombin. Zudem wurde gezeigt, dass unerwünschte PS-Exposition in zirkulierenden Blutzellen für ein erhöhtes Thrombose-Risiko sorgt [37]. Die optimale Aktivität für den Tenase- und Prothrombinase-Komplex liefern Phospholipid-Oberflächen, die 10-15 mol% PS enthalten. Ein höherer Gehalt an PS wiederum führt zu verminderter katalytischer Leistung [47, 62]. Jedoch sind nicht nur Thrombozyten dazu in der Lage, PS auf ihre Membranaußenseite zu transportieren. Andere Zelltypen sind ebenfalls dazu in der Lage (s. Abb. 10). Die für die verschiedenen Zelltypen ermittelten maximalen Scrambling-Raten unterscheiden sich stark. Diese Unterschiede können bedingt sein durch eine unterschiedlich hohe Anzahl an Scramblase-Proteinen in der Plasmamembran der jeweiligen Zelltypen [52].

Die Aktivität der Scramblase setzt erst nach einer Lagphase ein, die je nach Zelltyp unterschiedlich lang ausgeprägt ist. Bei lymphoiden Zellen dauert sie 30 Sekunden, bei Thrombozyten und Erythrozyten wurde eine Lagphase von wenigen Sekunden beobachtet. Das Auftreten dieser Lagphase lässt vermuten, dass es zwischen der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts und der Scramblase-Aktivierung einen oder mehrere eingreifende Schritte gibt [52]. Nach einer Ca^{2+} -Aktivierung bleibt der Scrambling-Pathway in Erythrozyten mindestens zwei Stunden lang aktiv [37].

Eine erhöhte Exposition von PS auf die Membranaußenseite von Erythrozyten ist eine Besonderheit einiger Erkrankungen wie Sichelzellanämie, Malaria, Diabetes, Beta-Thalassämie, etc. [63-65].

Die bei Patienten mit Stomazytose, Beta-Thalassämie und Sichelzellanämie häufig auftretenden Thrombosen werden als eine Folge der abnormen PS-Exposition und der damit einhergehenden erhöhten Erythrozytenaggregation angesehen [66]. Bei Patienten mit Hypertonie oder koronaren Herzerkrankungen wurde die Entstehung von Thrombosen teilweise darauf zurückgeführt, dass Erythrozyten aggregierten und den Blutstrom blockierten. Die aktive Stabilisierung des Thrombus durch Erythrozyten trat hierbei als Folge der Thrombozyten-Aktivierung und Aktivierung der Koagulationsfaktoren auf [66].

cells	background lipid movement (sec ⁻¹) × 10 ³	scramblase- catalyzed movement (sec ⁻¹) × 10 ³
erythrocytes (human) ^a	0.015	0.45
platelets (human) ^b	1.8	78
DO11.10 (mouse) ^c	3.6	24
DO11.10 (mouse) ^d		13
jurkat (human) ^e		3.3
jurkat (human) ^f	0.27	5.6
EBV-transformed B (human) ^e		1.6
EBV-transformed B (human) ^g	0.11	1.0

^a Calculated from data in ref 8. ^b Calculated from data in ref 22.
^c Calculated from the continuous assay using dithionite reduction of NBD-lipid analogues (Figure 1 of the present study). ^d Calculated from the continuous cytometric analysis using FM1-43 (Figure 5 of present study). ^e Calculated from the exposure rate of endogenous PS measured by FITC-labeled annexin V (Figure 4 of the present study). ^f Calculated from the uptake of NBD-PS in ionophore-treated cells (data not shown). ^g Calculated from the uptake of NBD-PS in ionophore-treated cells

Abb. 10: Geschwindigkeiten der Lipidbewegung in Membranen unterschiedlicher Zellen. Dargestellt sind die Geschwindigkeiten der unkatalysierten Lipidbewegung (links) sowie die Scramblaseraten nach starker Aktivierung durch Ionophore und Ca²⁺ (rechts) in unterschiedlichen Zelltypen. Aus: [34].

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Nachweise erbracht werden, dass eine Ca²⁺-induzierte PS-Exposition in Erythrozyten schwerwiegende Folgen hat. Die Erythrozyten werden prokoagulant und beginnen, an Endothelzellen und / oder an Komponenten der subendothelialen Matrix zu haften (unter pathophysiologischen Bedingungen wie Sichelzellanämie, Malaria, Diabetes etc.) [63, 67]. Darüber hinaus kommt es zu einer interzellulären Adhäsion, die bisher *in vitro* nachgewiesen wurde [68]. Unlängst wurde gezeigt, dass PS-Exposition ein typisches Zeichen für Eryptose ist. Da Erythrozyten mit PS-Exposition die Mikrozirkulation empfindlich stören können, werden sie gezielt von Makrophagen erkannt und schnellstmöglich aus der Blutzirkulation entfernt [37].

I.5.3 Scramblase

Verantwortlich für die PS-Exposition ist die Scramblase. Hierbei handelt es sich um ein Protein bzw. eine Gruppe von Proteinen, die für den Auswärtstransport von PS verantwortlich sind. Es wird angenommen, dass die Scramblase eine „proteinöse, wässrige Pore“ erzeugt, welche „die Migration der polaren Kopfgruppe durch den hydrophoben Kern des Bilayers ermöglicht, während die Acylketten-Reste im Kern

des Bilayers verbleiben“ [37]. Beim Menschen ist eine Proteinfamilie von fünf homologen Scramblasen vorhanden (hPLSCR1-hPLSCR5) [69, 70], wobei hPLSCR1 allgemein als das Protein angesehen wird, welches für die Ca^{2+} -induzierte PS-Exposition verantwortlich ist [71, 72]. Es handelt sich bei hPLSCR1 um ein Protein aus 318 Aminosäuren, das sowohl in Erythrozyten, als auch in Thrombozyten und weiteren Geweben vorhanden ist [73]. Durch quantitatives Immunoblotting wurde von Zhou et al. nachgewiesen, dass Thrombozyten eine 10-fach höhere Menge an Scramblase-Molekülen besitzen ($10^4/\text{Zelle}$) als Erythrozyten ($10^3/\text{Zelle}$). Diese Ergebnisse könnten die erhöhte Scramblase-Aktivität in Thrombozyten erklären [73]. Spätere Studien, in denen u.a. mit Knock-out Mäusen gearbeitet wurde [74], zweifelten diese Ergebnisse jedoch an und allgemein geht man heute davon aus, dass es sich bei hPLSCR1 nicht um das Protein handelt, welches für das Scrambling verantwortlich ist. Um den schnellen Verlust der Lipid-Asymmetrie zu ermöglichen, ist wahrscheinlich mehr als ein Protein nötig. Dutzler et al. identifizierten 2014 ein Protein aus der TMEM16-Familie als möglichen Kandidaten, nämlich nhTMEM16 [75]. Das Protein stammt aus dem Pilz *Nectria haematococca* und fungiert als Ca^{2+} -aktivierte Lipid-Scramblase. Das Protein ist verwandt mit dem bei Säugern vorkommenden Cl^- -Kanal TMEM16A, jedoch ist nhTMEM16A im Gegensatz zu den bei Säugern vorkommenden Proteinen nicht glykosyliert. Die Sequenzhomologien in der transmembranen Domäne liegen bei 39 bis 42% [75]. Inwiefern die von Butzler erzielten Ergebnisse auf Säugerzellen zu übertragen sind bzw. ob es sich bei der in Erythrozyten vorkommenden Scramblase ebenfalls um ein Protein der TMEM16-Familie handelt, bleibt abzuwarten.

I.5.4 Gardos-Kanal / transmembrane K^+ -Verteilung

Der Gardos-Kanal ist in der Plasmamembran humaner Erythrozyten exprimiert [76]. Es handelt sich um einen Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanal [77, 78], der bei hohem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt aktiviert wird. Die Aktivierung des Gardos-Kanals führt zu einer Hyperpolarisierung der Membran [77]. Es kommt zu einem Ausstrom von KCl und osmotisch gebundenem H_2O [76, 79]. Folge ist ein Schrumpfen der Zellen.

Humane Erythrozyten verfügen über vier Transportwege, die dazu dienen, die transmembrane Verteilung der K^+ -Ionen zu realisieren (s. Abb. 11):

- 1) Na^+/K^+ -ATPase: Sie nutzt die bei der Hydrolyse von ATP freigesetzte Energie zum Aufbau eines Kationengradienten.
- 2) $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransporter: Bei diesem Molekül handelt es sich um einen elektroneutralen Transporter.
- 3) K^+/Cl^- -Cotransporter: Dieser Transporter reagiert sensitiv auf pH und das Zellvolumen.
- 4) Unspezifischer Kationenkanal / Gardos-Kanal.

Bei der Glykolyse wird ATP gebildet, welches die Na^+/K^+ -ATPase antreibt. Diese ist verantwortlich für die Ausbildung des elektrochemischen Potentials, welches die treibende Kraft für den Ausstrom der K^+ -Ionen über den Gardos-Kanal darstellt. Zusätzlich ist die bei der ATP-Hydrolyse entstehende Energie verantwortlich für die Ausbildung eines Ca^{2+} -Gradienten über die Membran [80].

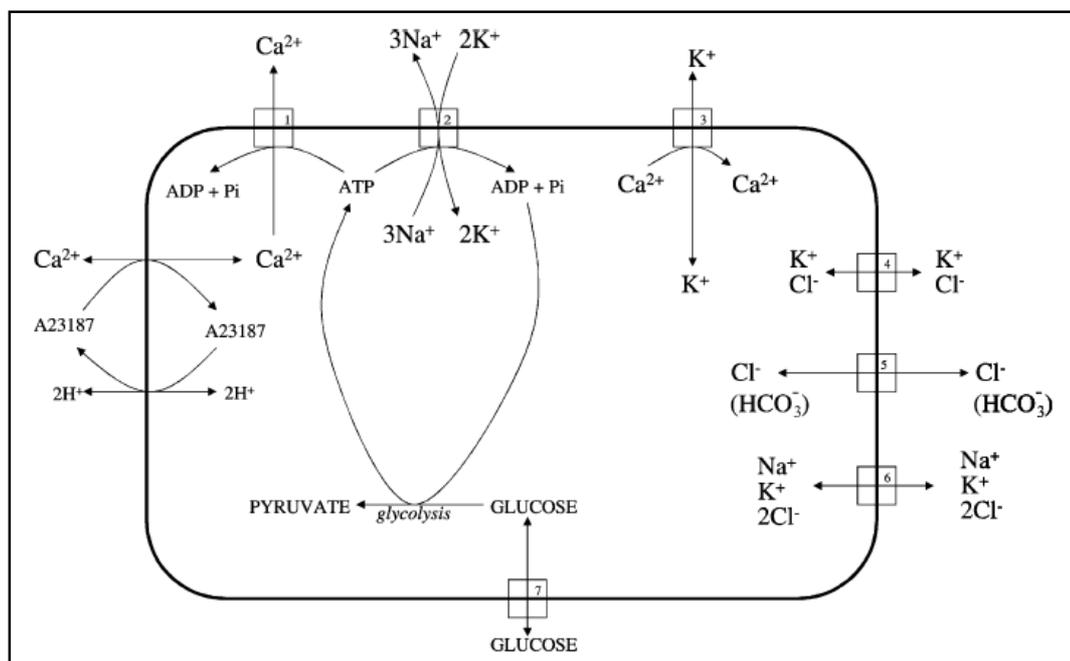


Abb. 11: Ionentransportwege die verantwortlich sind für die transmembrane K^+ -Verteilung. Dargestellt sind die Ca^{2+} -ATPase (1), die Na^+/K^+ -ATPase (2), der Gardos-Kanal (3), der K^+/Cl^- -Cotransport (4), Bande 3 (5), der $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (6), der Glukose-Transporter (7), sowie der Ca^{2+} -Transport mittels A23187. Aus: [80].

Der Gardos-Kanal besteht aus einem Homotetramer aus sechs transmembranen Polypeptid-Domänen (s. Abb. 12). Die Region zwischen den Membrandomänen s5

und s6 enthält die Porenregion. Carbonyl-Sauerstoffatome vermitteln die K^+ -Selektivität [81].

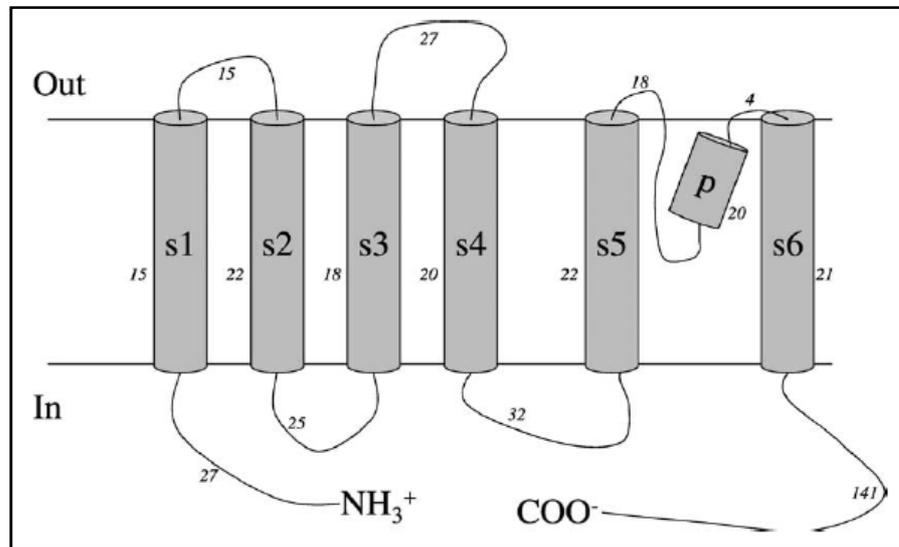


Abb. 12: Schematische Darstellung der monomeren Untereinheit des Gardos-Kanals. s1 bis s6 stellen die Transmembrandomänen dar, p die Porenregion mit Selektivitätsfilter. Aus: [80].

Humane Erythrozyten verfügen mit 100-140 mmol/l über einen hohen Gehalt an intrazellulärem K^+ [20]. Es wird angenommen, dass dieser hohe Gehalt an K^+ -Ionen einen inhibitorischen Effekt auf die Scramblase ausübt und ihre Aktivität unterdrückt wird. Demnach würde das Ca^{2+} -induzierte Scrambling durch das Öffnen Ca^{2+} -sensitiver K^+ -Kanäle weiter getriggert, da es zu einem Verlust des Scramblase-inhibierenden K^+ kommt [20]. Die der Aktivierung der Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanäle folgende Hyperpolarisierung könnte verantwortlich sein für den inhibitorischen Effekt des K^+ auf das Scrambling, da sie verantwortlich ist für die weitere Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} [58].

Der K^+ -Efflux wird wahrscheinlich begleitet von einer Azidifizierung des Intrazellularraumes. Es ist nicht auszuschließen, dass dies den Scramblingprozess in intakten Zellen beeinflusst [20].

I.5.5 PKC / PMA:

Die Aktivierung der PKC erfolgt in Erythrozyten ähnlich wie in kernhaltigen Zellen, wenngleich das benötigte Ca^{2+} nicht aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern stammt, sondern aus dem Extrazellularraum aufgenommen werden muss.

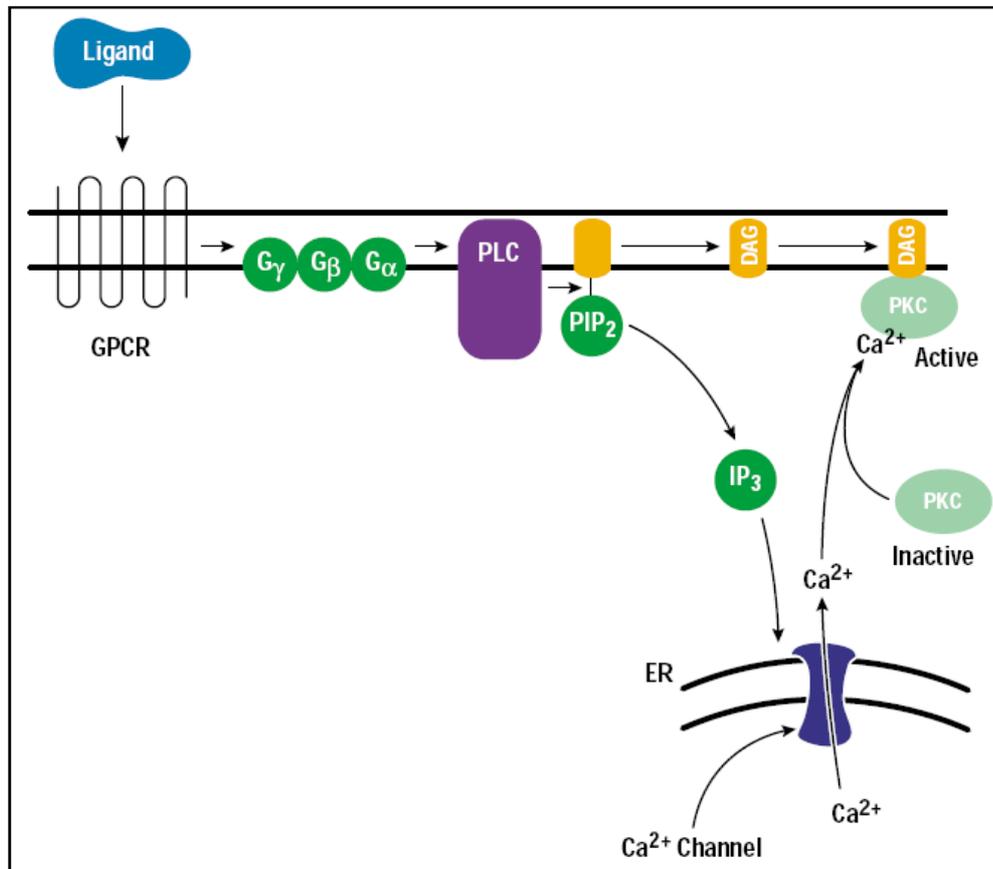


Abb. 13: Aktivierung einer konventionellen PKC in organelhaltigen Zellen. Ein externer Stimulus aktiviert den G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher das G-Protein aktiviert. Dieses aktiviert die Phospholipase C, die PIP₂ zu DAG und IP₃ spaltet. Das IP₃ aktiviert einen Ca²⁺-Kanal im ER, wodurch gespeichertes Ca²⁺ ins Cytoplasma strömt. Der erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Gehalt aktiviert die PKC, die zur Membran transloziert. Bei Erythrozyten wird ein gleicher Mechanismus angenommen, lediglich stammt das intrazelluläre Ca²⁺ nicht aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern, sondern aus dem Extrazellulärraum. Aus: [82].

Erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ führt zur Aktivierung der PKC [83, 84]. Dies hat mehrere Folgen:

- 1) Es erfolgt eine Aktivierung des Phospholipid-Scramblings durch Ca²⁺-unabhängige Mechanismen.
- 2) Es kommt zu einem verstärkten Einstrom von Ca²⁺ in die Zellen.
- 3) Die Ca²⁺-Pumpe zum Auswärtstransport des Ca²⁺ ist aktiver. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass einige Zellen zwar PS-Exposition, jedoch kein erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ zeigen [61].

Andrews et al. konnten zeigen, dass der PKC-regulierte Ca^{2+} -Einstrom über einen regulierbaren Kanal erfolgt, den ω -agatoxin-TK-sensitiven, $\text{C}_{\text{av}}2.1$ -like Ca^{2+} -Kanal, und nicht durch ein Leak [4].

Nicht alle Erythrozyten einer Population sind gleich empfänglich für das PKC-vermittelte Scrambling. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Aktivität der Proteine in Zellen unterschiedlichen Zellalters oder ein unterschiedliches Expressionslevel [61].

I.5.6 Na^+/H^+ -Exchanger (NHE)

Bei den NHE handelt es sich um eine Familie von neun Membranproteinen, die in Zellen von Eukaryoten den Flux von Na^+ - und H^+ -Ionen über die Membran regulieren [85]. Sie sind beteiligt an zahlreichen (patho-)physiologischen Ereignissen wie Regulation des intrazellulären pH-Wertes, Zellproliferation und -migration, Entstehung von Herzerkrankungen, Invasion von Krebszellen, etc.. NHE-Proteine werden im sauren Milieu aktiviert und katalysieren den elektroneutralen Austausch eines Na^+ -Ions gegen ein intrazelluläres H^+ -Ion [85]. Bucki et al. fanden heraus, dass während der Stimulation von Thrombozyten durch Agonisten der intrazelluläre pH-Wert ansteigt und diese Alkalisierung auf eine Aktivierung des NHE zurückzuführen ist [86]. Zudem wurde nachgewiesen, dass ein NHE-vermittelter Einstrom von Na^+ -Ionen an der PS-Exposition beteiligt ist. Dies war jedoch nur der Fall, wenn gleichzeitig eine Änderung im intrazellulären pH-Wert auftrat. Wurde Gramicidin zur Aktivierung der Thrombozyten verwendet, wodurch ein Na^+ -Influx bei konstant bleibendem intrazellulärem pH-Wert erzeugt wird, trat keine PS-Exposition auf [86]. Auch Andrews et al. spekulieren in [4] über eine mögliche Beteiligung des NHE an der PS-Exposition: „PMA aktiviert den humanen Na^+/H^+ -Exchanger. Es könnte sein, dass die Aktivierung der PKC durch PMA dazu führt, dass es zu einem Na^+ -Einstrom über den Na^+/K^+ -Exchanger kommt und der Anstieg des intrazellulären Na^+ -Gehaltes zum Ca^{2+} -Einstrom durch Induktion des Na^+/K^+ -Exchangers führt“ [4].

I.5.7 Zwei Wege zur PS-Exposition

In der Literatur werden immer wieder zwei Wege zur PS-Exposition erwähnt: Ein Ca^{2+} -abhängiger Mechanismus und ein Ca^{2+} -unabhängiger Mechanismus. DeJong et

al. reden bei Letzterem von einer PKC-vermittelten Aktivierung des Phospholipid-Scramblings [61]. Bevers und Williamson beschreiben den Ca^{2+} -unabhängigen Weg in Thrombozyten als „apoptotischen Weg“ (s. Abb.14), der jedoch auf Zellen des hämatopoietischen Systems beschränkt sei [37].

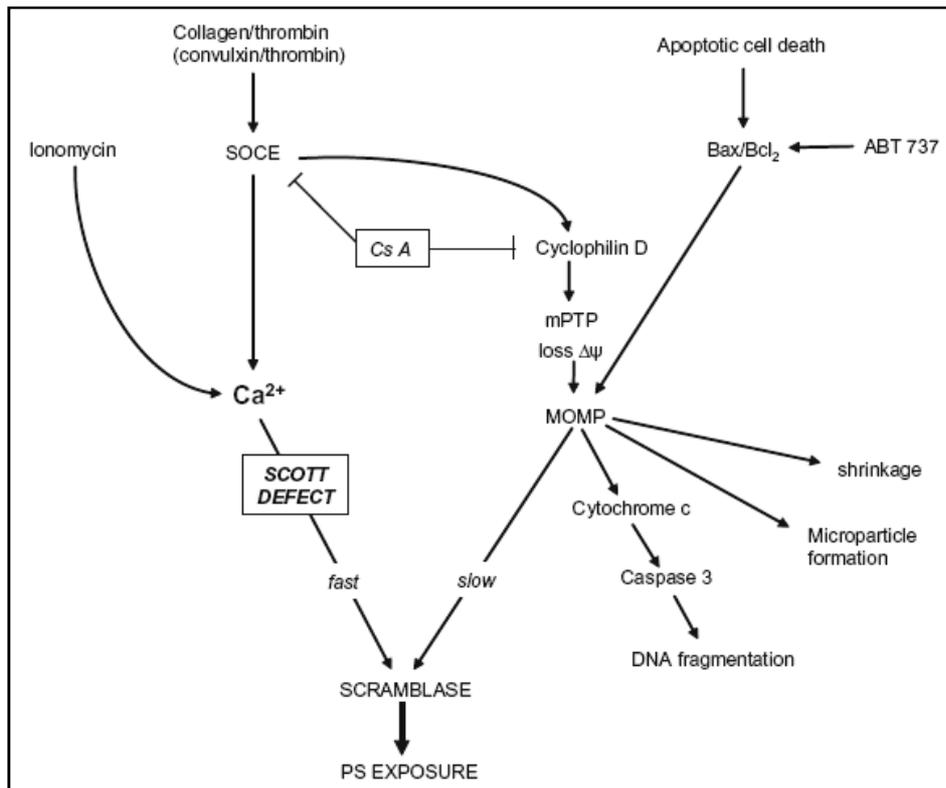


Abb. 14: Verschiedene Signalwege, die in Thrombozyten zur PS-Exposition führen. Aus: [37].

Ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von zwei Wegen liefert die Analyse von Blutzellen von Patienten mit Scott Syndrom. Wird das intrazelluläre Ca^{2+} durch Verwendung von Ionophoren künstlich erhöht, wird die Scramblase in Thrombozyten und Erythrozyten der Patienten nicht aktiviert [87-89]. Die Aktivierung der Scramblase in den Lymphozyten hingegen funktioniert normal. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich beim physiologischen Ca^{2+} -Signalweg, der von aktivierten Thrombozyten und Erythrozyten genutzt wird, nicht um den gleichen Weg handelt, der von apoptotischen Lymphozyten benutzt wird [87].

I.6 Zielstellung der Arbeit

Durch eine Erhöhung ihres intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes sind humane Erythrozyten dazu in der Lage, PS zur Membranaussenseite zu transportieren und somit adhärenente Eigenschaften zu entwickeln [56, 57]. In der Literatur werden zwei Wege diskutiert, die zur PS-Exposition führen sollen: Den Ca^{2+} -abhängigen [56-59] und den Ca^{2+} -unabhängigen Weg [37, 61]. Letzterer wird auch als PKC-vermittelter Mechanismus beschrieben [61]. Um die Hypothese der zwei unterschiedlichen Wege zur PS-Exposition zu untermauern wurden verschiedene Methoden angewendet (Anregung der Erythrozyten mit A23187, LPA und PMA sowie Inhibierung von Scramblase, PKC und K^+ -Efflux), um die Erythrozyten zur PS-Exposition zu aktivieren und generelle Unterschiede im Reaktionsverhalten zu analysieren. Zunächst wurden Kalibrierungsversuche durchgeführt, um für alle Ansätze die besten Versuchsbedingungen zu ermitteln. Dann wurden die Versuche zur Aktivierung/Inhibierung der verschiedenen zellulären Reaktionsmechanismen durchgeführt und analysiert.

In der Literatur werden weitere Faktoren als möglicher Trigger für die PS-Exposition diskutiert (Efflux von K^+ -Ionen [20], Änderung des Zellvolumens [115] und Änderung im intrazellulären pH-Wert [86]). Diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls genauer untersucht.

Erythrozyten einer Population reagieren unterschiedlich auf die verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Vermutung lag nahe, dass das unterschiedliche Reaktionsvermögen im unterschiedlichen Alter der Zellen begründet ist. Hierzu wurden die Erythrozyten einer Population in fünf Fraktionen aufgetrennt und jeweils analysiert. Um die Verlässlichkeit der Separation zu beweisen, wurden jedoch zunächst zahlreiche Kontrollversuche durchgeführt.

II. Material und Methoden

II.1 Erythrozyten

Für die Versuche wurden Erythrozyten gesunder Spender verwendet. Die Blutproben, aus denen die Erythrozyten gewonnen wurden, stammten vom Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes (Antikoagulans: Kalium-EDTA) bzw. vom Institut für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Homburg (Antikoagulans: Citrat). Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme gekühlt und bis zu ihrer Verwendung (i.d.R. am gleichen Tag) bei 4°C gelagert.

II.2 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
4,7-Diphenyl-1,1-O-phenanthrolin Sulfonatlösung	Merck
Acrylamid	Roth
Albumin Standard	Fisher Scientific
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Bromphenolblau	Roth
Calcimycin (A23187)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Chelerythrin	Sigma-Aldrich
D-Glucose	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Drabkin's	Sigma-Aldrich
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham
Eisen(III)-chlorid (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Chemikalienlager UdS
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ferrocyanid	Roth
Glycerin	Sigma-Aldrich

Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma-Aldrich
Methanol	Chemikalienlager UdS
Milchpulver	Roth
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Percoll	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
R5421	Endotherm
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton-X	Sigma-Aldrich
Tween 20	Serva
Zitronensäure	Roth

Tabelle 2: Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Bezugsquelle
Annexin V-FITC	Invitrogen
Annexin V-PE	Invitrogen
Fluo 4, AM	Molecular Probes

Versuche zur Detektion der PS-Exposition:

Auf die Membranaußenseite transportiertes PS kann mittels Annexin V detektiert werden. Annexin V ist ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit einer hohen Affinität für PS und besitzt ein Molekulargewicht von 35 bis 36 kDa. Zur Detektierung im FACS oder Mikroskop muss das Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein. Für die Versuche wurden Annexin V-FITC (maximale Absorption: 495 nm) und Annexin V-PE (maximale Absorption: 488 nm) verwendet [91].

Die Annexin V-Färbung wurde nach den Versuchen zur PS-Exposition durchgeführt. Die Erythrozyten wurden in 0,1 ml Annexin-Bindepuffer resuspendiert, mit 4,5 µl Annexin V versetzt und inkubiert (15 min, Raumtemperatur, im Dunkeln). Für FACS-Analysen konnten die Proben direkt nach der Inkubation verwendet werden, es

wurden vor der Messung noch 400 µl Annexin-Bindepuffer zugegeben. Für Analysen am Mikroskop wurden die Zellen zunächst noch einmal in Annexin-Bindepuffer gewaschen und nochmals in Annexin-Bindepuffer resuspendiert, bevor sie auf den Objektträger gegeben wurden.

Versuche zur Messung des intrazellulären Ca²⁺-Gehalts:

Der Ca²⁺-Indikator Fluo 4 eignet sich hervorragend zur Analyse des intrazellulären Ca²⁺-Gehaltes in Erythrozyten. Der zur quantitativen Ca²⁺-Bestimmung üblicherweise verwendete Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 kann bei Erythrozyten nicht verwendet werden, da die für diesen Farbstoff benötigte Anregungswellenlänge die Autofluoreszenz des Hämoglobins angeregt wird [92]. Der membranundurchgängige Fluoreszenzfarbstoff Fluo 4 wird mit Acetomethyl (AM) verestert und ist nun dazu in der Lage, die Lipidmembran der Erythrozyten zu durchdringen. Intrazelluläre Esterasen spalten die veresterte Gruppe wieder ab und der Farbstoff verliert seine Membrangängigkeit. Reagiert der Farbstoff mit Ca²⁺ bildet sich ein fluoreszierender Komplex, der bei 496 nm detektiert werden kann [93].

Die Fluo 4-Färbung erfolgte vor dem Durchführen der Versuche zum intrazellulären Ca²⁺-Anstieg / zur PS-Exposition. 5 µl gewaschener Erythrozyten werden in 1 ml physiologischer Lösung suspendiert, dann erfolgt die Zugabe von 5 µl Fluo 4, AM. Die Probe wird inkubiert (30 min, 37°C, im Dunkeln) und danach zweimal gewaschen und dann für die Versuche verwendet.

II.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Physiologische Lösung und Abwandlung:

Physiologische Lösung (7,5 mM KCl-Lösung):

NaCl	145 mM
KCl	7,5 mM
HEPES/NaOH	10 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 bei Raumtemperatur	

150 mM KCl:

KCl	150 mM
HEPES/NaOH	10 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 bei Raumtemperatur	

PS-Exposition:

Annexin-Bindepuffer:

HEPES/NaOH	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM
pH 7,4 bei Raumtemperatur	

Änderung des Zellvolumens:

Shrinking solution:

NaCl	145 mM
Saccharose	30 mM
KCl	7,5 mM
HEPES/NaOH	10 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 bei Raumtemperatur	

Swelling solution:

NaCl	130 mM
KCl	7,5 mM
HEPES/NaOH	10 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 bei Raumtemperatur	

Dichtegradientenseparation:

Percoll-Puffer:

Percoll	59,78 g
NaCl (3 M)	3,8 ml
Phosphatpuffer (0,2 M)	5,0 ml
EDTA (0,5 M)	0,1 ml
Glucose (40 g/l)	2,5 ml
PMSF (50 mg/ml)	30 µl
H ₂ O	ad 100 ml

pH 7,4 bei Raumtemperatur

Phosphatpuffer (0,2 M):

Na ₂ HPO ₄	0,2 M
KH ₂ PO ₄	0,2 M

beide Lösungen mischen bis pH 7,4

Retikulozytenanalyse:

ReticCount Reagens:

Fertigprodukt von BD Biosciences

Redox-Aktivitäts-Assay:

Ferrocyanidlösung:

Fertigprodukt der Firma Roth

Reaktionslösung Ferrocyanid-Assay

Natriumacetat	0,3 ml
Zitronensäure	0,3 ml
FeCl ₃ -Lösung	0,15 ml
4,7-Diphenyl-1,1-O-phenanthrolin	
Sulfonatlösung	0,15 ml

Isolierung der Membranproteine:

Puffer 1:

Tris-HCl, pH 7,0	5 mM
EDTA	1 mM

Puffer 2:

Tris-HCl, pH 7,0	0,05 M
NaCl	0,5 M
EDTA	1 mM

Triton-X Puffer (Extraktionspuffer):

Tris, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
Triton-X100	0,5%
PMSF	1 mM

Bestimmung der Proteinkonzentration:

BC Assay Protein quantitation kit der Firma Interchim:

Reagens A
Reagens B
Albumin Standard (2 mg/ml)

Gelelektrophorese:

Sammelgel:

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3,75 ml
30% Acrylamid	2,4 ml
10% APS	75 μ l
TEMED	12 μ l
H ₂ O	ad 15 ml

Trenngel:

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	11,25 ml
30% Acrylamid	13,5 ml
10% APS	225 µl
TEMED	22,5 µl
H ₂ O	ad 45 ml

SDS-Puffer (20x):

Tris/NaOH	7,054 g
H ₂ O	ad 50 ml
pH 6,8 bei Raumtemperatur	

SDS-Probenpuffer:

SDS-Puffer (20x)	2,5 ml
Glycerin	2,5 ml
EDTA (0,5 ml)	1 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau	1 mg
DTT (1M)	2,5 ml
H ₂ O	ad 10 ml
pH 6,8 bei Raumtemperatur	

Western Blot:

5x Transferpuffer:

Glycin	14,9 g
Tris/NaOH	29,0 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 8,3 bei Raumtemperatur	

Arbeitslösung:

5x Transferpuffer	200 ml
Methanol	200 ml
H ₂ O	ad 1 l

PBS-Tween (Waschlösung)

10x PBS	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween 20	1 ml

10x PBS-Puffer:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O	ad 1 l

pH 7,4 bei Raumtemperatur

10x TBS-Puffer:

NaCl	87,66 g
Tris/NaOH	12,11 g
H ₂ O	ad 1 l

pH 7,6 bei Raumtemperatur

TBS-Tween:

10x TBS	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween 20	1 ml

Blockinglösung:

Milchpulver	1 g
PBS-Tween	100 ml

Primärantikörper (von Antibodies-Online):

Erythroid Membran Protein 4.1 (EPB41),
Rabbit anti-Human Polyclonal,
Konzentration: 1 µg/ml in Blockinglösung

Sekundärantikörper (von Lifetechnologies):

Anti-Rabbit IgG, (whole molecule)-Peroxidase,
Polyclonal Antibody,
Verdünnung 1:16.000 in Blockinglösung

II.4 Verwendete Geräte

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Eppendorf 5415D, Eppendorf AG, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos, Heraeus, Deutschland
Ultrazentrifuge Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, USA
Hämatokritzentrifuge TH21, MLW, DDR

Waagen:

BL1500, Sartorius, Deutschland
LA230P, Sartorius, Deutschland

Photometer:

UVmini1240, Shimadzu, Japan

Durchflusszytometer:

FACScalibur, Becton Dickinson, USA
Software: CellQuest Pro, Becton Dickinson Biosciences, USA

Mikroskop:

Eclipse TE2000-E. Nikon Corporation, Japan
Kamera: CCD77, Visitron Systems GmbH, Deutschland
Monochromator: HighSpeed Polychromator System, Visitron Systems GmbH
Imaging Software: MetaVue, Visitron Systems GmbH

Konfokalmikroskop:

LSM 510 META, Carl Zeiss AG, Deutschland

Gelelektrophorese und Western Blot:

Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, USA

Durchlichtscanner:

Power Look III, UMAX Systems GmbH, Deutschland

Software: VueScan, Hamrick Software, USA

Bildbearbeitungssoftware: ImageJ

II.5 Methoden

II.5.1 Isolierung der Erythrozyten:

1 ml Vollblut wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (2000 g, 5 min, Raumtemperatur). Der Überstand, inklusive Leukozytenfilm, wurde abgesaugt. Das Erythrozyten-Pellet wurde mit 1 ml physiologischer Lösung versetzt, gevortext und erneut abzentrifugiert (2000 g, 5 min, Raumtemperatur). Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die gereinigten Erythrozyten mit 1 ml physiologischer Lösung versetzt und -sofern sie nicht direkt für Versuche verwendet wurden- bei 4°C gelagert.

II.5.2 Versuche zur Analyse der PS-Exposition / des Ca²⁺-Gehaltes:

Induktion der PS-Exposition mit A23187, LPA und PMA:

1 µl gewaschener, pellettierter Erythrozyten wurde in 1 ml physiologischer Lösung resuspendiert. Dies entspricht einem Hämatokrit von 0,1%. Es folgte die Zugabe von 2 mM CaCl₂ und dann des jeweiligen Aktivators (A23187 oder PMA). Bei den Versuchen mit LPA erfolgte zuerst die Zugabe der Substanz und erst danach erfolgte die Zugabe von 2 mM CaCl₂. Erfolgt die Zugabe von LPA in eine bereits Ca²⁺-haltige Lösung, findet keine Reaktion statt. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (25.000 g, 30 s, Raumtemperatur), mit 1 ml physiologischer Lösung mit 2 mM CaCl₂ versetzt und gevortext, erneut abzentrifugiert (25.000 g, 30 s, Raumtemperatur). Die weiteren Arbeitsschritte unterschieden sich je nachdem, ob die PS-Exposition oder der Ca²⁺-Gehalt analysiert

wurde. Für die Analysen zur PS-Exposition wurde das Pellet mit Annexinbindepuffer versetzt, damit anschließend die Inkubation mit Annexin V erfolgen konnte. Für die Analyse des Ca^{2+} -Gehaltes wurden die Zellen mit physiologischer Lösung mit 2 mM CaCl_2 versetzt.

Inhibierung der PS-Exposition mit R5421 und Chelerythrin:

1 μl gewaschener, pellettierter Erythrozyten wurden in 1 ml physiologischer Lösung mit 2 mM CaCl_2 versetzt. Es folgte die Zugabe von R5421 / Chelerythrin, dann wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden einmal in physiologischer Lösung mit 2 mM CaCl_2 gewaschen (siehe oben) und dann in 1 ml physiologischer Lösung resuspendiert. Dann erfolgte die Induktion der PS-Exposition mit A23187, LPA oder PMA wie oben beschrieben.

Inhibierung des K^+ -Effluxes (Gardos-Kanals, Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanals):

Die gewaschenen Erythrozyten wurden in der jeweiligen KCl-Lösung mit einem KCl-Gehalt von 7,5 mM (physiologische Lösung) bzw. 150 mM KCl resuspendiert, dann wurden die Versuche mit A23187, LPA und PMA wie oben beschrieben durchgeführt.

II.5.3 Änderung des Zellvolumens:

Schrumpfen / Schwellen der Erythrozyten:

Zum Schrumpfen der Zellen wurden die gewaschenen Erythrozyten in „Shrinking Solution“ inkubiert. Durch die Zugabe von 30 mM Saccharose ist die Osmolarität der Lösung höher, wodurch es zum Schrumpfen der Zellen um ca. 10% kommt.

Sollten die Zellen anschwellen, wurden sie in physiologische Lösung mit verringertem NaCl-Gehalt gegeben. In dieser Lösung schwellen die Erythrozyten um ca. 10% an.

Bestimmung des Zellvolumens:

a) Bestimmung des Zellvolumens durch Ablesen des Forward Scatter am FACS

b) Bestimmung des Zellvolumens durch die Trocknungs-Methode:

Es wurden Erythrozyten verwendet, die mit A23187, LPA oder PMA inkubiert wurden bzw. nach Dichte separierte Zellen. Es wurden jeweils mehrere separat angesetzte Proben in einem Reaktionsgefäß gepoolt, um Proben mit einem Hämatokrit von 10% zu erhalten. Die Proben wurden abzentrifugiert (20.000 g, 7 min, 4°C), anschließend wurde das Reaktionsgefäß zerschnitten, sodass nur noch der Teil, der das Pellett enthielt, vorhanden war. Dieser Teil wurde gewogen, dann wurde er getrocknet (90°C, 24 h) und schließlich erneut gewogen. Das Zellvolumen wurde folgendermaßen errechnet:

$$\text{Relatives Zellvolumen} = \frac{\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Trockengewicht}}$$

II.5.4 Änderung des intrazellulären pH-Wertes

Für die Versuche wurden Erythrozyten einmal für 30 min in physiologischer Lösung inkubiert (pH 7,4 , Kontrolle) und einmal in physiologischer Lösung mit pH 8,0. Dann wurden die Versuche mit A23187, LPA und PMA wie beschrieben in physiologischer Lösung mit dem jeweiligen pH durchgeführt.

II.5.4 Dichteseparation der Erythrozyten nach Zellalter

Percoll-Separation der Erythrozyten:

Die gewaschenen Erythrozyten wurden zur Percoll-Lösung gegeben (Hämatokrit 15 %), zentrifugiert (33.000 g, 20 min, 4°C) und zu fünf Fraktionen abgesaugt. Fraktion 1 enthält die jüngsten Zellen inklusive Retikulozyten, Fraktion 5 enthält die ältesten Zellen. Die Zellen wurden jeweils noch dreimal in physiologischer Lösung gewaschen und konnten anschließend für weitere Versuche verwendet werden.

Retikulozytenanalyse:

Jeweils 5 µl der nach Dichte separierten Zellen wurden in 1 ml Retic-COUNT Reagens suspendiert und inkubiert (30 min, Raumtemperatur, im Dunkeln). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen umgehend im FACS analysiert.

Redox-Aktivitäts-Assay

Die gewaschenen Erythrozyten wurden in der Ferrocyanidlösung resuspendiert (Hämatokrit 1%) und inkubiert (30 min, im Wasserbad bei 37°C). Die Probe wurde abzentrifugiert und 0,9 ml des Überstandes wurden in die vorbereitete Reaktionslösung pipettiert. Die Probe wurde erneut inkubiert (10 min, 23°C, im Dunkeln) und anschließend bei 535 nm am Photometer analysiert. Die erhaltene optische Dichte wird mit dem Faktor 0,145 multipliziert und ergibt den in der Lösung vorhandenen Gehalt an Ferrocyanid in μM [90].

Isolierung der Membranproteine:

Die Erythrozyten wurden in einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendiert und abzentrifugiert (7000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Zum Pellet wurden 10 Volumen Puffer 1 zugegeben, die Probe wurde inkubiert (20 min, auf Eis) und abzentrifugiert (40.000 g, 30 min, 4°C). Der Schritt wurde noch einmal wiederholt, lediglich die Inkubationszeit wurde auf 10 min verkürzt. Der letzte Waschschrift wurde nun noch zweimal mit Puffer 2 wiederholt, abschließend noch einmal mit Puffer 1. Die entstandenen Ghosts wurden in Triton-X Puffer inkubiert (über Nacht, 4°C).

Am nächsten Tag wurden die Proben abzentrifugiert (15.000 g, 20 min, 23°C) und der Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „BC Assay: Protein quantitation kit“ der Firma Uptima verwendet. Für jede zu bestimmende Probe wurden 2 ml der Reagenzlösung verwendet (= Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 gemischt) und 0,1 ml Standard zugegeben. Die Proben wurden inkubiert (30 min, 37°C im Wasserbad) und anschließend abgekühlt (15 min, Raumtemperatur). Danach folgte die Messung der Absorption bei 562 nm am Spektrophotometer (s. Eichgerade Abb. 15).

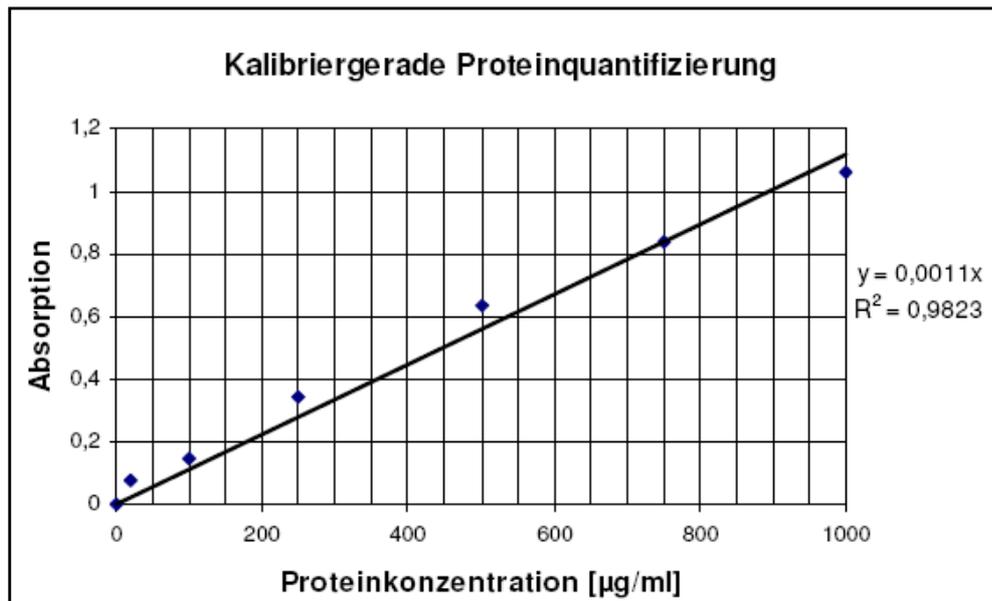


Abb. 15: Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration (in Zusammenarbeit mit Laura Hertz).

Gelelektrophorese:

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem SDS-Gel (Sammelgel: 30 min, 100 V, Trenngel: 60 min, 200 V). Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau. Es wurde der Marker „27-1010“ von Peqlab verwendet.

Western Blot:

Das Gel wurde bei 70 V für 2 h auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde anschließend zweimal in PBS gewaschen und auf einem Schüttler in Blockinglösung geblockt (über Nacht, 4°C).

Es folgte die Inkubation mit den Antikörpern:

Primärantikörper: Inkubation (60 min, Raumtemperatur) in der Antikörperlösung, anschließend dreimaliges waschen in PBS-T (5 min, Raumtemperatur)

Sekundärantikörper: Inkubation und Waschstschritte analog zu Primärantikörper.

Anschließend folgte die Behandlung der Membran mit den ECL-Reagenzien. Die Aufnahme des Films erfolgte für 10 s.

Analyse des Verhältnisses von Bande 4.1a und 4.1b

Das Gel wurde hierzu zunächst mittels eines Durchlichtscanners eingescannt, anschließend wurde die Stärke der Bandenfärbung mittels des Programmes ImageJ ermittelt. Anschließend konnte das Verhältnis der Intensitäten der Banden errechnet werden.

II.5.5 Drabkin's Assay zur Bestimmung der Hämolyserate

Die Erythrozyten wurden wie oben beschrieben mit verschiedenen Konzentrationen an LPA inkubiert, anschließend wurden die Proben zentrifugiert (25.000 g, 30 s, Raumtemperatur) und das Pellett mit 3 ml Drabkins Reagens versetzt. Die Proben wurden inkubiert (15 min, Raumtemperatur) und dann die Absorption bei 540 nm am Spektrophotometer gemessen. Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte durch Ablesen an der Kalibrierungsgerade (s. Abb. 16).

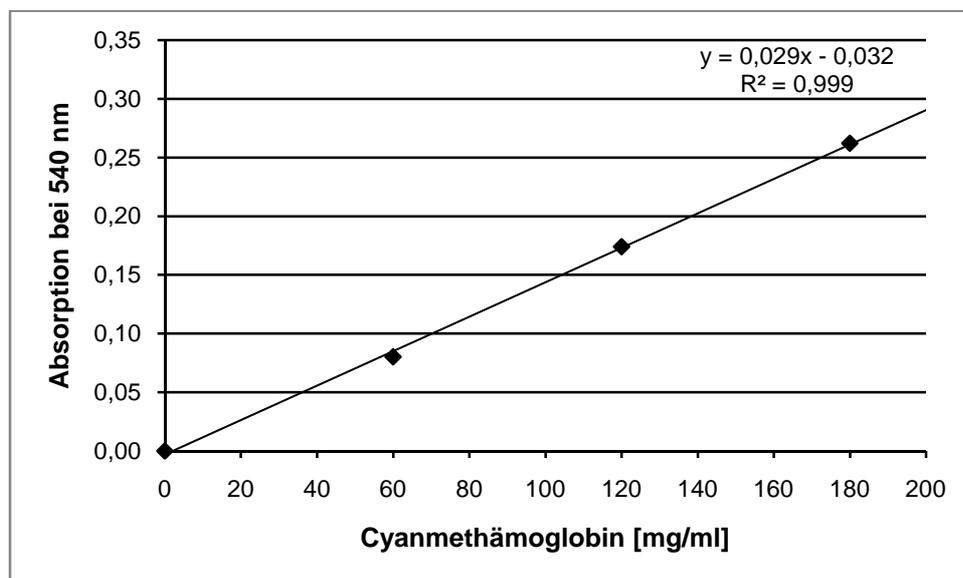


Abb. 16: Eichgerade zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

II.6 Statistik

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- Standardabweichung. Um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde der t-Test (gepaart) durchgeführt. Ergebnisse gelten als signifikant verschieden wenn $p \leq 0,05$ (*) bzw. $p \leq 0,01$ (**).

III. Ergebnisse

III.1 Kalibrierungen

Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes bzw. die Exposition von PS kann durch verschiedene Substanzen induziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Effekte im Wesentlichen mit der Hilfe von A23187, LPA und PMA erreicht. Es galt zunächst, die geeignetste Kombination aus Konzentration des jeweiligen Stoffes und Inkubationszeit zu finden. Ziel war eine größtmögliche PS-Exposition bei vertretbarer Hämolyserate. Alle folgenden Versuche wurden dann mit der jeweiligen Kombination aus Inkubationszeit und Konzentration durchgeführt.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden am Mikroskop untersucht, die genauen Werte wurden mittels FACS-Analyse ermittelt. Abbildung 18 zeigt beispielhaft die Darstellung der FACS-Ergebnisse.

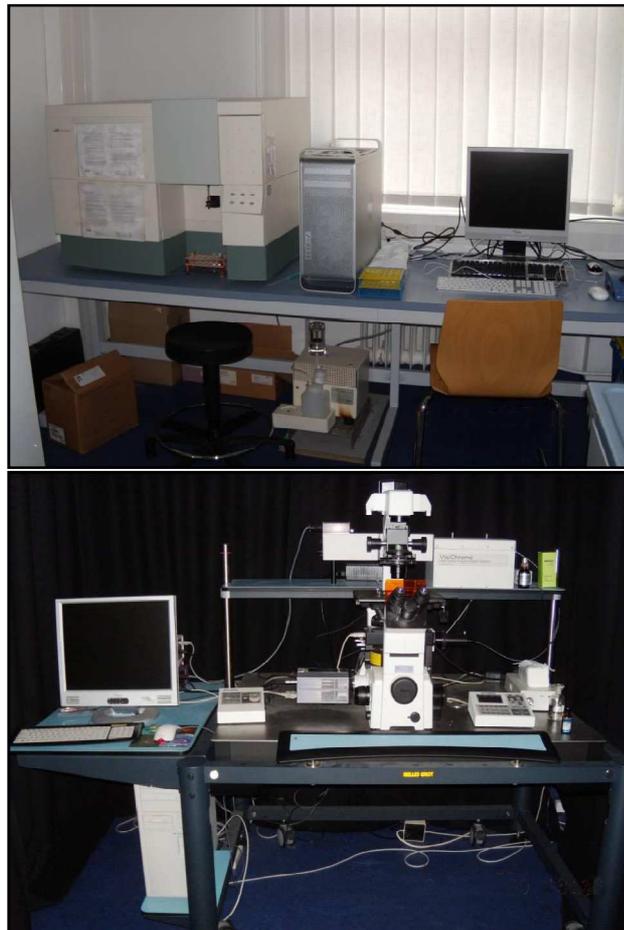


Abb. 17: Verwendetes FACS und verwendetes Mikroskop. Durchflusszytometer FACSCalibur (oben) und Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE-2000E (unten). Aus: [105].

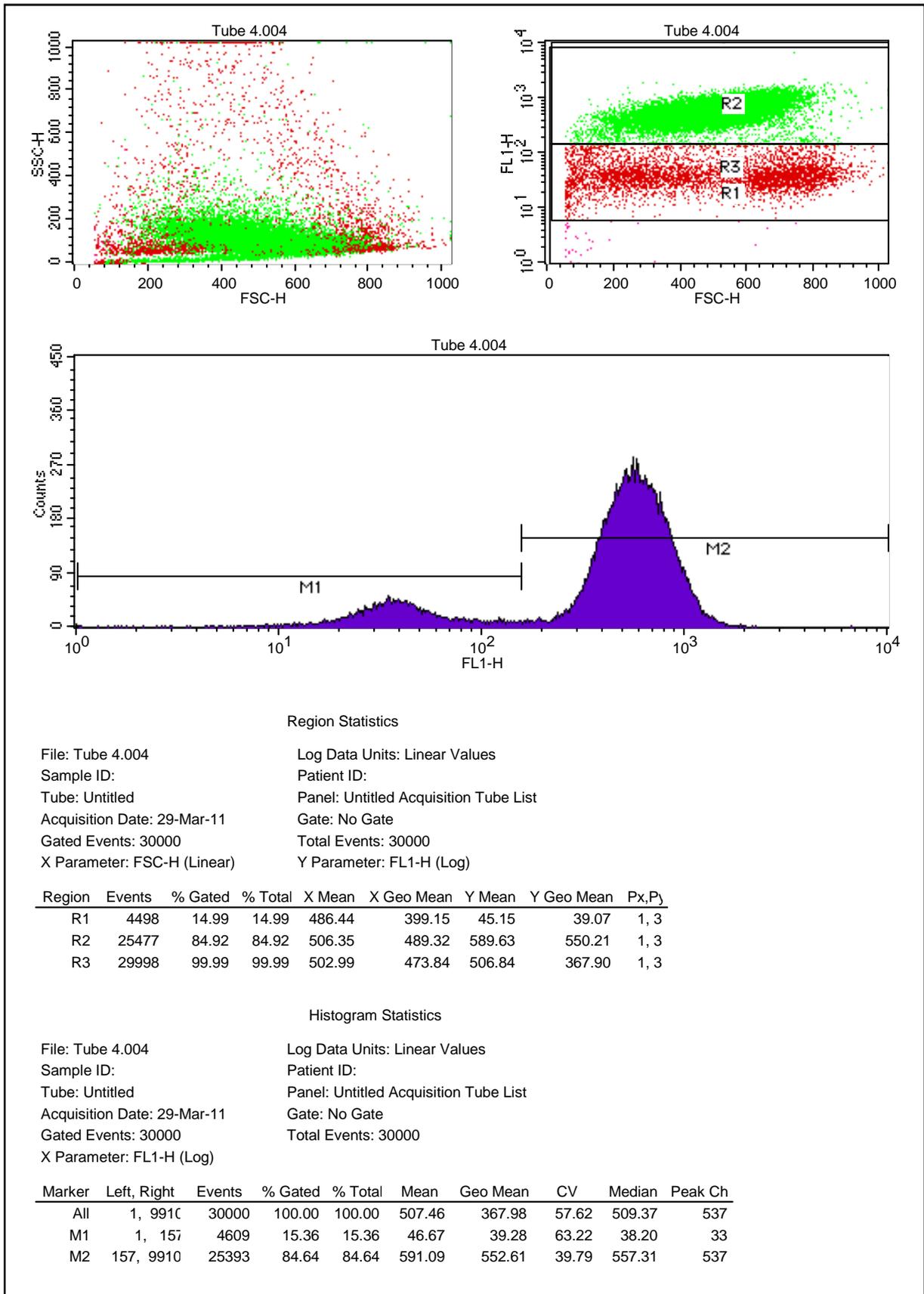


Abb. 18: Darstellung der Ergebnisse einer FACS-Analyse. Beispielhaft gezeigt ist eine Analyse von Erythrozyten mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt. Gegatet wurden die Zellen mit normalem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt (R1 bzw. M1) und die Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt (R2 bzw. M2).

III.1.1 Kalibrierung A23187

A23187 (Ca^{2+} -Ionophor, Calcimycin) erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in intakten Zellen. Es wirkt als Carrier zum Transport von Ca^{2+} und Mg^{2+} , indem es im Lipid-Bilayer eingelagert wird und einen Komplex aus zwei Molekülen A23187 und einem bivalenten Metallkation bildet [94, 95]. A23187 führt zu einem starken Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und zur PS-Exposition [96]. A23187 erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration „künstlich“, d.h. es wird kein physiologisch ablaufender Prozess imitiert.

Abbildung 19 zeigt die Aufnahmen von Erythrozyten, die eine halbe Stunde lang mit $2 \mu\text{M}$ A23187 inkubiert werden. Deutlich zu sehen ist, dass die Erythrozyten unter dem Einfluss von A23187 geschrumpft sind.

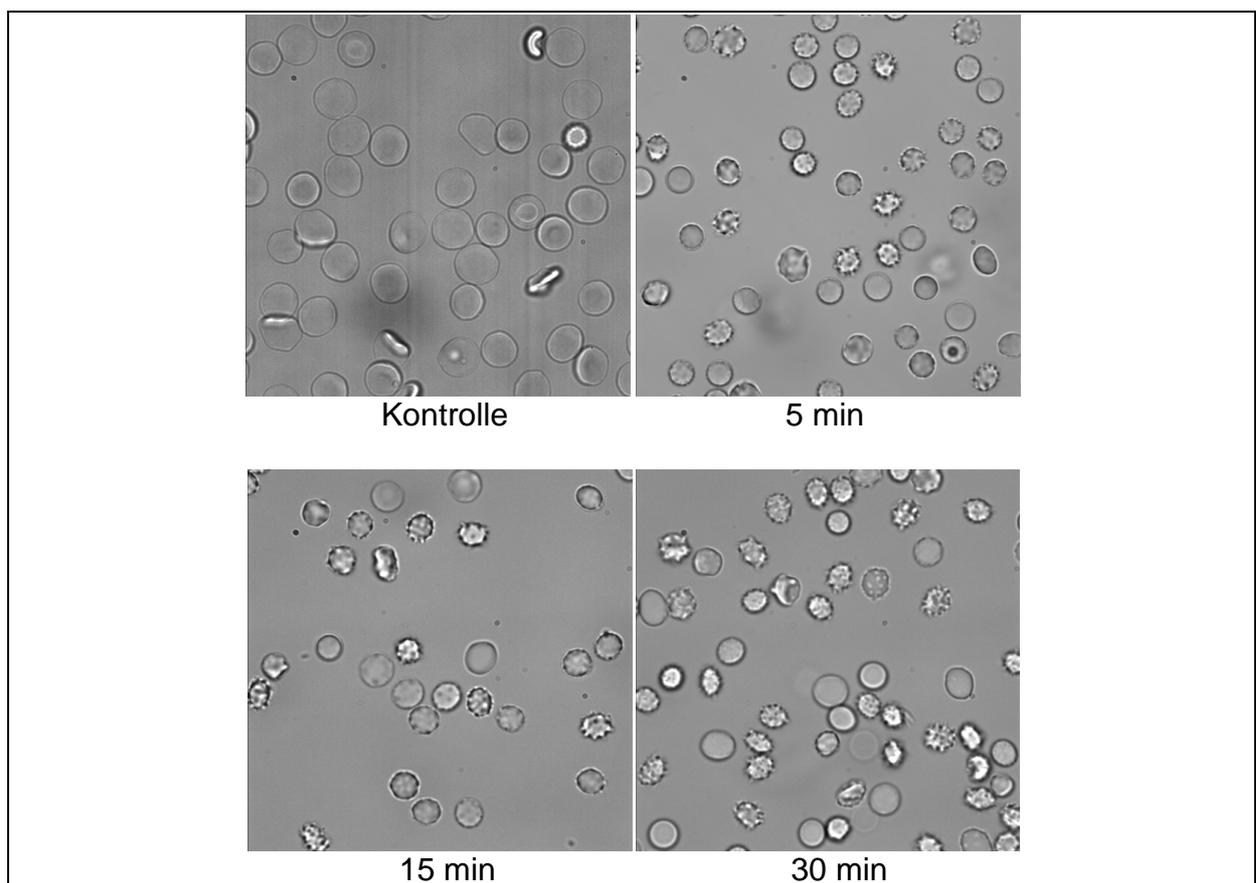


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten während der Inkubation mit $2 \mu\text{M}$ A23187. Nach 5 min sind bereits deutliche Formänderungen im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Während der Inkubationsdauer von 30 min trat keine Hämolyse auf.

Zwischen den für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationen von 1 μM , 2 μM und 5 μM A23187 ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der PS-Exposition. Lediglich die Inkubationszeit hat einen Einfluss. So wurde die größtmögliche PS-Exposition bei einer Inkubationszeit von 30 min erreicht (s. Abb. 20). Längere Inkubationszeiten führten zur Hämolyse.

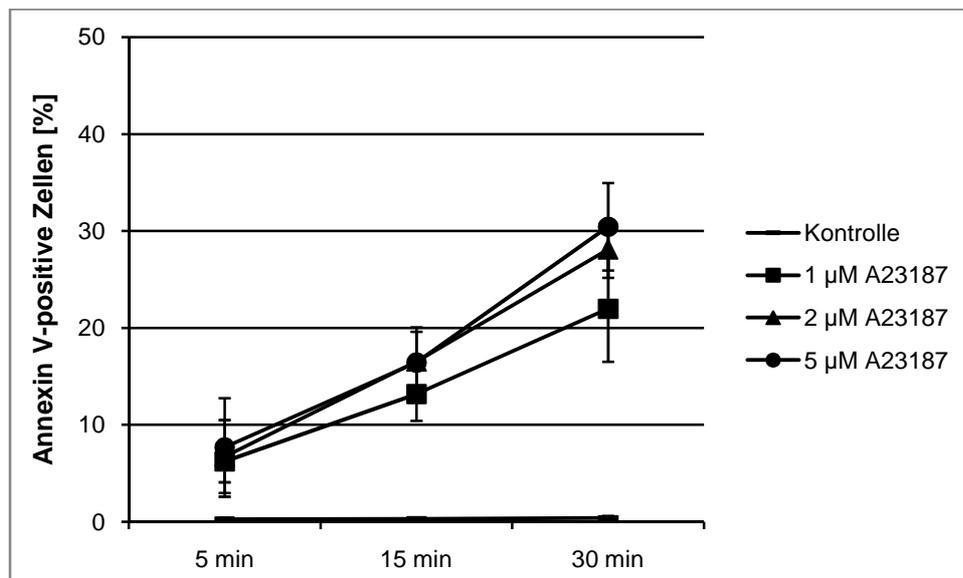


Abb. 20: Kinetik Annexin V-positiver Zellen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an A23187. Mittelwerte +/- S.D. aus 5 Proben

Abbildung 21 zeigt, dass die Population an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} unter allen Versuchsbedingungen gleich groß war.

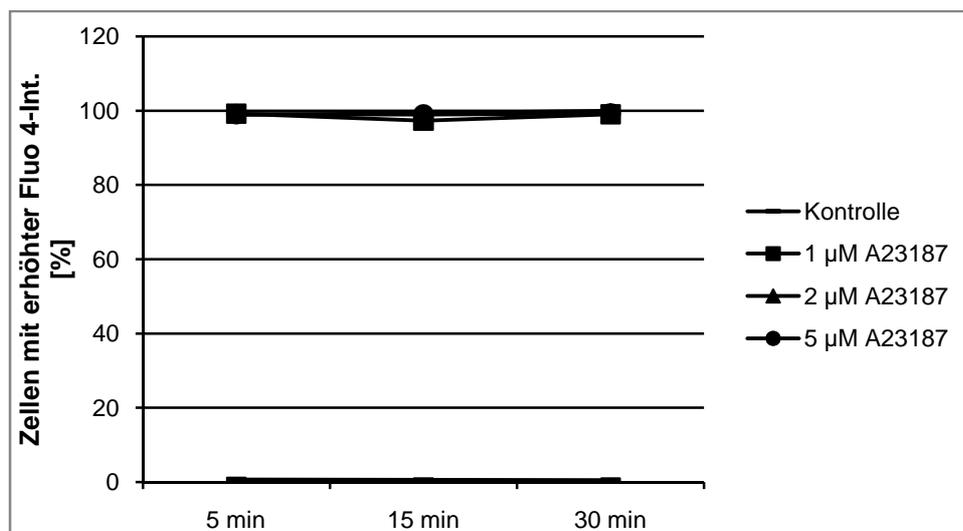


Abb. 21: Kinetik von Zellen mit erhöhter Fluo 4-Int. unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an A23187. Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben

III.1.2 Kalibrierung LPA

Bei LPA handelt es sich um ein Signalmolekül, welches *in vivo* zahlreiche zelluläre Antworten hervorruft (Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion, Invasion, Morphogenese). Zudem ist es beteiligt an der Entstehung von Krebs und Artherosklerose [97]. LPA wird hauptsächlich von aktivierten Thrombozyten produziert, jedoch wird Blutserum-LPA auch von aktivierten Adipozyten, neuronalen Zellen und weiteren Zelltypen sekretiert [97]. Darüber hinaus wird LPA auch während des Koagulationsprozesses hergestellt. Der zugrunde liegende Mechanismus wird jedoch noch kontrovers diskutiert [98]. Der Hauptmechanismus zur Synthese von LPA im Blut umfasst jedoch die Hydrolyse zirkulierender Lysophospholipide [82]. Die Serumkonzentration liegt bei 1-10 μM [98], wobei der Großteil des im Plasma vorkommenden LPA metabolisch und funktionell inert und an Proteine gebunden vorliegt [99]. Dies verhindert spontane Koagulationen im Blutstrom. Es liegt die Vermutung nahe, dass LPA über einen spezifischen Rezeptor in der Erythrozytenmembran wirkt. Eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sowie PS-Exposition sind Folgen [100].

Die Durchführung von Versuchen mit LPA erwies sich zunächst als schwierig, da LPA bereits nach einer relativ kurzen Inkubationszeit zur Hämolyse führt (s. Abb. 22). Da aus hämolysierten Erythrozyten das Hämoglobin freigesetzt wird, eignet sich dies als Nachweis zur Bestimmung der Hämolyserate. Standardmäßig kommt hierfür der Drabkins Assay zum Einsatz, da sich das verwendete ‚Drabkins Reagens‘ zur quantitativen Bestimmung der Hämoglobinkonzentration eignet. Das in der Probe vorhandene Hämoglobin wird durch das im Drabkins Reagens enthaltene Kaliumferricyanid zu Methämoglobin oxidiert. Dieses reagiert mit Kaliumcyanid zu Cyanmethämoglobin, welches seine maximale Absorption bei 540 nm hat. Die bei 540 nm gemessene Absorption ist proportional zur totalen Hämoglobinkonzentration [101] (vgl. Abb. 16).

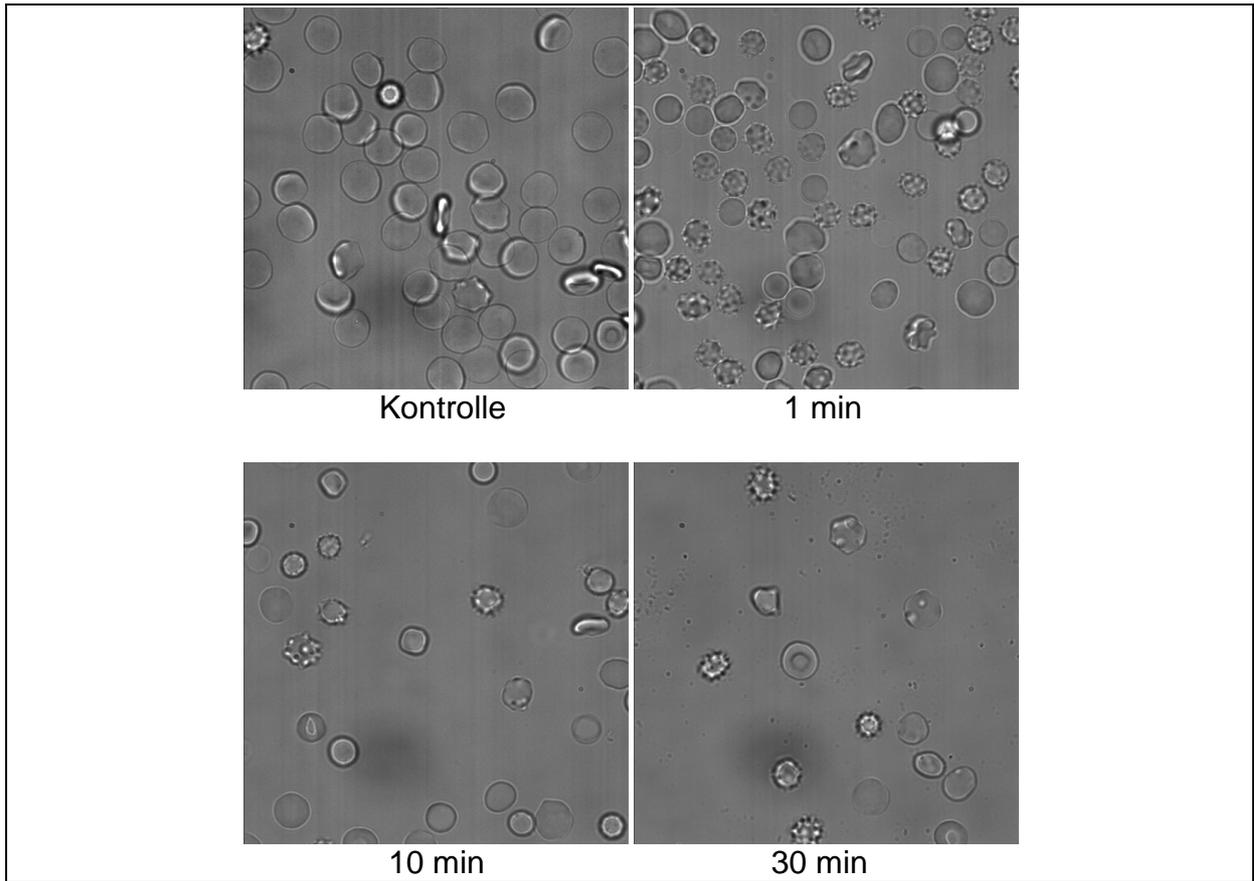


Abb. 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten während der Inkubation mit 2,5 μM LPA. Deutlich zu erkennen ist die im Laufe der Zeit einsetzende starke Hämolyse.

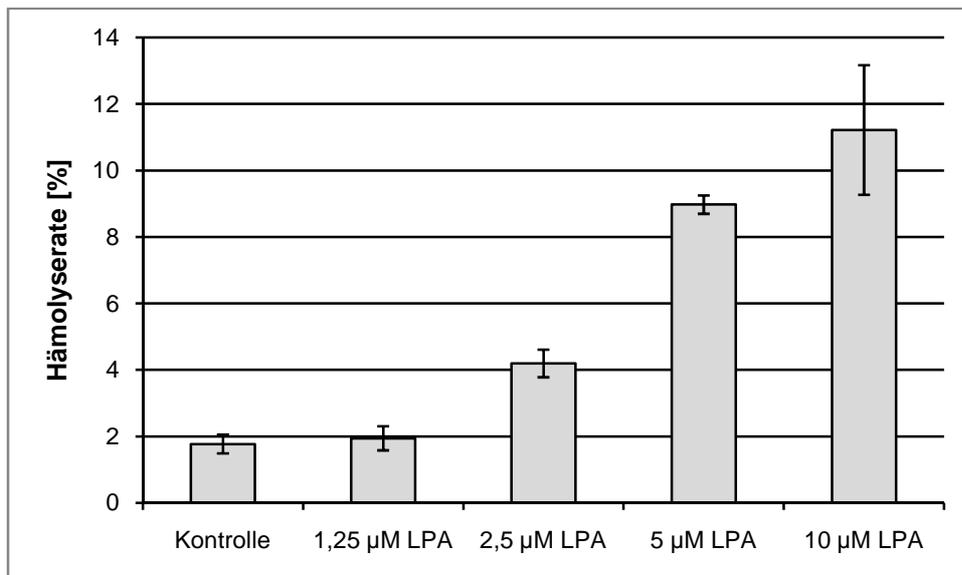


Abb. 23: Hämolyserate der Erythrozyten bei unterschiedlichen LPA-Konzentrationen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 30 s. Mittelwerte \pm S.D. aus 3 Proben

Die bei einer Verwendung von 1,25 μM LPA auftretende Hämolyserate von 1,9% (s. Abb. 23) unterscheidet sich kaum vom Kontrollwert von 1,8%, der bei Inkubation in physiologischer Lösung auftritt. Die mit dieser LPA-Konzentration bei einer Inkubationszeit von 1 min erzielte PS-Exposition ist jedoch viel zu gering (s. Abb. 24). 2,5 μM LPA liefern bei einer Inkubationszeit von 1 min nicht nur die größtmögliche PS-Exposition von 34,2%, sondern mit 4,2% auch eine vertretbare Hämolyserate. Höhere Konzentrationen an LPA führen zu einer starken Hämolyse (vgl. Abb. 23) und liefern infolgedessen auch eine geringere PS-Exposition (vgl. Abb. 24), da die Zellen mit der stärksten PS-Exposition zum Zeitpunkt der Messung bereits hämolysiert sind. Gleiches gilt für eine verlängerte Inkubationszeit.

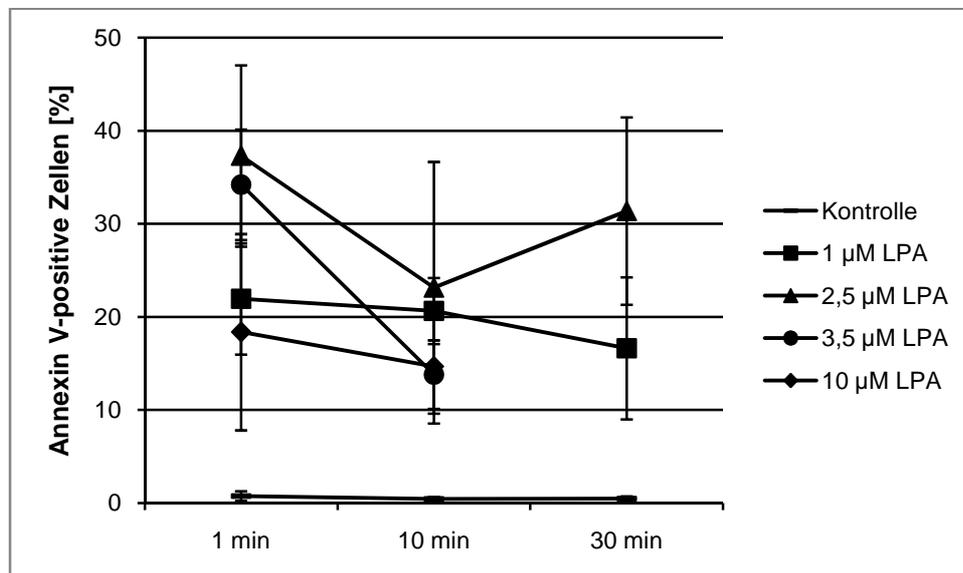


Abb. 24: Kinetik Annexin V-positiver Zellen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an LPA. Die starken Schwankungen der Werte ist zurückzuführen auf die hohe Hämolyserate, ebenso das Fehlen der 30 min-Werte für 3,5 und 10 μM LPA. Mittelwerte \pm S.D. aus 6 Proben.

Die Verwendung von 3,5 μM bzw. 10 μM LPA resultiert zwar in einer größeren Population an Erythrozyten mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt (s. Abb. 25), jedoch ergab das Ergebnis des Hämolyse-Assays, dass diese Daten nicht mehr verlässlich sind, da zum Zeitpunkt der Messung bereits zu viele Zellen hämolysiert waren.

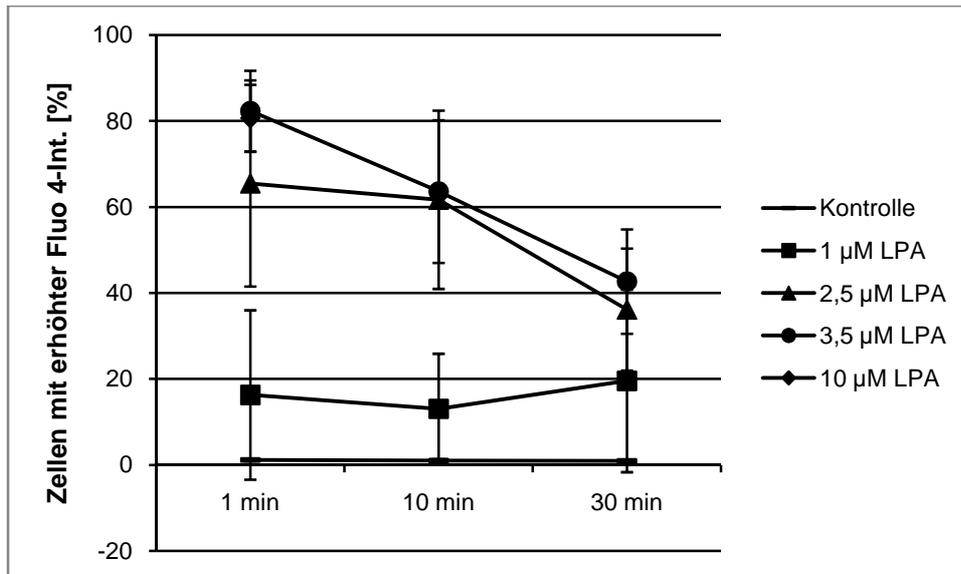


Abb. 25: Kinetik von Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an LPA. Die starken Schwankungen der Werte sind zurückzuführen auf die hohe Hämolyse rate. Mittelwerte +/- S.D. aus 6 Proben.

III.1.3 Kalibrierung PMA

PMA initiiert Diacylglycerol (DAG), den *in vivo* vorkommenden Aktivator der PKC [100]. Durch PMA kommt es zur Aktivierung der PKC, was eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes, sowie eine PS-Exposition zur Folge hat [61, 100].

PMA bewirkt eine starke Formänderung der Erythrozyten, jedoch bei einer Inkubation mit 6 µM praktisch keine Hämolyse (s. Abb. 26).

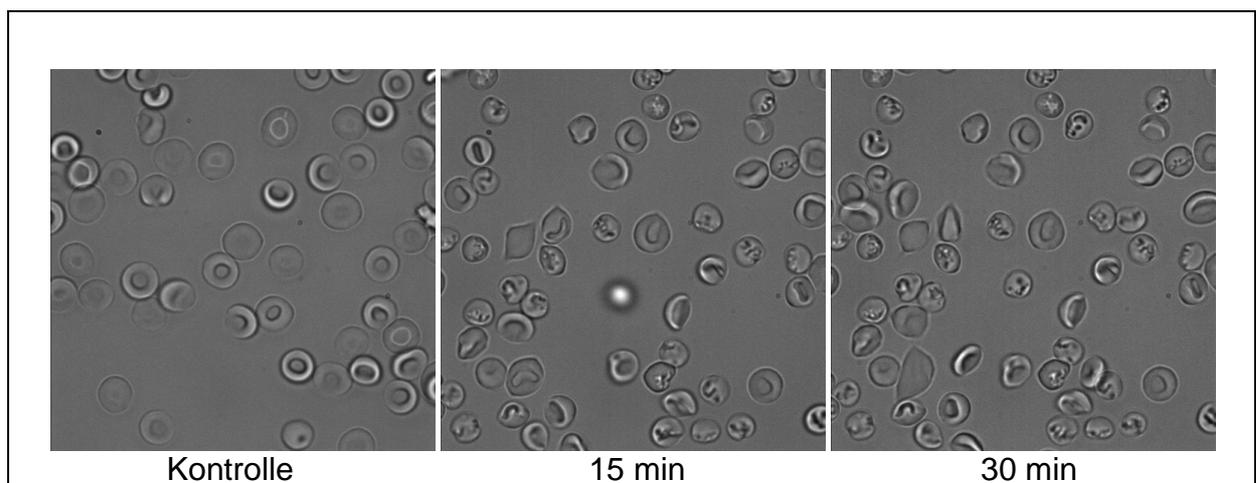


Abb. 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten während der Inkubation mit 6 µM PMA. Die typischen morphologischen Änderungen, die unter dem Einfluss von PMA auftreten sind auf der nach 15 min getätigten Aufnahme bereits gut zu erkennen.

Eine höhere Konzentration an PMA resultiert in einer größeren Gruppe an Erythrozyten mit PS-Exposition (s. Abb. 27). 10 μM PMA lieferten bei einer Inkubationszeit von 30 min die höchste PS-Exposition, jedoch trat bei dieser hohen Konzentration an PMA auch eine leichte Hämolyse auf. Bei 6 μM PMA war dies noch nicht der Fall.

Die Größe der Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt unterscheidet sich signifikant zwischen den PMA-Konzentrationen 1 μM , 3 μM und 6 μM . Ab einer Konzentration von 6 μM ist jedoch kein signifikanter Anstieg mehr erkennbar (s. Abb. 28).

Bei PMA wurde deshalb in allen Versuchen 6 μM verwendet bei einer Inkubationszeit von 30 min.

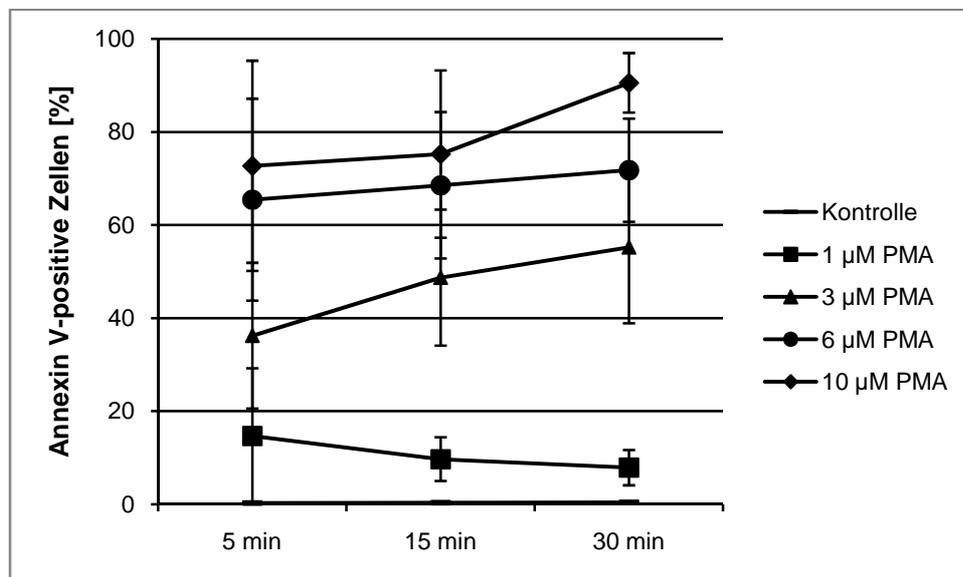


Abb. 27: Kinetik Annexin V-positiver Zellen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an PMA.
Mittelwerte \pm S.D. aus 5 Proben.

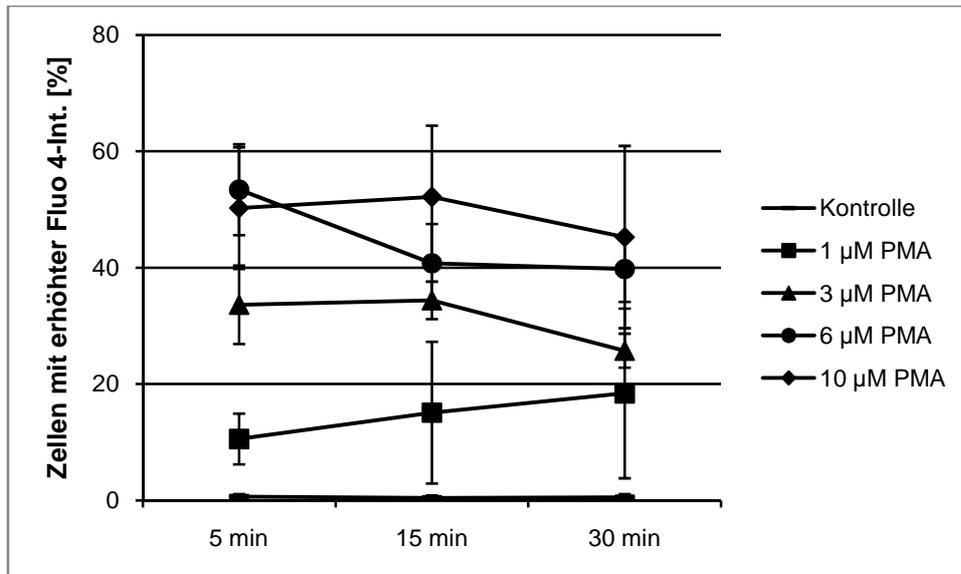


Abb. 28: Kinetik von Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an PMA. Mittelwerte +/- S.D. aus 5 Proben.

III.1.4 Kalibrierung R5421

Bei R5421 (s. Abb. 29) handelt es sich um einen Inhibitor der Scramblase in Thrombozyten und Erythrozyten [102, 103, 104]. Pharmakologie und Wirkmechanismus von R5421 sind jedoch noch unbekannt [103].

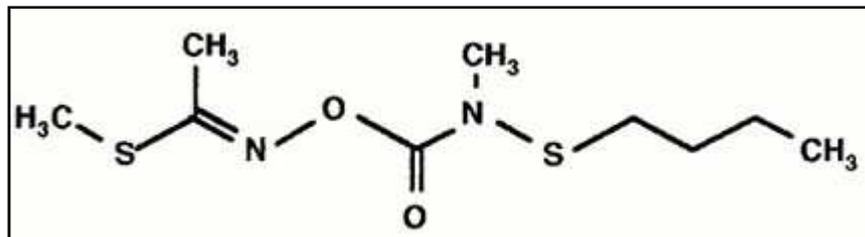


Abb. 29: Strukturformel R5421
(Ethanimidothioic Acid N- [[[(Butylthio)Methylamino] Carbonyl]Oxy]-, Methyl ester).
Aus [103].

Eine Inhibierung der Scramblase mit R5421 hat eine verringerte PS-Exposition zur Folge. Die Kalibrierung für R5421 wurde durchgeführt, um die größtmögliche Inhibition der PS-Exposition zu erhalten, bei gleichzeitig möglichst niedriger Hämolyserate. Abbildung 30 zeigt, dass eine Inkubation mit 100 μM R5421 keinen Einfluss auf die Zellmorphologie oder PS-Exposition besitzt.

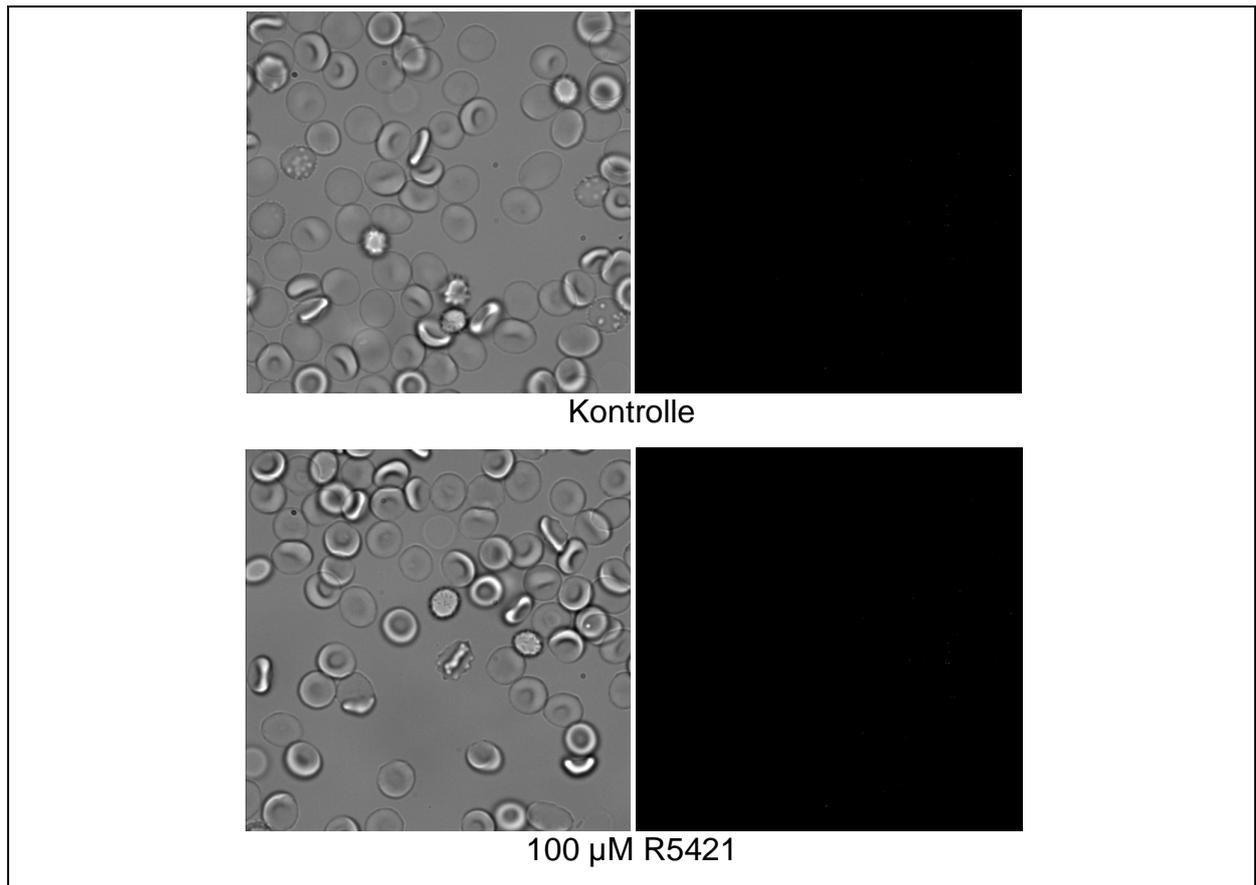


Abb. 30: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen bzw. nach Inkubation mit R5421. Die Fotos auf der linken Seite zeigen jeweils die Durchlichtaufnahme. Durch die Verwendung von R5421 treten keine morphologischen Veränderungen auf. Die Fotos auf der rechten Seite zeigen jeweils die Fluoreszenzaufnahme mit Annexin V-FITC. Nach der Inkubationsdauer von 30 min ist keine PS-Exposition erkennbar.

Nach der Inhibierung mit R5421 wurden die Zellen mit 2,5 µM LPA zur PS-Exposition angeregt. Hierbei wurde das beste Ergebnis bei einer Konzentration des Inhibitors von 100 µM erreicht (s. Abb. 31). Bei höheren Konzentrationen trat eine zu starke Hämolyse auf.

Die Überprüfung der Hämolyse erfolgte unter dem Mikroskop und im Falle von LPA zusätzlich mittels Hämolyse-Assay.

Die Größe der Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt änderte sich durch den Einsatz von R5421 nicht (s. Abb. 32).

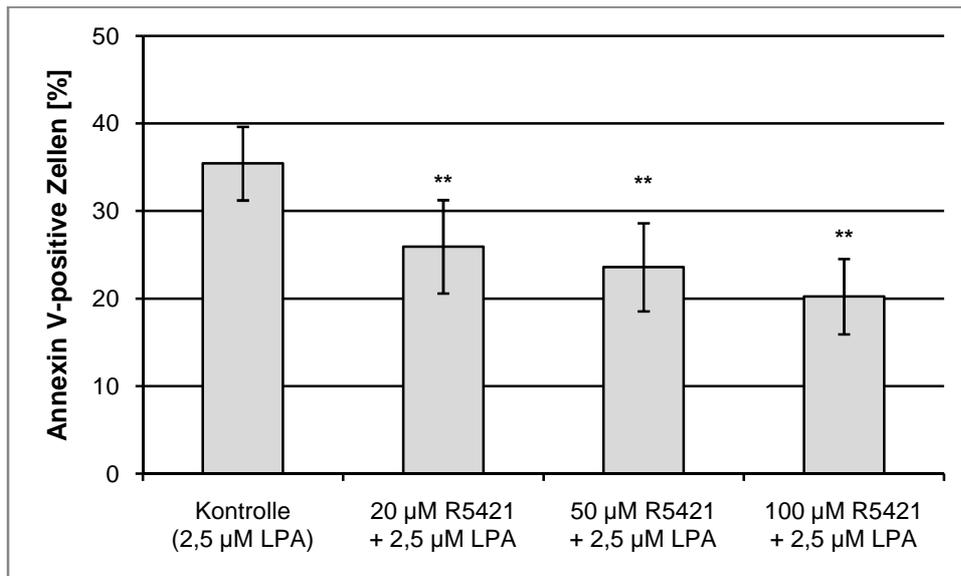


Abb. 31: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit LPA, wenn zuvor die Scramblase mit verschiedenen Konzentrationen an R5421 inhibiert wurde. Die Inkubation mit R5421 erfolgte jeweils für 30 min, die Inkubation mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus 12 Proben, t-Test zur Kontrollprobe, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

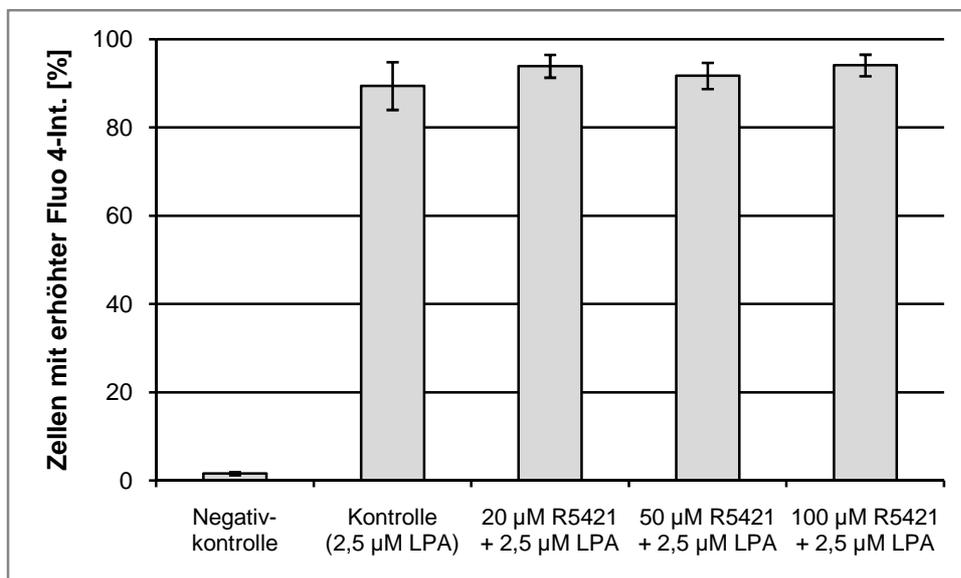
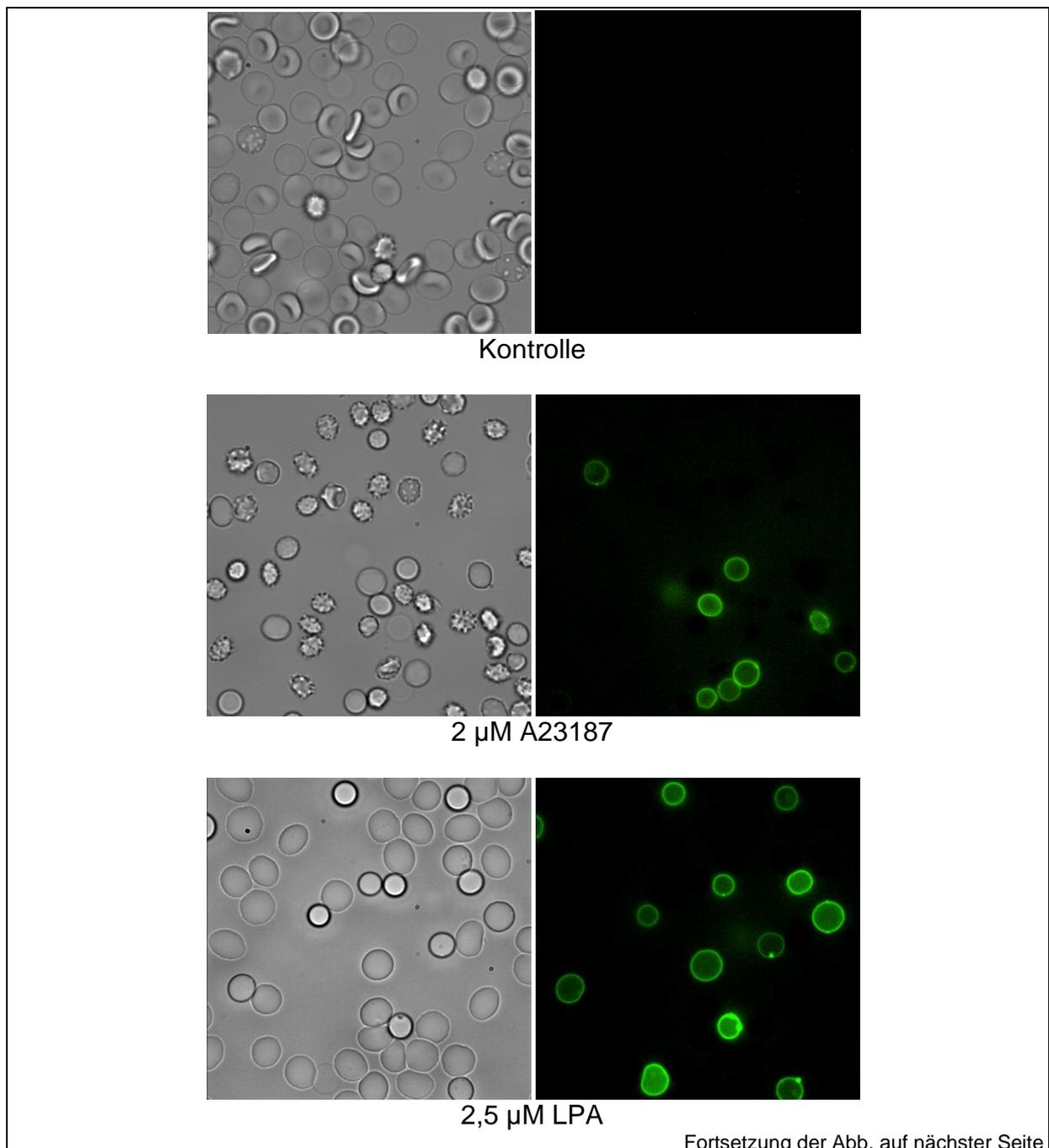


Abb. 32: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit LPA, wenn zuvor die Scramblase mit verschiedenen Konzentrationen an R5421 inhibiert wurde. Die Inkubation mit R5421 erfolgte jeweils für 30 min, die Inkubation mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus 5 Proben, t-Test zur Kontrollprobe, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

III.2 Aktivierung der Zellen mit A23187, LPA und PMA

III.2.1 Analyse von PS-Exposition und Ca²⁺-Anstieg

Die für jede Substanz ermittelten Versuchsbedingungen wurden verwendet, um die verschiedenen Aktivierungswege, die durch Verwendung der jeweiligen Substanzen aktiviert werden, miteinander zu vergleichen.



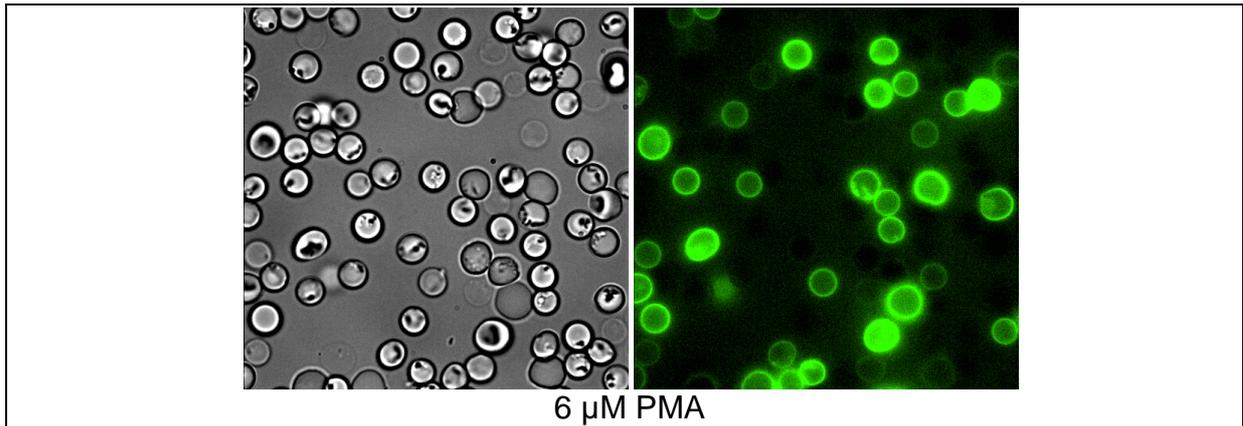


Abb. 33: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen und nach der Inkubation mit 2 μM A23187, 2,5 μM LPA, 6 μM PMA. Die linke Spalte zeigt jeweils Durchlichtaufnahmen. Erkennbar sind die jeweiligen typischen morphologischen Veränderungen, die unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen auftreten. Die rechte Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit Annexin V-FITC. Die Aufnahmen von Kontrolle, A23187 und PMA erfolgten nach einer Inkubationsdauer von 30 min, die Inkubationsdauer mit LPA betrug 30 s.

A23187 führt in 27,9% der Zellen zur PS-Exposition, LPA in 34,3% und PMA in 68,2% (s. Abb. 34). Während sich die Größe der durch A23187 und LPA zur PS-Exposition angeregten Population nicht signifikant unterscheidet, ist diese Population nach Inkubation mit PMA deutlich größer.

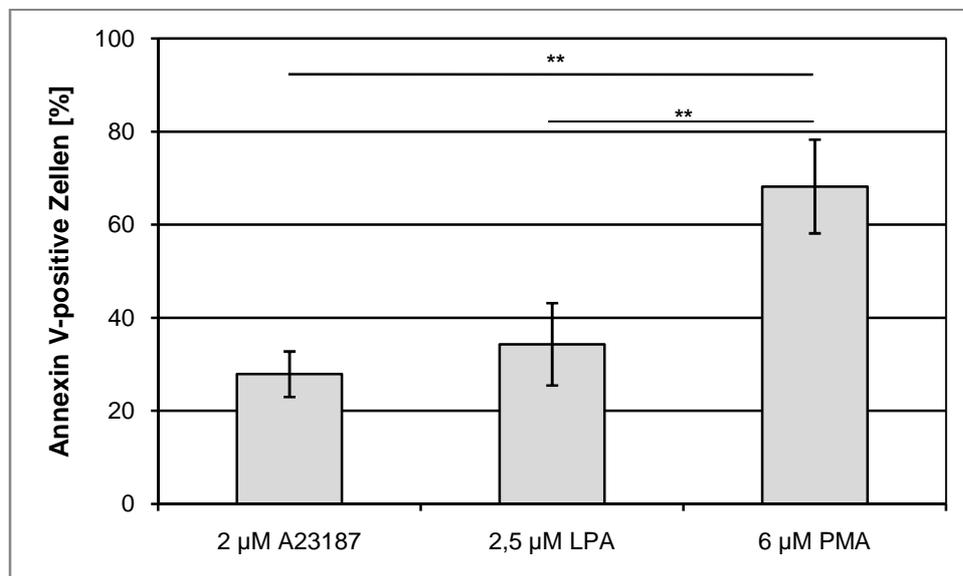


Abb. 34: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 μM A23187, 2,5 μM LPA, 6 μM PMA. Vergleichende Darstellung der Populationsgrößen an Zellen mit PS-Exposition. Die Inkubation mit A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte \pm S.D. aus mind. 17 Proben, t-Test, ** $p \leq 0,01$.

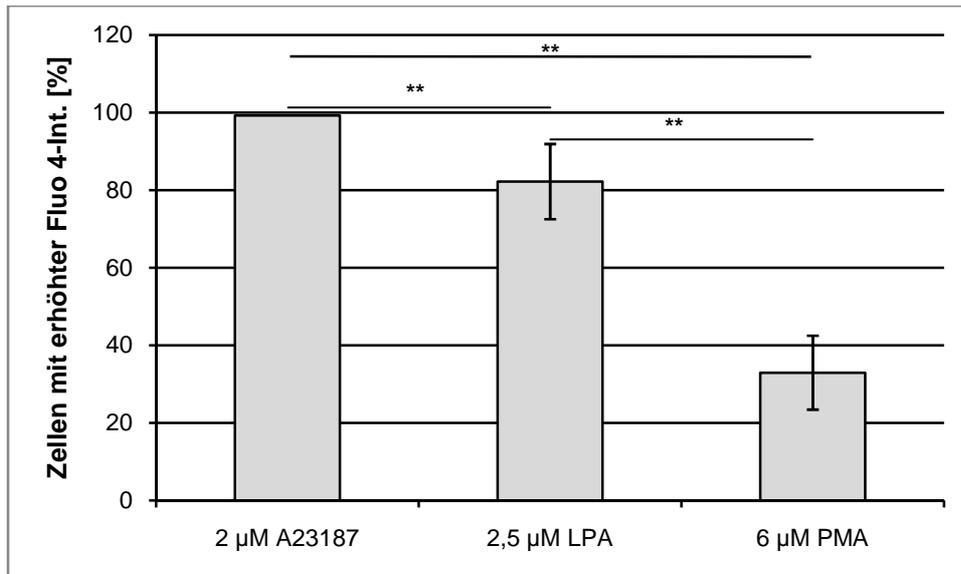


Abb. 35: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA, 6 µM PMA. Vergleichende Darstellung der Populationsgrößen an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt. Die Inkubation mit A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte \pm S.D. aus mind. 13 Proben, t-Test, ** $p \leq 0,01$.

A23187 führt in allen Zellen (99,3%) zu einem erhöhten Gehalt an intrazellulärem Ca^{2+} . Bei LPA sind es noch 82,2% der Zellen, wohingegen nach Inkubation mit PMA nur 32,9% ihr intrazelluläres Ca^{2+} erhöht haben (s. Abb. 35).

III.2.2 Analyse des Zellvolumens nach Verwendung von A23187, LPA und PMA

Es wurde überprüft, inwiefern sich die verwendeten Substanzen A23187, LPA und PMA auf das Zellvolumen auswirken. Hierzu wurde die „Trocknungs-Methode“ (s. „Material und Methoden“) verwendet.

Abbildung 36 zeigt, dass lediglich A23187 einen signifikanten Einfluss auf das Zellvolumen ausübt, wohingegen durch LPA und PMA nur Formveränderungen ausgelöst werden.

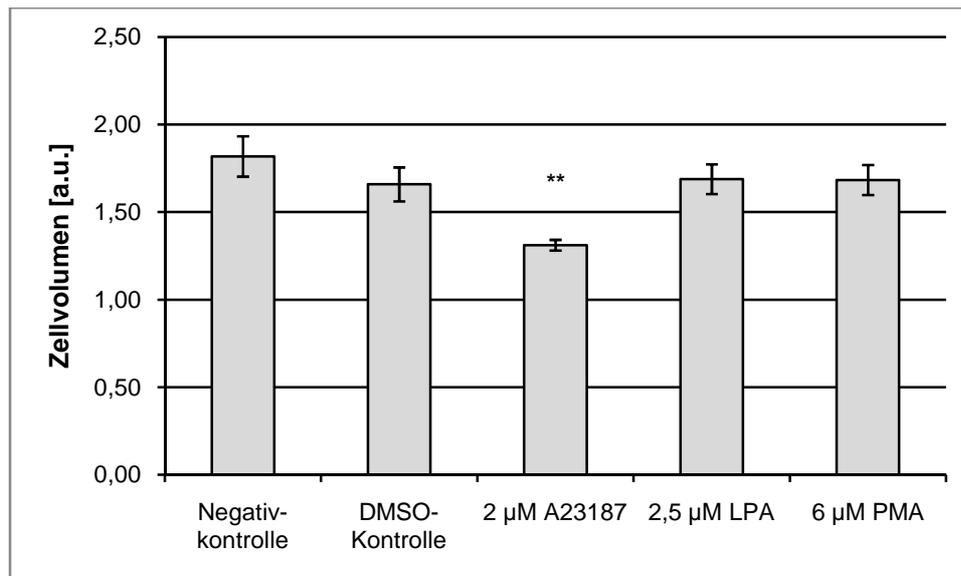


Abb. 36: Durch die Trocknungs-Methode ermitteltes relatives Zellvolumen nach Inkubation mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA, 6 µM PMA. Die Inkubation mit DMSO, A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben, t-Test zur Kontrollprobe, ** p<0,01.

III.2.3 Analyse der PS-Exposition bei gleichzeitiger LPA- und PMA-Aktivierung

Die Überlegung war, dass bei einer gleichzeitigen Aktivierung beider Signalwege (des LPA-induzierten sowie des PMA-induzierten Signalweges) eine erhöhte PS-Exposition im Vergleich zu den Versuchen auftritt, bei denen mit LPA und PMA einzeln gearbeitet wurde. Es kamen verschiedene Versuchsbedingungen zum Einsatz. Einmal wurde erst mit einer der beiden Substanzen inkubiert, die Proben wurden gewaschen und dann erst folgte die Zugabe der zweiten Substanz. In einem weiteren Versuchsansatz wurden beide Substanzen gleichzeitig zu den Erythrozyten zugegeben. Abbildung 37 zeigt jedoch, dass unter keiner der ausprobierten Versuchsbedingungen eine signifikante Erhöhung im Anteil der Erythrozyten, die PS-Exposition zeigen, ermittelt werden konnte.

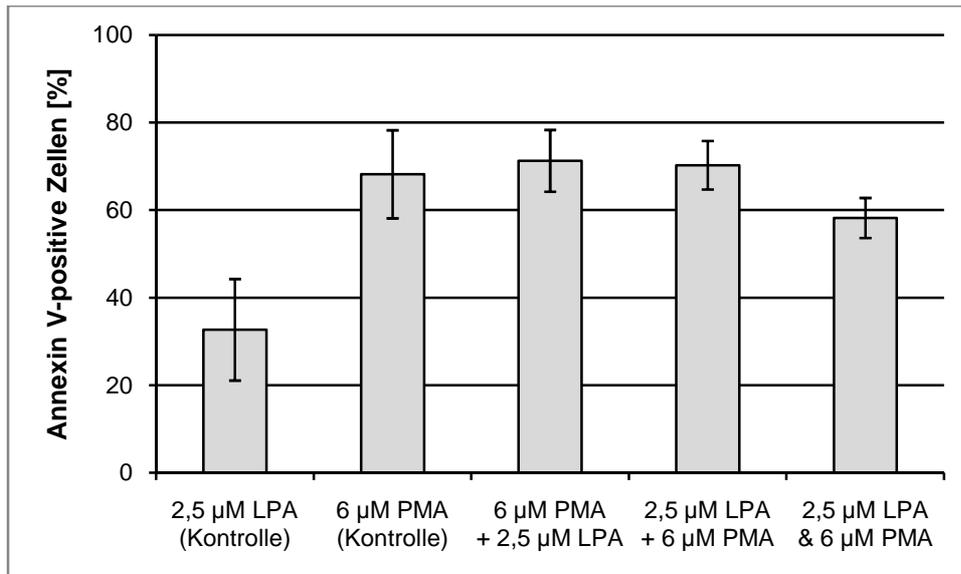


Abb. 37: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit LPA und PMA. Es erfolgte die Inkubation mit LPA für 30 s bzw. PMA für 30 min alleine (Kontrollen, die beiden linken Säulen). Dann erfolgte die Aktivierung mit beiden Substanzen nacheinander (LPA: 30 s, PMA: 30 min) und schließlich die gleichzeitige Inkubation mit LPA und PMA für 30 min. Hierbei trat eine starke Hämolyse auf die erkennbar war am Wert „events per second“ am FACS (Daten nicht gezeigt). Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 6 Proben.

III.3 Inhibierung der Scramblase mit R5421

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich eine Inhibierung der Scramblase auswirkt, wenn die PS-Exposition auf verschiedenen Wegen angeregt wird. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 38, linke Spalte) zeigen, dass die Verwendung von R5421 keine Auswirkung auf die Morphologie der Zellen hat. Es ergeben sich durch eine Vorinkubation mit R5421 keine offensichtlichen morphologischen Änderungen zu den Versuchen, wenn die Erythrozyten mit A23187, LPA oder PMA alleine inkubiert werden (vgl. Abb. 33).

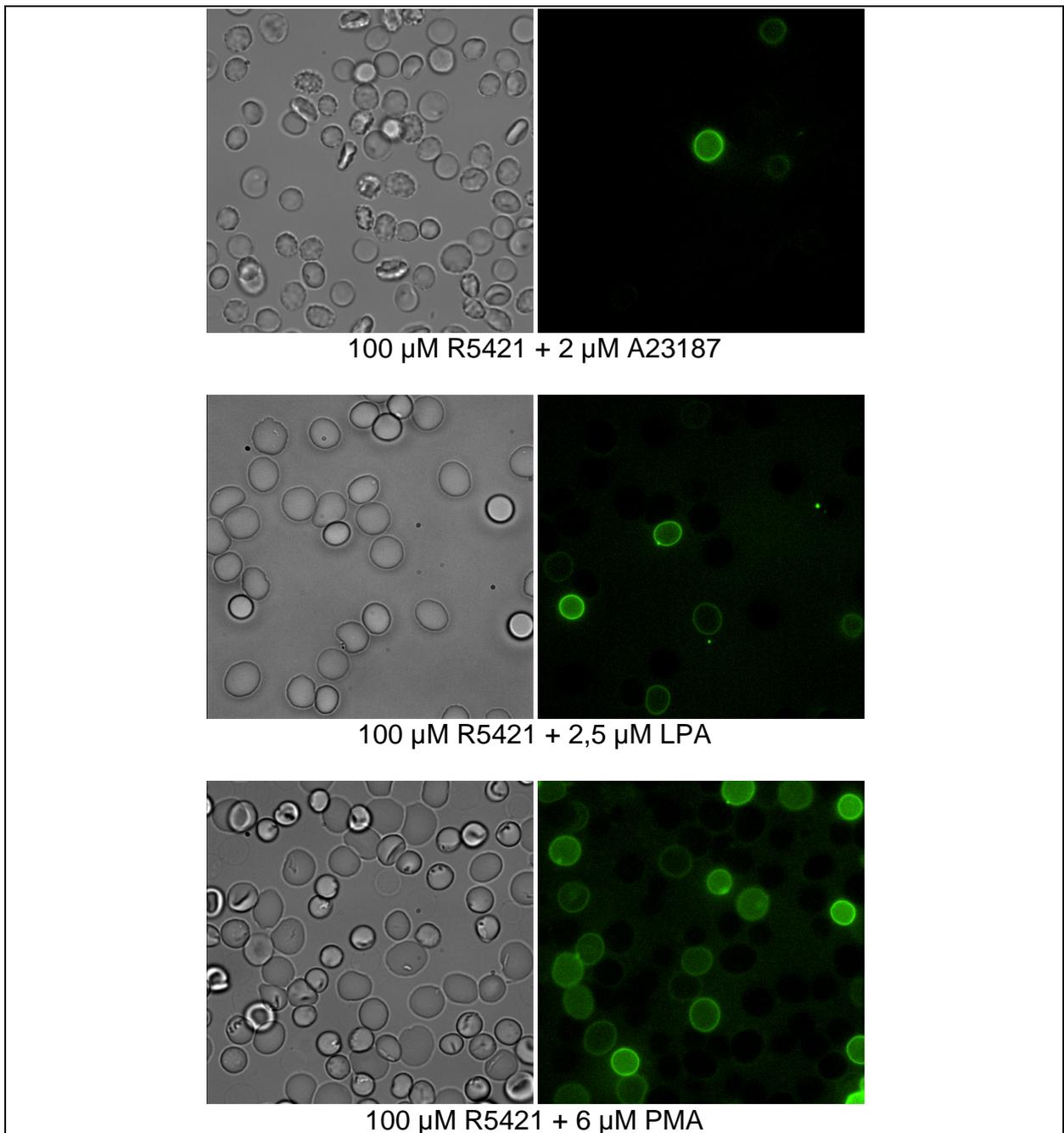


Abb. 38: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten nach Inkubation mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA und 6 µM PMA, nach vorheriger Inhibierung der Scramblase mit 100 µM R5421 für 30 min. Die linke Spalte zeigt jeweils die Durchlichtaufnahmen. Erkennbar sind die jeweiligen typischen morphologischen Veränderungen, die unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen auftreten. Die rechte Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit Annexin V-FITC. Die Aufnahmen von Kontrolle, A23187 und PMA erfolgten nach einer Inkubationsdauer von 30 min, die Inkubationsdauer mit LPA betrug 30 s.

Durch die Inhibierung der Scramblase mit R5421 sank die A23187-induzierte PS-Exposition von 27,9% auf 5,7%, die LPA-induzierte PS-Exposition von 35,4% auf 20,2% und die PMA-induzierte PS-Exposition von 68,2% auf 40,1% (s. Abb. 39).

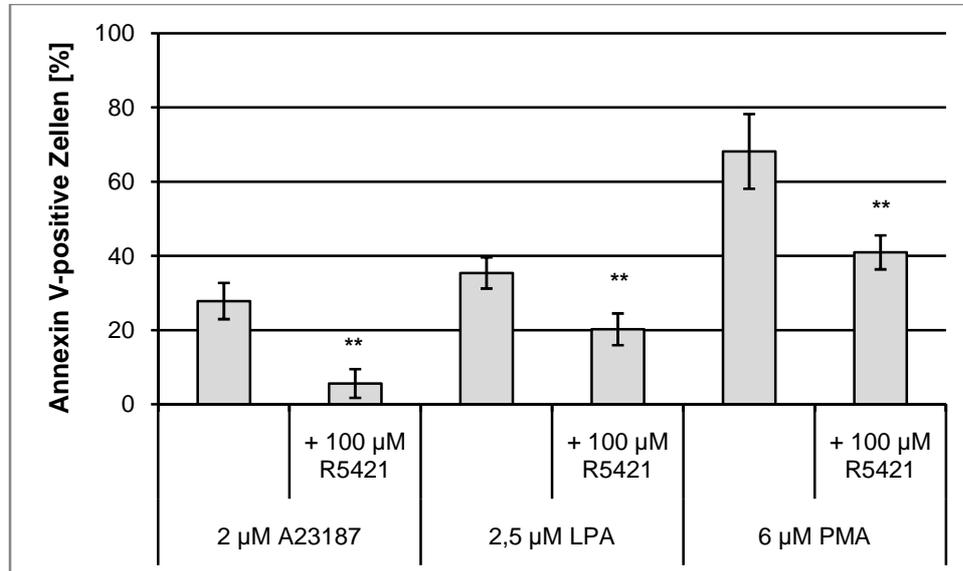


Abb. 39: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA und 6 µM PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 inhibiert wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187, LPA und PMA alleine (jeweils linke Säule, Kontrollen) bzw. nach vorangehender Inkubation mit R5421 (jeweils rechte Säule). Die Inkubation mit R5421, A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 7 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe, ** p≤0,01.

Eine Vorinkubation mit R5421 hat teilweise einen Einfluss auf die Größe der Zellpopulation, die mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} reagiert (s. Abb. 40). Bei A23187 ergibt sich kein signifikanter Unterschied. 98,8% der Zellen zeigen erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} nach Inkubation mit A23187. Bei noch immerhin 97,4% der Zellen ist dies der Fall, wenn die Scramblase zuvor mit R5421 inhibiert wurde. Im Falle von LPA hingegen hat sich die Größe der Population an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} nach einer Vorinkubation mit R5421 von 82,2% auf 94,1% signifikant erhöht. Bei PMA tritt der gegenteilige Effekt auf. Wird die Scramblase inhibiert und anschließend erfolgt eine Inkubation mit PMA, verkleinert sich die Population der Zellen mit erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt signifikant von 32,9% auf 18,5%.

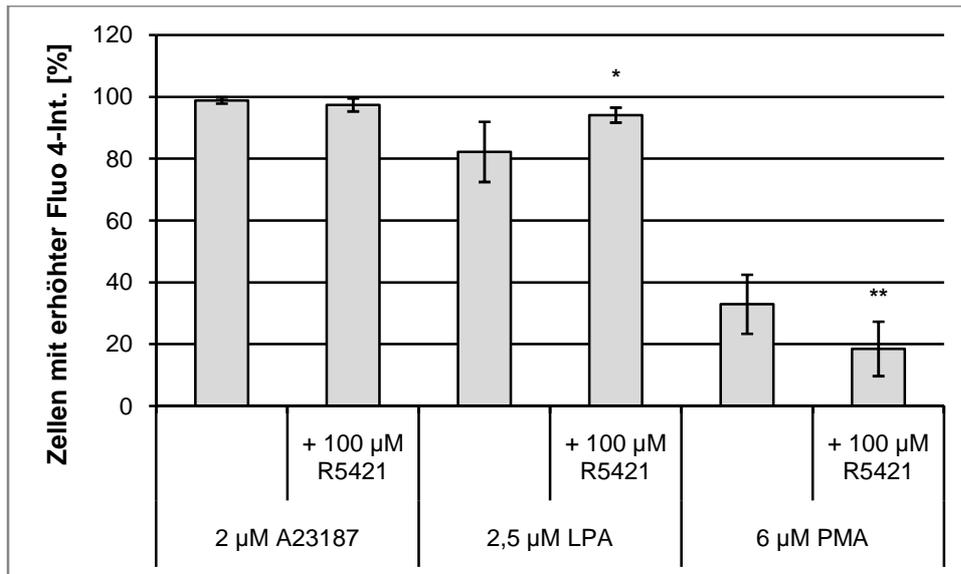


Abb. 40: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA und 6 µM PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 inhibiert wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187, LPA und PMA alleine (jeweils linke Säule, Kontrollen) bzw. nach vorangehender Inkubation mit R5421 (jeweils rechte Säule). Die Inkubation mit R5421, A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 5 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe, * p≤0,05, ** p≤0,01.

III.4. Inhibierung der PKC mit Chelerythrin

Bei Chelerythrin handelt es sich um einen Inhibitor der PKC, wobei das aktive Zentrum der PKC inhibiert wird [57, 61, 105]. Eine Inkubation mit 10 µM Chelerythrin hat keinen Einfluss auf Zellmorphologie, Hämolyserate oder PS-Exposition, wie die mikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 41) belegen. Da genügend Literaturwerte vorhanden sind, wurde auf eine Kalibrierung verzichtet. Eine höhere Konzentration bewirkt keinen größeren inhibitorischen Effekt [4, 61].

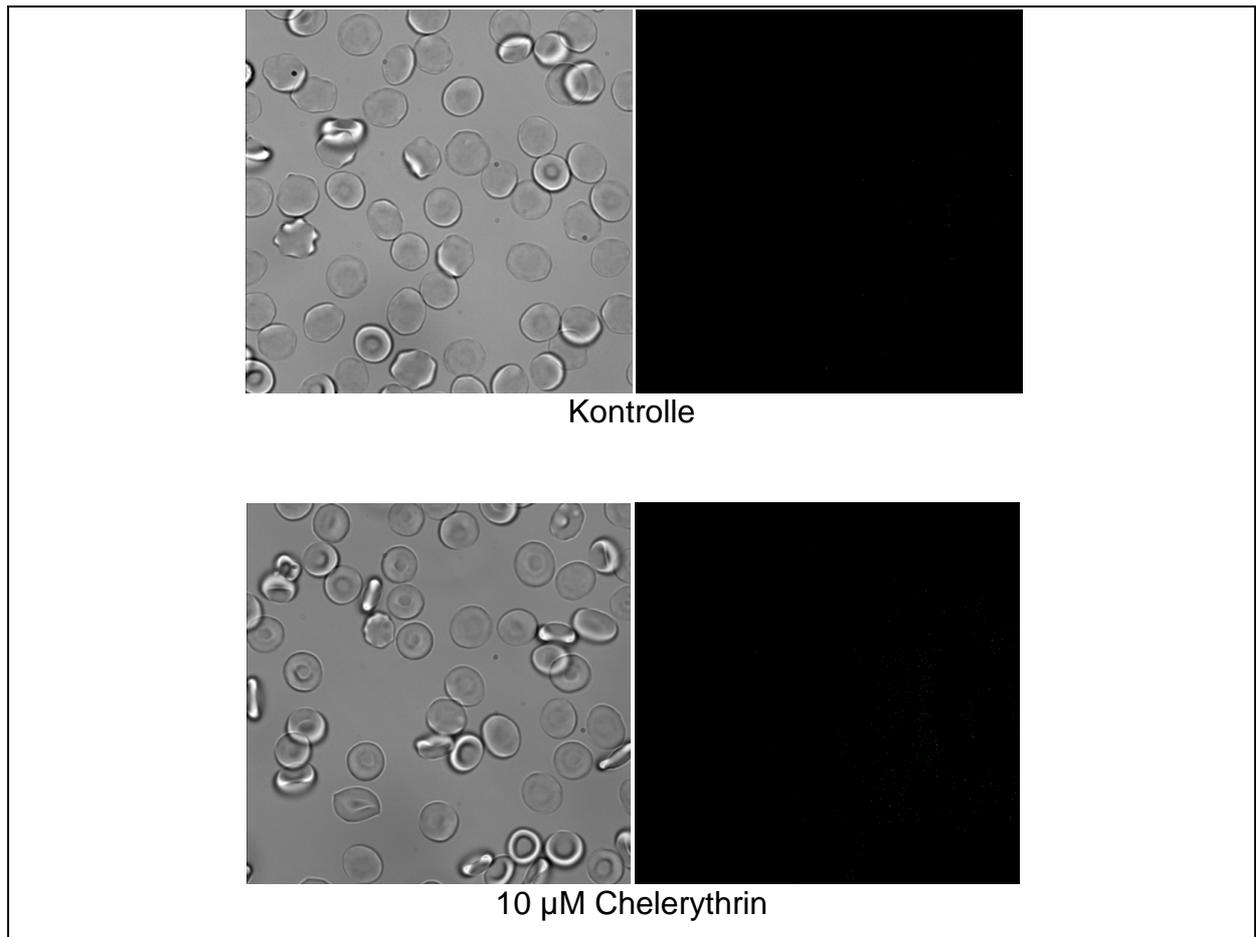


Abb. 41: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen bzw. nach Inkubation mit Chelerythrin. Die Fotos auf der linken Seite zeigen jeweils die Durchlichtaufnahme. Durch die Verwendung von Chelerythrin treten keine morphologischen Veränderungen auf. Die Fotos auf der rechten Seite zeigen jeweils die Fluoreszenzaufnahme mit Annexin V-FITC. Nach der Inkubationsdauer von 30 min ist keine PS-Exposition erkennbar.

Bei den mit A23187 und LPA durchgeführten Versuchen ergibt sich kein Unterschied in der Größe der Population mit PS-Exposition, wenn zuvor mit Chelerythrin inkubiert wurde (s. Abb. 42). Im Fall von A23187 zeigen 27,9% der Zellen PS-Exposition und 26,7% der Zellen, wenn zuvor mit Chelerythrin inkubiert wurde. Auch im Falle von LPA ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen: 34,3% nach LPA-Stimulierung alleine und 33,4%, wenn eine Vorinkubation mit Chelerythrin durchgeführt wurde. Die PMA-induzierte PS-Exposition hingegen wurde signifikant verringert von 58,2% auf 36,0%.

Ein ähnliches Ergebnis ergab die Analyse der Zellpopulation, die ihr intrazelluläres Ca^{2+} erhöht hatten (s. Abb. 43). Im Falle von A23187 (98,8% ohne Chelerythrin, 99,3% mit Chelerythrin) und LPA (82,2% ohne Chelerythrin, 76,5% mit Chelerythrin) waren die Zellpopulationen jeweils gleich groß.

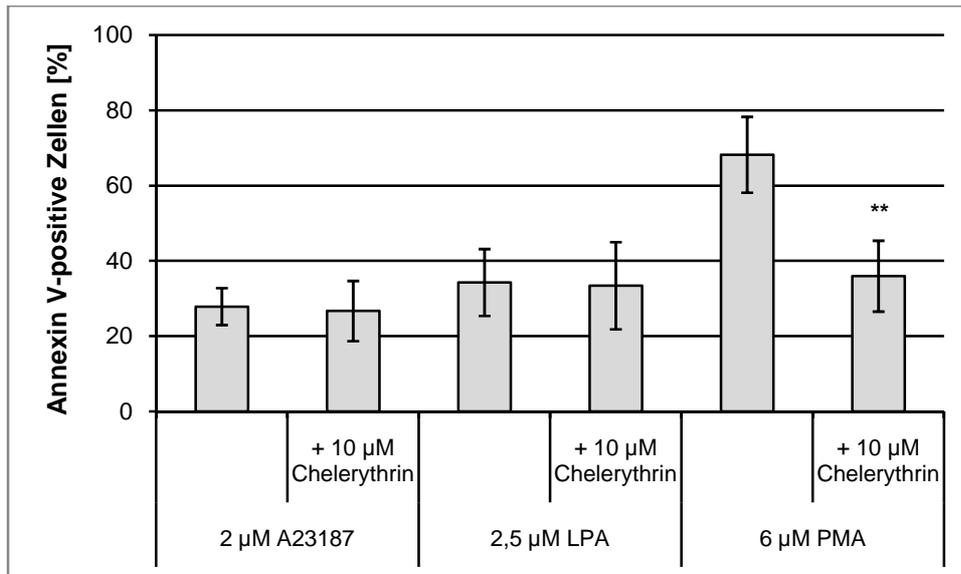


Abb. 42: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA und 6 µM PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187, LPA und PMA alleine (jeweils linke Säule, Kontrollen) bzw. nach vorangehender Inkubation mit Chelerythrin (jeweils rechte Säule). Die Inkubation mit Chelerythrin, A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 4 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe, ** p<0,01.

Auch hier zeigte sich bei PMA wieder ein anderes Bild. Die Größe der Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca²⁺-Gehalt verringerte sich in diesem Fall von 32,9% auf 14,7%.

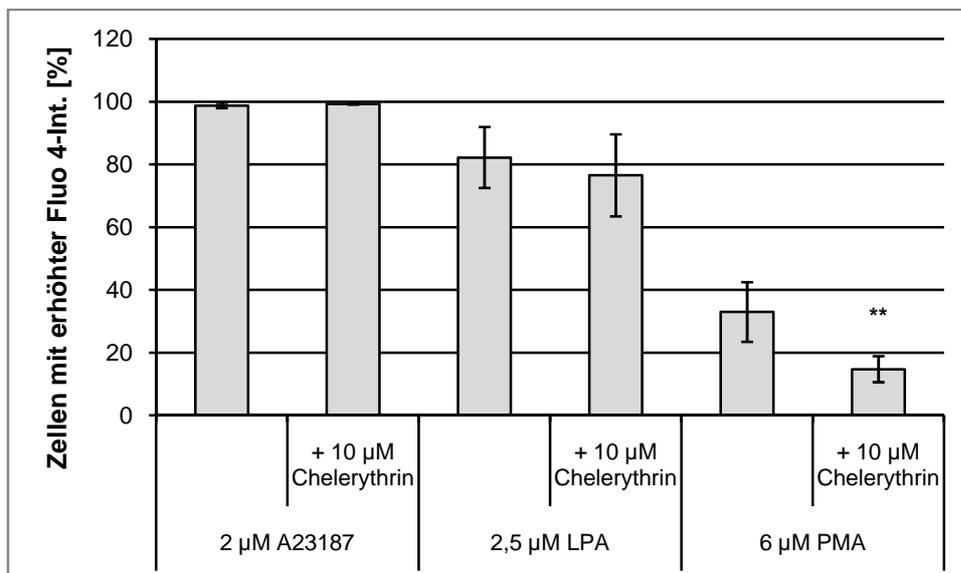


Abb. 43: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung 2 µM A23187, 2,5 µM LPA und 6 µM PMA, wenn zuvor die PKC mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187, LPA und PMA alleine (jeweils linke Säule, Kontrollen) bzw. nach vorangehender Inkubation mit Chelerythrin (jeweils rechte Säule). Die Inkubation mit Chelerythrin, A23187 und PMA erfolgte für 30 min, mit LPA für 30 s. Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 3 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe, ** p<0,01.

III.5 Gleichzeitige Inhibierung von Scramblase und PKC

Es stand zur Debatte, ob eine zeitgleiche Inhibierung von Scramblase und PKC eine weitere Reduktion der PS-Exposition zur Folge hat im Vergleich zur Inhibierung mit jeweils einer einzelnen Komponenten alleine. Die Erythrozyten wurden hierzu jeweils erst mit einem der beiden Inhibitoren vorinkubiert, gewaschen und dann mit dem jeweils anderen Inhibitor inkubiert, bevor die Anregung der Zellen mit A23187, LPA oder PMA erfolgte.

III.5.1 Kontrollmessungen

Es wurde überprüft, ob eine Inkubation mit beiden Inhibitoren einen Effekt hat:

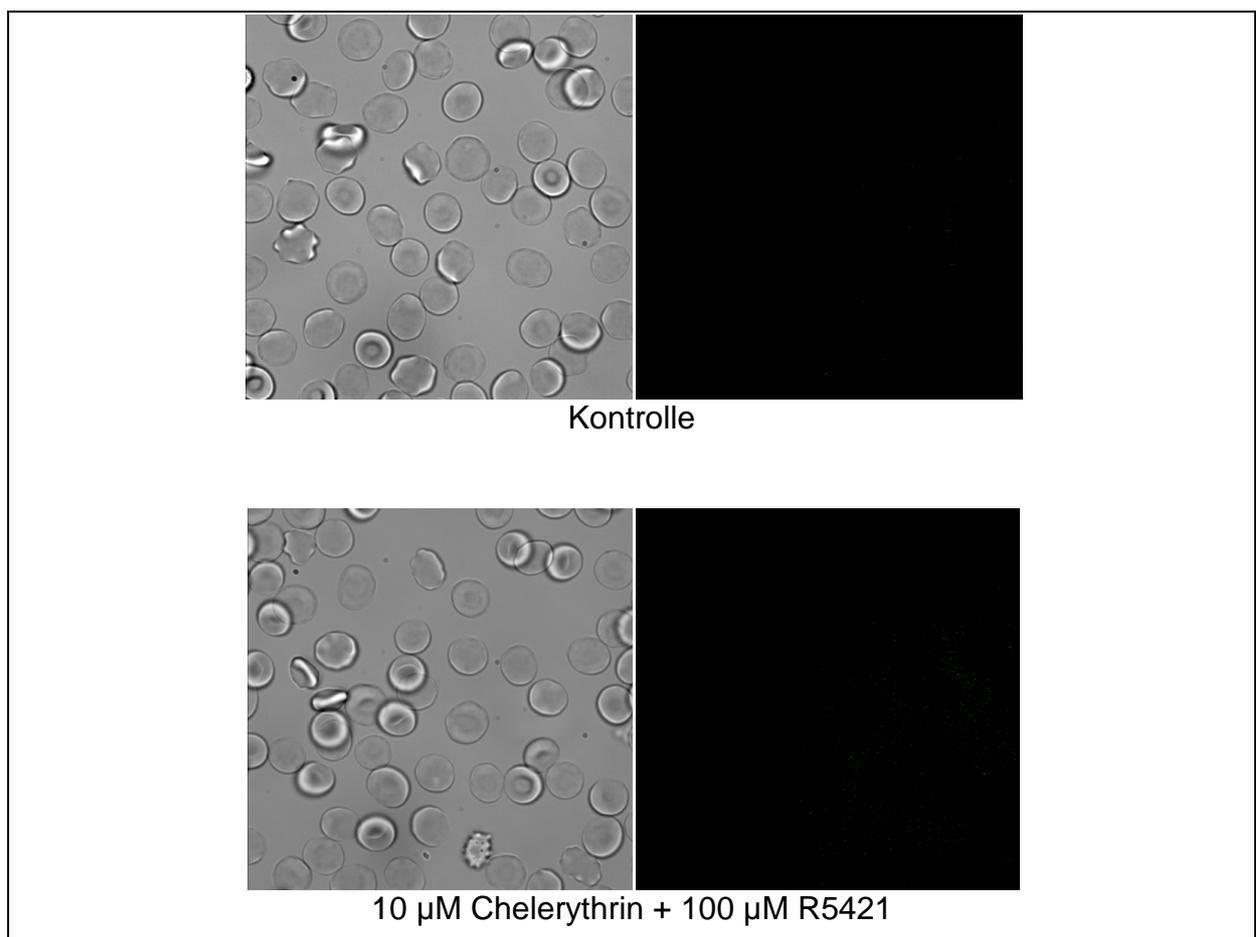


Abb. 44: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen bzw. nach Inkubation mit Chelerythrin und R5421. Die Fotos auf der linken Seite zeigen jeweils die Durchlichtaufnahme. Durch die Verwendung von Chelerythrin und R5421 treten keine morphologischen Veränderungen auf. Die Fotos auf der rechten Seite zeigen jeweils die Fluoreszenzaufnahme mit Annexin V. Nach der Inkubationsdauer von 30 min ist keine PS-Exposition erkennbar.

Durch eine Inkubation mit beiden Inhibitoren tritt keine Hämolyse ein (s. Abb. 44) und es treten keine morphologischen Änderungen der Erythrozyten auf.

III.5.2 Inhibierung von Scramblase und PKC nach Aktivierung mit A23187

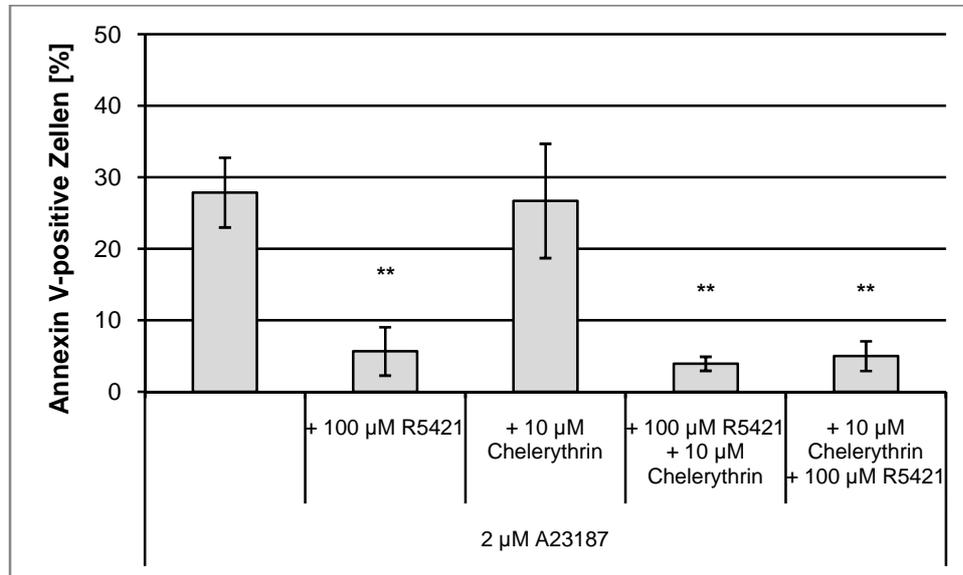


Abb. 45: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 µM A23187, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 und die PKC mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurden. Es erfolgte die Inkubation mit A23187 für 30 min (Kontrolle, linke Säule) bzw. es erfolgte die Inkubation mit A23187, nachdem vorher die Scramblase (zweite Säule) bzw. die PKC (dritte Säule) inhibiert wurde. Dann erfolgte die Inhibierung mit beiden Substanzen nacheinander (Inkubation jew. 30 min) und anschließend die Inkubation mit A23187 für 30 min (vierte und fünfte Säule). Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 6 Proben, t-Test zur Kontrollprobe: ** p≤0,01.

Die Anzahl an Zellen mit PS-Exposition konnte durch eine Kombination beider Inhibitoren nicht weiter reduziert werden als in den mit R5421 allein durchgeführten Versuchen (s. Abb. 45).

Abbildung 46 zeigt, dass die Anzahl an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca²⁺ unter allen Versuchsbedingungen (die Inhibitoren jeweils alleine oder in Kombination) gleich war.

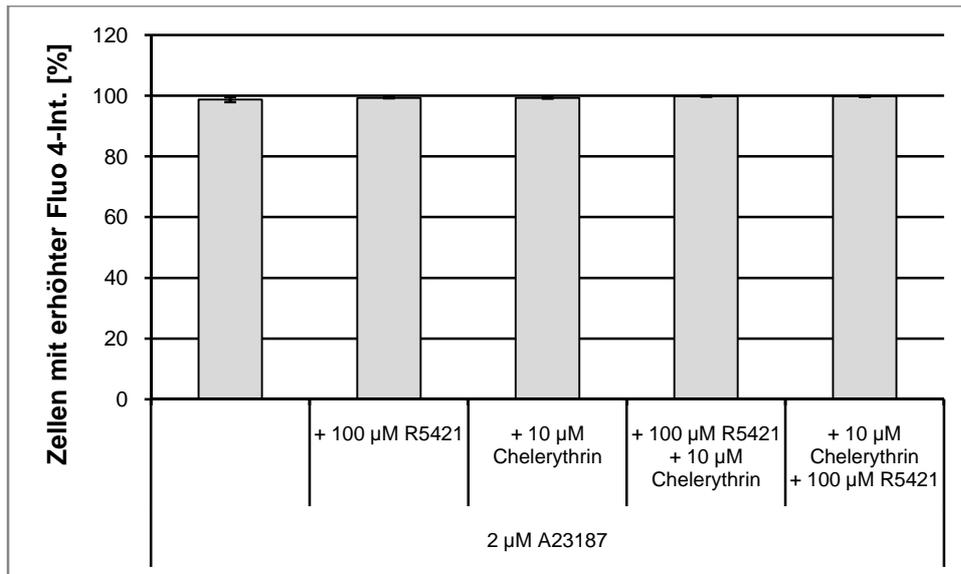


Abb. 46: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 µM A23187, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 und die PKC mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurden. Es erfolgte die Inkubation mit A23187 für 30 min (Kontrolle, linke Säule) bzw. es erfolgte die Inkubation mit A23187, nachdem vorher die Scramblase (zweite Säule) bzw. die PKC (dritte Säule) inhibiert wurde. Dann erfolgte die Inhibierung mit beiden Substanzen nacheinander (Inkubation jew. 30 min) und anschließend die Inkubation mit A23187 für 30 min (vierte und fünfte Säule). Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben, t-Test zur Kontrollprobe.

III.5.3 Inhibierung von Scramblase und PKC nach Aktivierung mit LPA

Auch im Falle von LPA wurde eine Kombination der Inhibitoren eingesetzt. Wurden die Zellen mit einer Kombination beider Inhibitoren inkubiert und anschließend mit LPA aktiviert, trat eine starke Hämolyse ein und die Daten waren nicht auswertbar (s. Abb. 47 und Abb. 48).

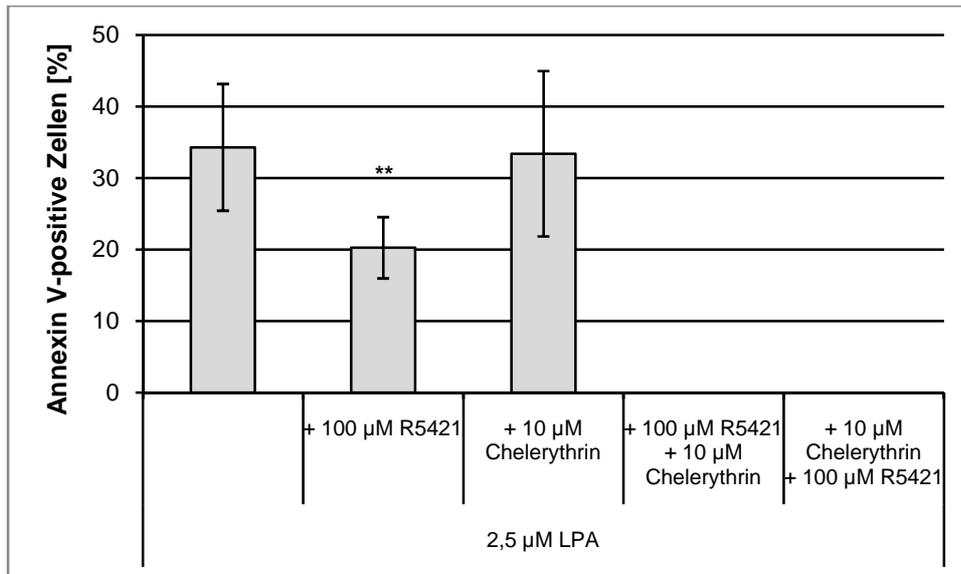


Abb. 47: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2,5 µM LPA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 und die PKC mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurden. Es erfolgte die Inkubation mit LPA für 30 s (Kontrolle, linke Säule) bzw. es erfolgte die Inkubation mit LPA, nachdem vorher die Scramblase (zweite Säule) bzw. die PKC (dritte Säule) inhibiert wurde. Dann erfolgte die Inhibierung mit beiden Substanzen nacheinander (Inkubation jew. 30 min) und anschließend die Inkubation mit LPA für 30 s (vierte und fünfte Säule). Hierbei trat eine zu starke Hämolyse auf. Mittelwerte +/- S.D. aus 5 Proben, t-Test zur Kontrollprobe: ** p≤0,01.

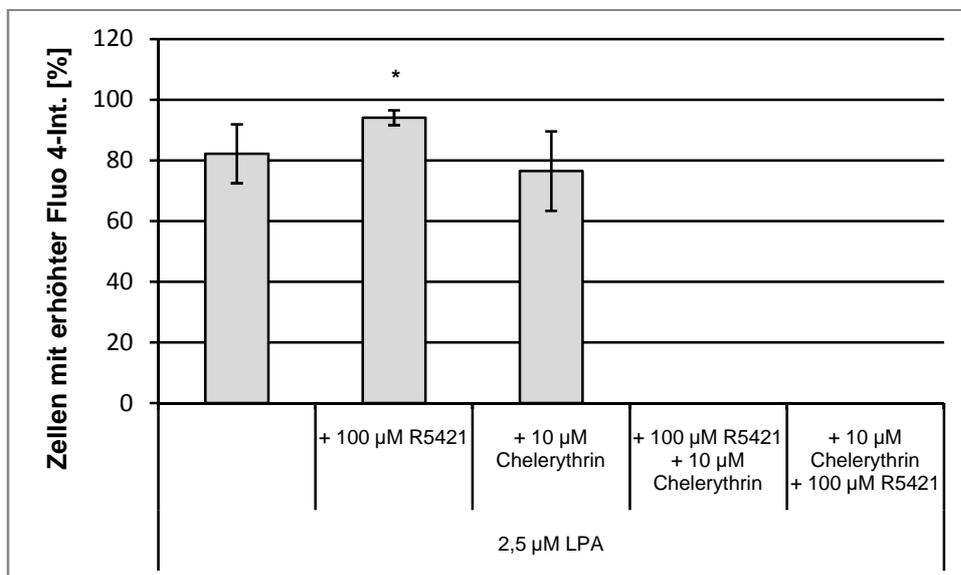


Abb. 48: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2,5 µM LPA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 und die PKC mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurden. Es erfolgte die Inkubation mit LPA für 30 s (Kontrolle, linke Säule) bzw. es erfolgte die Inkubation mit LPAA, nachdem vorher die Scramblase (zweite Säule) bzw. die PKC (dritte Säule) inhibiert wurde. Dann erfolgte die Inhibierung mit beiden Substanzen nacheinander (Inkubation jew. 30 min) und anschließend die Inkubation mit LPA für 30 s (vierte und fünfte Säule). Hierbei trat eine zu starke Hämolyse auf. Mittelwerte +/- S.D. aus 5 Proben, t-Test zur Kontrollprobe: * p≤0,05.

III.5.4 Inhibierung von Scramblase und PKC nach Aktivierung mit PMA

Die Versuche mit PMA ergaben ein ähnliches Bild wie die mit A23187 durchgeführten Versuche.

Die Anzahl an Zellen mit PS-Exposition war jeweils gleich zu den Versuchen mit Chelerythrin alleine (s. Abb. 49). Die Anzahl an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} war ebenfalls nicht signifikant verändert (s. Abb. 50).

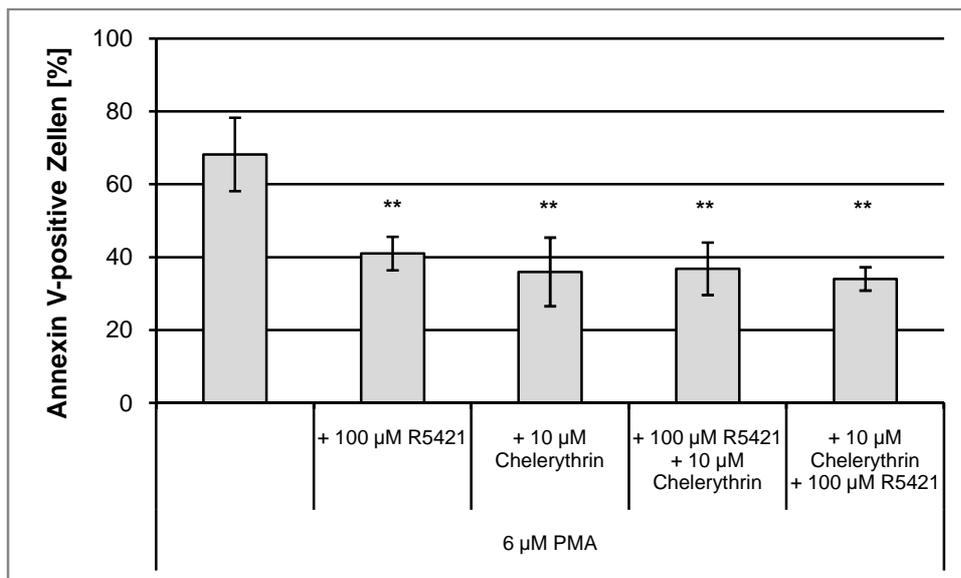


Abb. 49: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 6 μM PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 μM R5421 und die PKC mit 10 μM Chelerythrin inhibiert wurden. Es erfolgte die Inkubation mit PMA für 30 min (Kontrolle, linke Säule) bzw. es erfolgte die Inkubation mit PMA, nachdem vorher die Scramblase (zweite Säule) bzw. die PKC (dritte Säule) inhibiert wurde. Dann erfolgte die Inhibierung mit beiden Substanzen nacheinander (Inkubation jew. 30 min) und anschließend die Inkubation mit PMA für 30 min (vierte und fünfte Säule). Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 4 Proben, t-Test zur Kontrollprobe: ** $p \leq 0,01$.

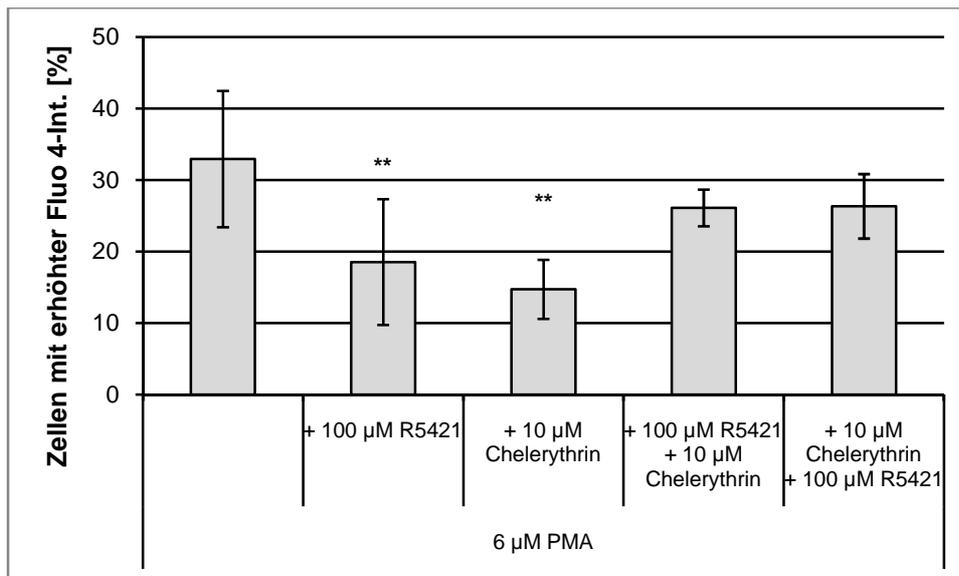


Abb. 50: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 6 µM PMA, wenn zuvor die Scramblase mit 100 µM R5421 und die PKC mit 10 µM Chelerythrin inhibiert wurden. Es erfolgte die Inkubation mit PMA für 30 min (Kontrolle, linke Säule) bzw. es erfolgte die Inkubation mit PMA, nachdem vorher die Scramblase (zweite Säule) bzw. die PKC (dritte Säule) inhibiert wurde. Dann erfolgte die Inhibierung mit beiden Substanzen nacheinander (Inkubation jew. 30 min) und anschließend die Inkubation mit PMA für 30 min (vierte und fünfte Säule). Hierbei trat eine zu starke Hämolyse auf. Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 3 Proben, t-Test zur Kontrollprobe: ** p≤0,01.

III.6 Inhibierung des K⁺-Effluxes durch den Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanal (Gardos-Kanal)

Durch eine Erhöhung der K⁺-Konzentration auf 150 mM wird die extrazelluläre Konzentration an K⁺-Ionen der intrazellulären Konzentration angeglichen, sodass der Ausstrom an K⁺ durch den Gardos-Kanal inhibiert wird. Diese Versuchsbedingungen erlauben daher die Überprüfung, ob der Efflux der K⁺-Ionen selbst möglicherweise als Trigger für die PS-Exposition in Betracht kommt. Die Erythrozyten wurden jeweils in Lösung mit 7,5 mM KCl (physiologische Lösung, Kontrolle) und 150 mM KCl resuspendiert und dann mit A23187, LPA oder PMA aktiviert.

Abbildung 51 zeigt, dass die Population mit PS-Exposition in der Lösung mit 150 mM KCl bei Verwendung von A23187 und LPA kleiner ist als in der Kontrolllösung. Im Falle von A23187 verringert sich der Anteil von Zellen mit PS-Exposition von 27,9% auf 12,0%, im Falle von LPA von 34,3% auf 20,3%. Bei Verwendung von PMA ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Populationen.

Abbildung 52 zeigt, dass sich weder für A23187, noch für LPA und PMA ein Unterschied zwischen den Größen der Populationen mit erhöhtem intrazellulärem

Ca²⁺-Gehalt ergab. Zwischen der Kontrolllösung bzw. der 150 mM KCl-Lösung gab es keinen signifikanten Unterschied.

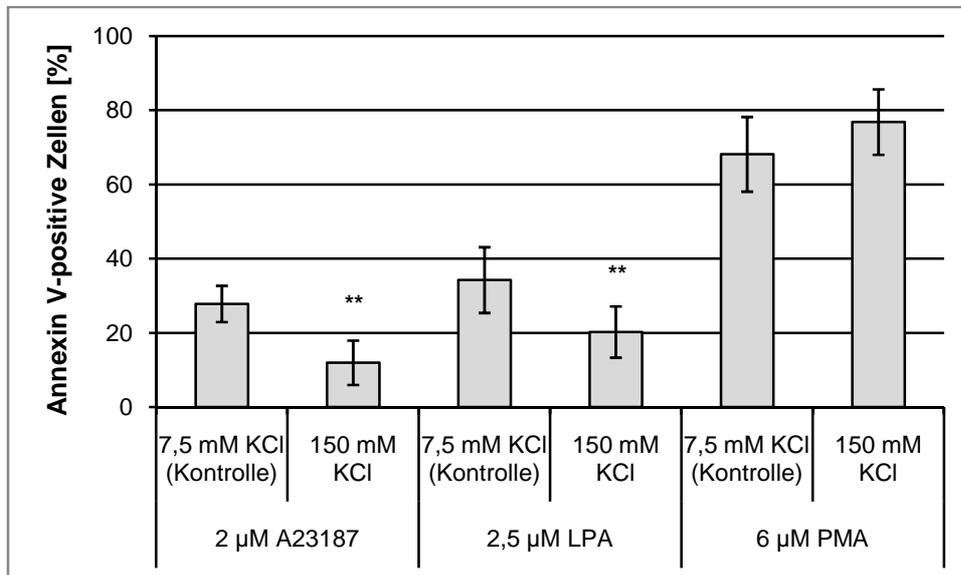


Abb. 51: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA, 6 µM PMA, wenn der K⁺-Efflux geblockt wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187 (für 30 min), LPA (für 30 s) und PMA (für 30 min) unter Kontrollbedingungen (jeweils linke Säule) und in Lösung mit erhöhter KCl-Konzentration (jeweils rechte Säule). Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 3 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe: ** p<0,01.

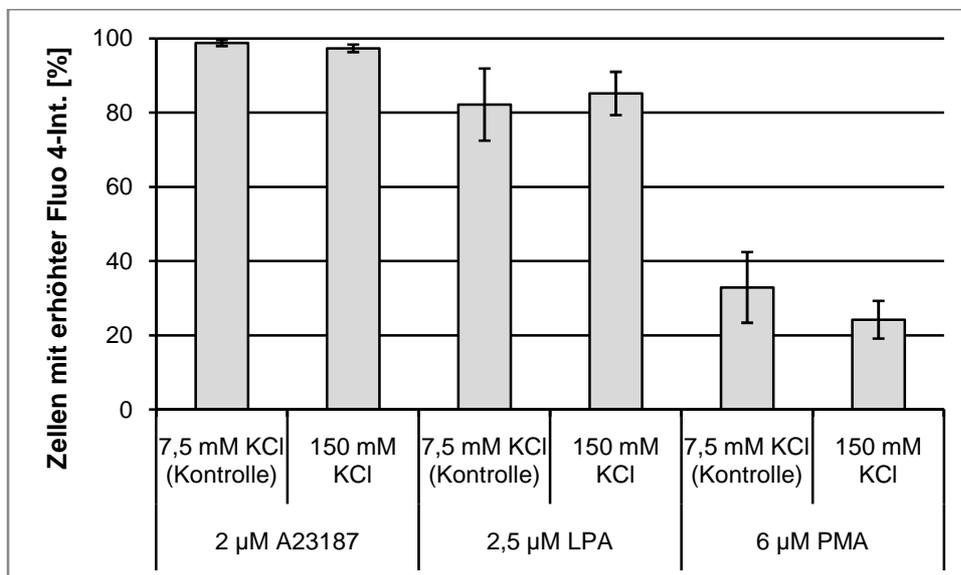


Abb. 52: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA, 6 µM PMA, wenn der K⁺-Efflux geblockt wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187 (für 30 min), LPA (für 30 s) und PMA (für 30 min) unter Kontrollbedingungen (jeweils linke Säule) und in Lösung mit erhöhter KCl-Konzentration (jeweils rechte Säule). Mittelwerte +/- S.D. aus mind. 4 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe.

III.7 Einfluss des Zellvolumens auf die PS-Exposition

Die Überlegung war, ob das Zellvolumen selbst einen direkten Einfluss auf die PS-Exposition besitzen könnte. D.h. ob eine Veränderung im Volumen ein Trigger zum Auswärtstransport von PS darstellt. Dazu wurden die Erythrozyten einmal in „Shrinking Solution“ gegeben, in der es aufgrund einer erhöhten Osmolarität zum Schrumpfen der Erythrozyten um ca. 10% kommt. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen in „Swelling Solution“ inkubiert, in der ihr Volumen um ca. 10% anschwillt.

III.7.1 Messungen am Mikroskop

Die Überprüfung des Volumeneffektes erfolgte zunächst am Mikroskop. Die Erythrozyten wurden einmal für 30 min in physiologischer Lösung inkubiert (s. Abb. 53, obere Bildreihe), einmal in „Shrinking Solution“ (mittlere Bildreihe) und einmal in „Swelling Solution“ (untere Bildreihe).

Die Aufnahmen zeigen deutlich, dass der Volumeneffekt innerhalb kürzester Zeit auftritt, denn bereits nach 30 s ist eine deutliche Volumenänderung zu erkennen. Dieser Effekt bleibt während der gesamten Inkubationsdauer konstant bzw. wird im Falle der „Shrinking Solution“ sogar noch weiter verstärkt.

Die in der Kontrollprobe (obere Bildreihe) sichtbare Formänderung ist eine Folge des Glaseffektes. Dieser Effekt, der bei Kontakt von Erythrozyten mit Glasoberflächen auftreten kann, ist zwar bekannt, wenn auch bislang noch ungeklärt. Sicher ist, dass der Glaseffekt bis auf die sichtbare Formänderung keine weiteren Auswirkungen auf die Erythrozyten und ihre zellulären Funktionen besitzt.

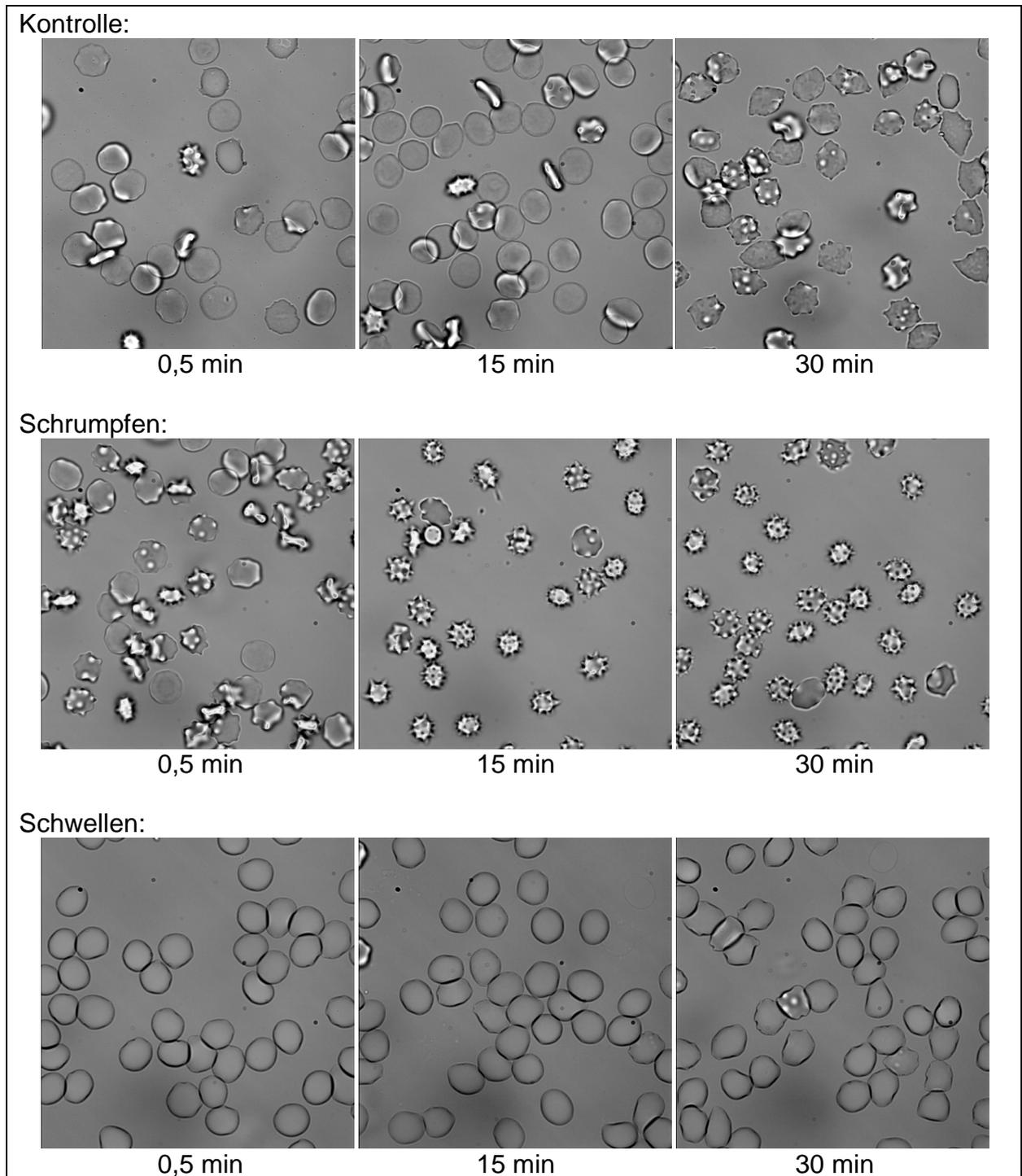


Abb. 53: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten, deren Zellvolumen verändert wurde. Die obere Reihe zeigt Erythrozyten in physiologischer Lösung (Kontrolle). Die mittlere Reihe zeigt Erythrozyten, die in „Shrinking Solution“ geschrumpft wurden. Die untere Reihe zeigt Erythrozyten, die in „Swelling Solution“ zum Schwellen gebracht wurden.

III.7.2 Kinetik zur PS-Exposition

Aus Abbildung 54 wird ersichtlich, dass ein Schrumpfen oder Schwellen der Erythrozyten keinen Unterschied in der Rate der PS-Exposition zur Kontrollprobe aufweist.

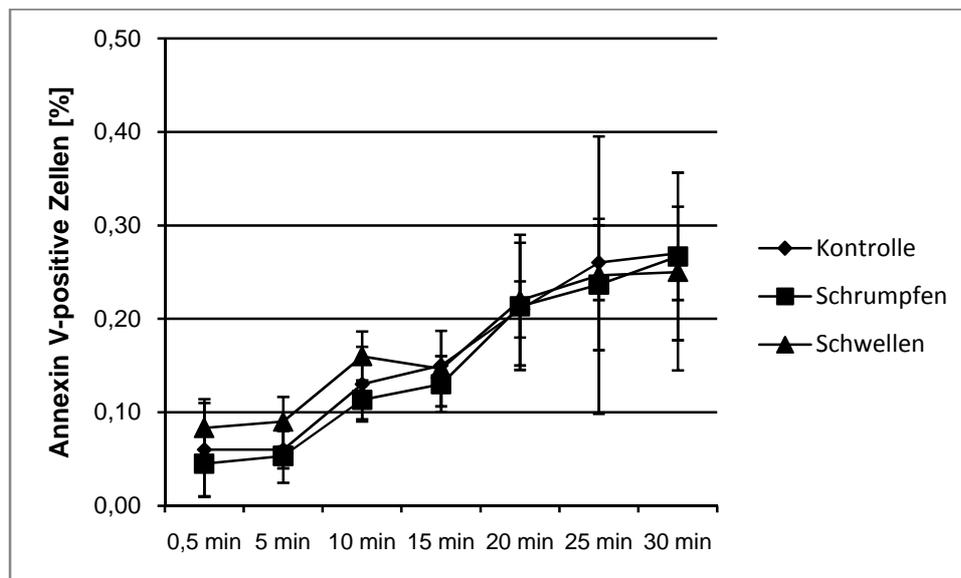


Abb. 54: Kinetik Annexin V-positiver Zellen, deren Zellvolumen verändert wurde. Die Zellen wurden in physiologischer Lösung inkubiert (Kontrolle), in „Shrinking Solution“ (Schrumpfen) und „Swelling Solution“ (Schwellen). Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben.

III.8 Einfluss des pH-Wertes auf die PS-Exposition

Ein weiterer Faktor, der möglicherweise einen Einfluss auf die PS-Exposition haben könnte und den es abzuklären galt, war eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes. Bucki et al. zeigten [86], dass ein Na^+ -Influx in Thrombozyten bei gleichzeitiger Alkalisierung des Intrazellularraumes zur PS-Exposition führt und gaben die Änderung des pH-Wertes als möglichen Trigger für die PS-Exposition an. Eine Alkalisierung des Intrazellularraumes wurde als möglicher Trigger für die PS-Exposition diskutiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Erythrozyten für 30 min in einer Lösung mit pH 8,0 inkubiert. Werden Erythrozyten in eine Lösung gegeben, deren pH-Wert vom physiologischen pH-Wert von 7,4 abweicht, ändert sich ihr intrazellulärer pH-Wert und steigt leicht an von ca. 8,2 auf 8,4 [106, 107]. Anschließend wurden die Versuche mit A23187, LPA bzw. PMA wie üblich durchgeführt.

Abbildung 55 zeigt, dass es keinen Unterschied der PS-Exposition zwischen den Messgruppen gab, wenn der intrazelluläre pH-Wert verändert wurde.

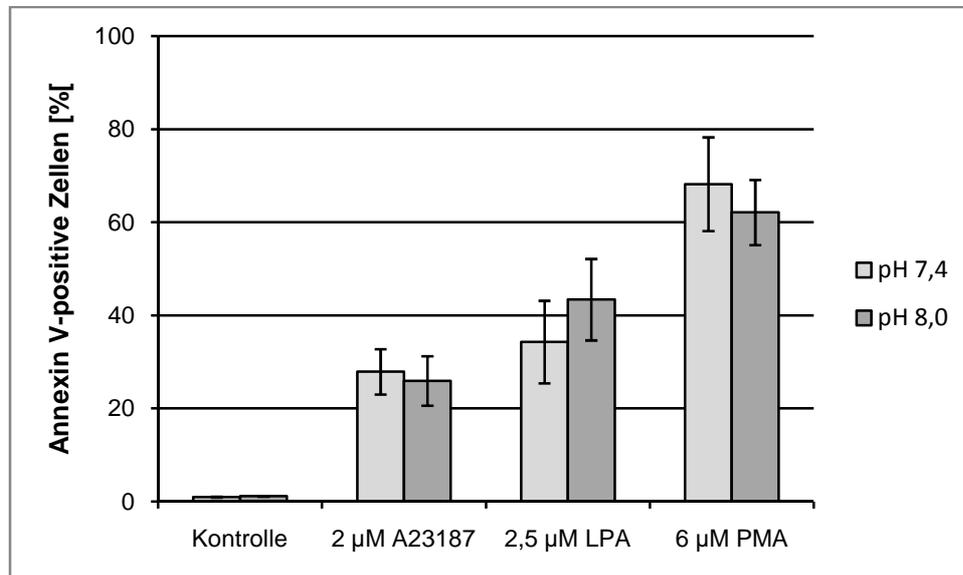


Abb. 55: Annexin V-positive Zellen nach Aktivierung mit 2 µM A23187, 2,5 µM LPA, 6 µM PMA, wenn der Intrazellularraum azidifiziert wurde. Es erfolgte die Inkubation mit A23187 (für 30 min), LPA (für 30 s) und PMA (für 30 min) unter Kontrollbedingungen (jeweils linke Säule) und in Lösung mit erhöhtem extrazellulärem pH-Wert (jeweils rechte Säule). Mittelwerte +/- S.D. aus 6 Proben, t-Test zur jeweiligen Kontrollprobe.

III.9 Einfluss des Zellalters auf die PS-Exposition

In den durchgeführten Versuchen reagierte immer ein Teil der Erythrozyten mit PS-Exposition, während eine zweite Population keine Reaktion auf die jeweils verwendete Substanz / die jeweiligen Versuchsbedingungen zeigte. Da die Erythrozytenpopulation eines Spenders immer aus einem Gemisch an Erythrozyten unterschiedlichsten Alters zusammengesetzt ist (wenige Tage bis 120 Tage alte Erythrozyten), stand die Überlegung nahe, dass es sich bei den reagierenden Zellen jeweils um eine Gruppe einer bestimmten Altersklasse handelt und die Unterschiede im Reaktionsvermögen im Zellalter begründet sind. Neben jungen sowie seneszenten Zellen, die bereits 100 oder mehr Tage im Blutstrom zirkulieren, gibt es Zellen aller Altersklassen, die sich sowohl in ihren Eigenschaften, als auch in Anzahl und Funktionalität ihrer Proteinkomponenten unterscheiden. Mit zunehmendem Zellalter kommt es zudem zu einem Verlust an Membranbestandteilen und Zellwasser. D.h. eine alte Zelle ist kleiner, schwerer und besitzt eine höhere Konzentration an gelösten Substanzen. Sie besitzt somit eine höhere Dichte [19].

Das unterschiedliche Zellalter der Erythrozyten einer Population kam in Frage als Erklärung für die Tatsache, dass es innerhalb einer Erythrozytenpopulation Zellen gibt, die auf gegebene Versuchsbedingungen mit PS-Exposition reagieren, sowie andere Zellen, die keine Reaktion zeigen. Bosman et al. [108] zeigten zudem in einer 2012 veröffentlichten Arbeit, dass sich junge und alte Erythrozyten in der Anzahl an Zellen mit PS-Exposition und erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt signifikant unterscheiden, wenn sie nach der Separation 48 Stunden in Ringer-Lösung inkubiert wurden. Die Erythrozyten einer Population sollten also nach Zellalter aufgetrennt, zur PS-Exposition angeregt und dann analysiert werden. Das Phänomen der unterschiedlichen Dichte macht man sich zunutze, um die Zellen gemäß ihres Alters zu separieren: Mithilfe einer Percoll-Lösung ist es möglich, die Zellen in fünf Fraktionen unterschiedlichen Alters aufzutrennen. Percoll besteht aus Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Silikapartikeln, ist biologisch inert und besitzt eine geringe Viskosität [109]. Die Dichtegradientenzentrifugation hat sich als sehr zuverlässig bewährt, gilt als Prozedur erster Wahl zur Altersseparation humaner Erythrozyten [105, 109, 110] und fand auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Die Erythrozyten wurden zu fünf Fraktionen separiert (s. Abb. 56) und zunächst einigen Kontrollversuchen unterzogen, die die Verlässlichkeit der Separationsmethode belegen sollten und sicherstellten, dass die durchgeführte Auftrennung auch wirklich funktionierte. Anschließend erfolgten die jeweiligen Versuche zur PS-Exposition.

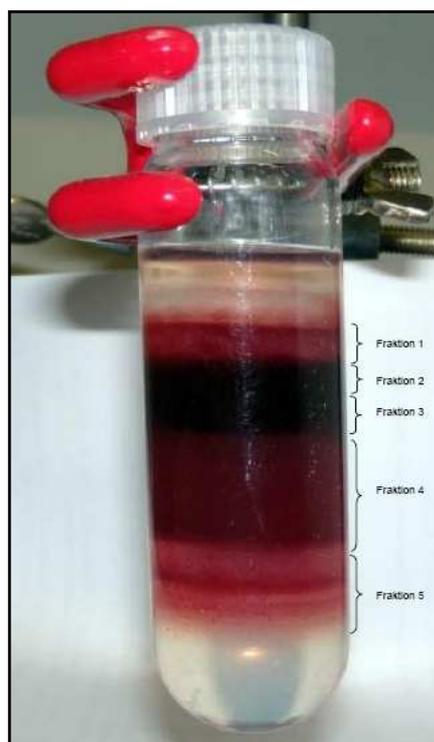


Abb. 56: Fotografie der in Percoll-Lösung in verschiedene Altersfraktionen separierten Erythrozyten. Die fünf verschiedenen Fraktionen, die die Zellen unterschiedlicher Dichte enthalten, sind deutlich zu erkennen. Fraktion 1 enthält die jüngsten Zellen, Fraktion 5 die ältesten Zellen. Aus: [97].

III.9.1 Kontrollversuche zur Auftrennung der Erythrozytenpopulation mittels Percoll-Separation

Kontrollversuche zu PS-Exposition und Ca²⁺-Gehalt

Zunächst wurden PS-Exposition und Ca²⁺-Gehalt von Percoll-separierten Erythrozyten überprüft. Es sollte sichergestellt werden, dass die Prozedur der Separation selbst keinen Einfluss auf diese beiden Faktoren nimmt.

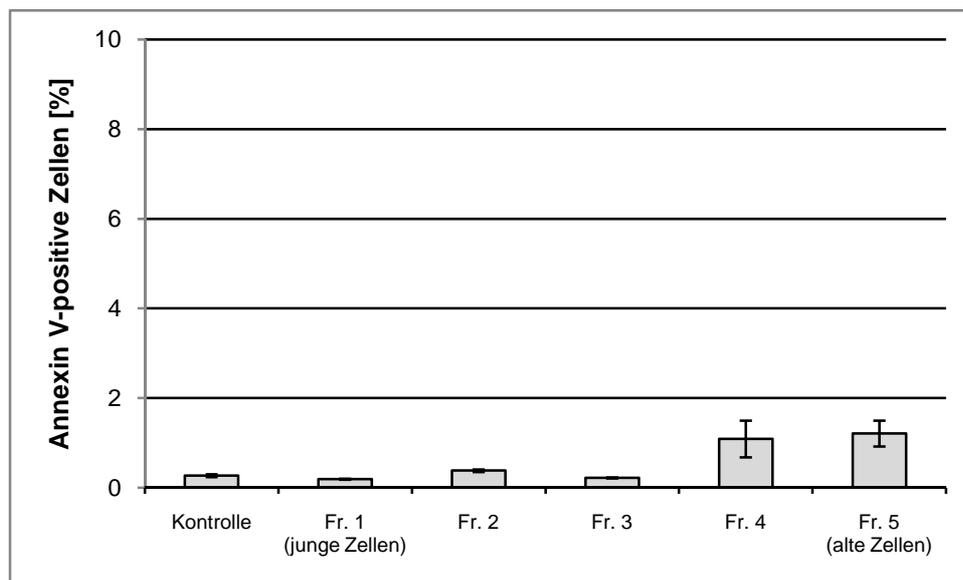


Abb. 57: Annexin V-positive Zellen der verschiedenen Fraktionen unter Kontrollbedingungen. Die Gesamterthrozyten vor der Separation (Kontrolle) bzw. die Zellen der verschiedenen Fraktionen wurden in physiologischer Lösung resuspendiert und dann die PS-Exposition analysiert. Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben.

Abbildung 57 belegt, dass die PS-Exposition in den einzelnen Fraktionen im Gegensatz zur Kontrolle (Gesamterthrozyten vor der Separation) nicht erhöht ist. Gleiches ist beim Ca²⁺-Gehalt der Fall (s. Abb. 58). Es ergab sich keine Veränderung zur Kontrollmessung.

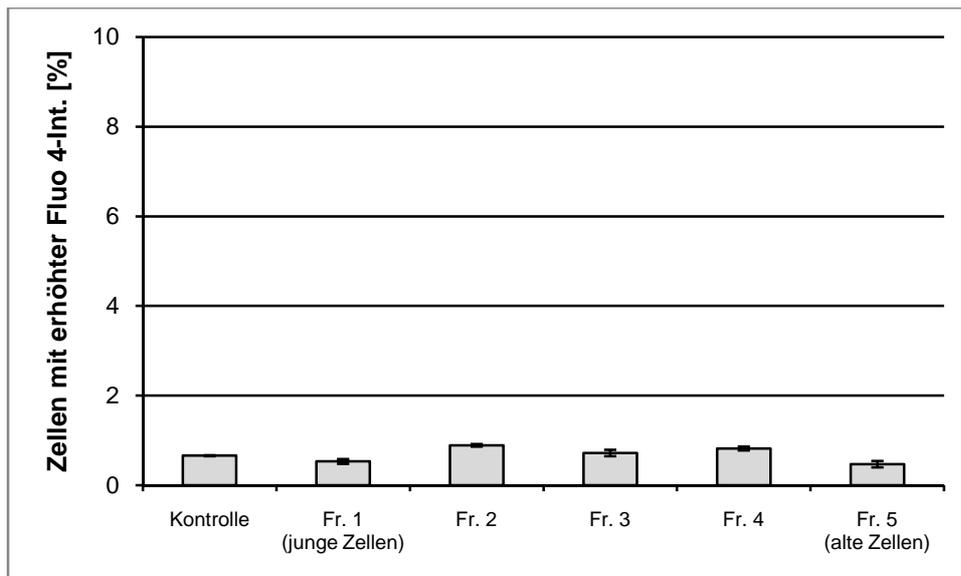


Abb. 58: Zellen der verschiedenen Fraktionen mit erhöhter Fluo 4-Intensität unter Kontrollbedingungen. Die Gesamterthrozyten vor der Separation (Kontrolle) bzw. die Zellen der verschiedenen Fraktionen wurden in physiologischer Lösung resuspendiert und dann die Fluo 4-Intensität analysiert. Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben.

Retikulozytenanalyse

Bei Retikulozyten handelt es sich um die jüngsten Zellen der Erythrozytenpopulation im Blutstrom. Sie sollten daher, bei korrekt durchgeführter Dichteseparation, ausschließlich in Fraktion 1 zu finden sein. Ihr Nachweis erfolgt mittels Thiazol Orange (Handelsname: Retic-COUNT), welches an DNA- und RNA-Fragmente mit einem Verhältnis von 2 Farbstoffmolekülen pro Base bindet. Es entsteht ein fluoreszierender Nukleotid-Farbstoff-Komplex, der im FACS detektierbar ist.

In Abbildung 59 ist zu sehen, dass die Retikulozyten fast ausschließlich (11,1%) in Fraktion 1 bei den jüngsten Zellen zu finden sind. In allen anderen Fraktionen liegt ihr Vorkommen unter 1% bzw. knapp über 1% (Fraktion 2).

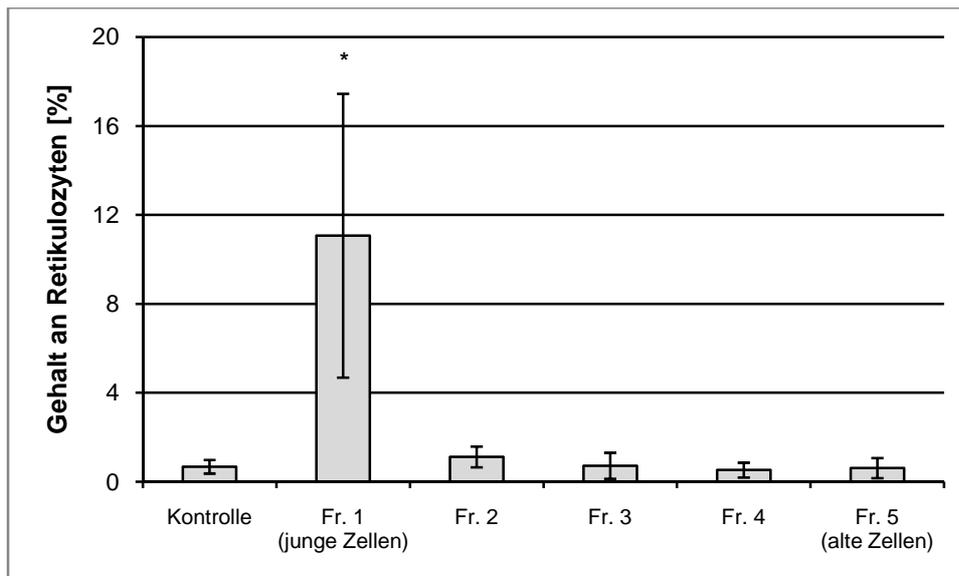


Abb. 59: Gehalt an Retikulozyten in den einzelnen Fraktionen. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an Erythrozyten in der Gesamtpopulation und den einzelnen Fraktionen. Fraktion 1 (jüngste Zellen) enthält den mit Abstand größten Anteil an Retikulozyten, Mittelwerte +/- S.D. aus 4 Proben, t-Test: * $p \leq 0,05$.

Redox-Aktivitäts-Assay

Avron und Shavit entwickelten einen Assay, anhand dessen die Aktivität eines in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen befindlichen Redoxsystems (PMRS) verfolgt werden kann [90]. Das PMRS transportiert Elektronen von intrazellulären Substraten zu extrazellulären Elektronenakzeptoren und wird aktiviert, um eine ausgeglichene innere Redoxbalance aufrecht zu erhalten. Obwohl die physiologische Rolle des PMRS nach wie vor noch nicht voll verstanden ist, so ist sein Vorhandensein von wichtiger Bedeutung, da die Aufrechterhaltung der Redoxbalance (festgemacht am NAD^+/NADH -Level) wichtig ist für das Überleben der Zelle [111]. Bei Probanden höheren Alters konnte eine Zunahme in der Häufigkeit des PMRS festgestellt werden. Das häufigere Vorkommen dient mutmaßlich dem Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [112].

Beim Redox-Aktivitäts-Assay wird die Aktivität des PMRS anhand der Reduktion von Ferricyanid zu Ferrocyanid ermittelt. Die transportierten Elektronen reagieren mit dem in der Lösung vorhandenen Ferricyanid. Das entstehende Ferrocyanid kann im Photometer bei 535 nm detektiert werden. Die erhaltene optische Dichte wird mit dem Faktor 0,145 multipliziert und ergibt den in der Lösung vorhandenen Gehalt an Ferrocyanid in μM [90].

Die Auswertung des Assays ergab eine signifikante Abnahme in der Aktivität des PMRS (s. Abb. 60). Fraktion 1 und Fraktion 3 unterschieden sich signifikant, sowie Fraktion 3 und Fraktion 5. Es war somit eine deutliche Abnahme der Aktivität zwischen den jüngsten Zellen, den Zellen mittleren Alters und den ältesten Zellen nachweisbar.

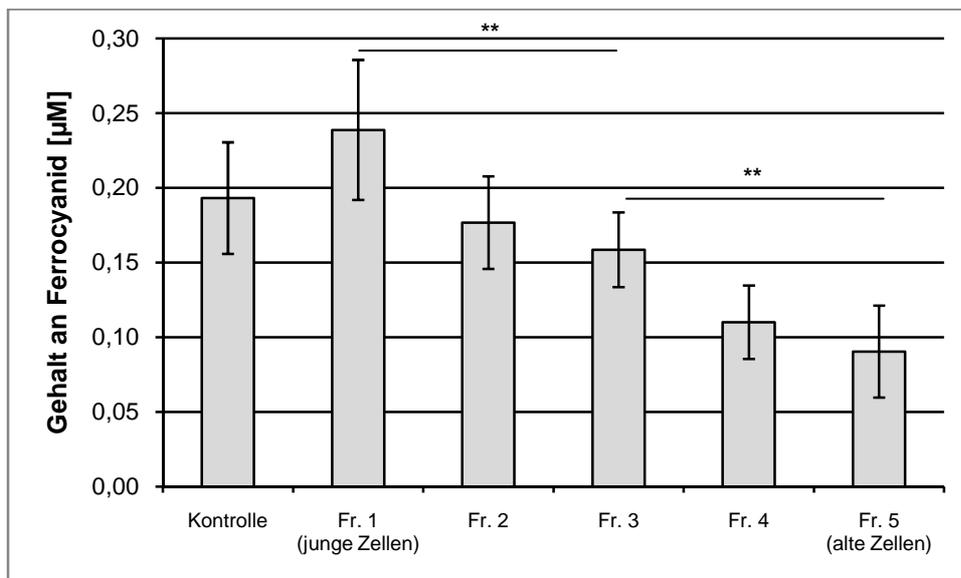


Abb. 60: Redox-Aktivitäts-Assay zur Bestimmung der Redoxaktivität der Erythrozyten in den einzelnen Fraktionen. Bestimmt wurde der Gehalt an Ferrocyanid in der Gesamtpopulation (Kontrolle) bzw. den einzelnen Fraktionen. Mittelwerte +/- S.D. aus 5 Proben, t-Test: ** $p \leq 0,01$.

Bestimmung des Zellvolumens

Ältere Erythrozyten besitzen ein geringeres Zellvolumen als junge Erythrozyten, weshalb sich dieser Parameter auch zur Überprüfung der Separationsmethode eignet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der separierten Erythrozyten (s. Abb. 61) zeigen bereits deutlich, dass die Zellen mit zunehmendem Alter eine geringere Größe aufweisen. Zudem neigen die älteren Zellen in Fraktion 4 und die ältesten Zellen in Fraktion 5 zu vermehrter interzellulärer Adhäsion.

Die genaue Ermittlung des relativen Zellvolumens anhand der Trocknungsmethode bestätigte diese Ergebnisse (s. Abb. 62). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den jüngsten Zellen (Fraktion 1) zu den Zellen mittleren Alters (Fraktion 3). Diese waren wiederum signifikant größer als die ältesten Zellen in Fraktion 5.

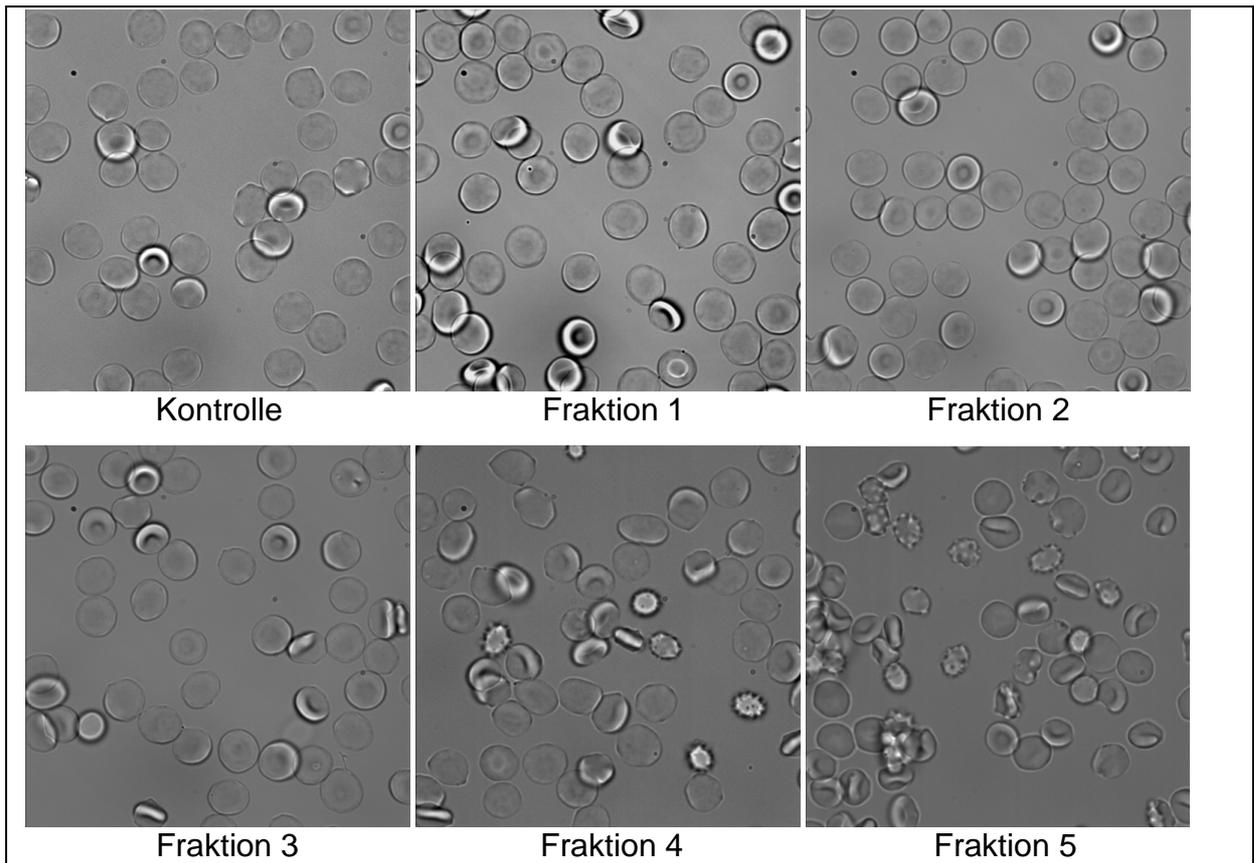


Abb. 61: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten der verschiedenen Altersklassen. Gezeigt sind die Zellen der Gesamterythrozytenpopulation vor der Auftrennung (Kontrolle) und die Zellen der einzelnen Fraktionen. Die morphologischen Unterschiede zwischen jungen und alten Zellen sind deutlich zu erkennen.

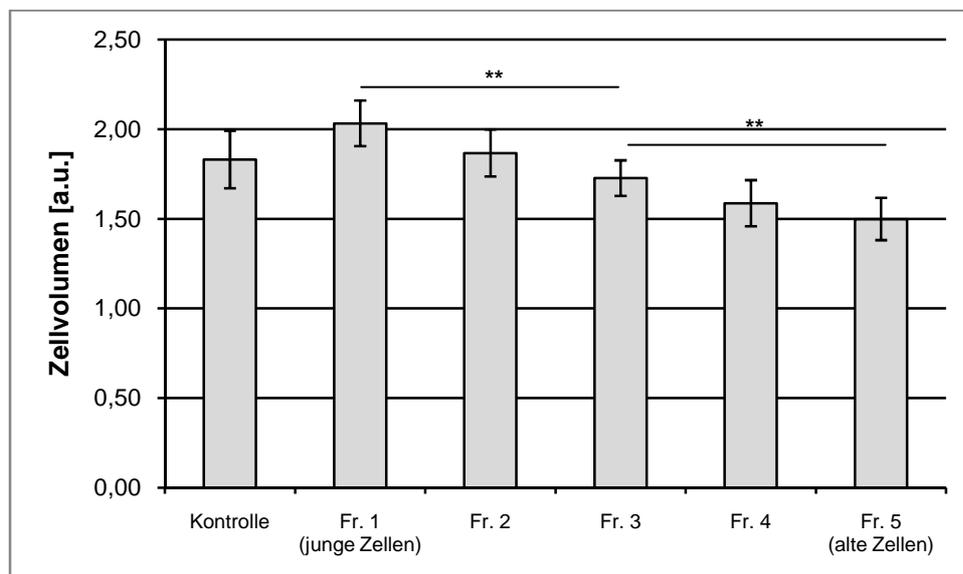


Abb. 62: Relatives Zellvolumen der Erythrozyten in den einzelnen Fraktionen. Gezeigt ist das Zellvolumen der Gesamterythrozytenpopulation (Kontrolle) und den Zellen der einzelnen Fraktionen. Fraktion 1 (jüngste Zellen) enthält die Zellen mit dem größten Zellvolumen, Fraktion 5 (älteste Zellen) die Zellen mit dem kleinsten Zellvolumen. Mittelwerte +/- S.D. aus 4 Proben, t-Test: ** $p < 0,01$.

Verhältnis der Banden 4.1a und 4.1b

In vivo gealterte Erythrozyten zeigen einen erhöhten Gehalt an Bande 4.1a und einen geringeren Gehalt an Bande 4.1b, da sich das Protein Bande 4.1b im Lauf des Erythrozytenlebens durch posttranslationale Modifikationen zu Bande 4.1a umwandelt. Das Verhältnis der beiden Proteine zueinander liefert also ein sicheres Indiz für das Zellalter [113].

Zunächst müssen die Proteine aufgetrennt werden. Wie auch in eigenen früheren Versuchen [105] hatte die gelelektrophoretische Auftrennung der Membranproteine gut funktioniert und die einzelnen Banden waren deutlich erkennbar (s. Abb. 63).

Zum Nachweis, dass es sich definitiv um die Banden 4.1a und 4.1b handelt wurde, wie bereits in früheren Versuchen [105], ein Western Blot durchgeführt (s. Abb. 64), der die Identität der Banden zweifelsfrei belegte.

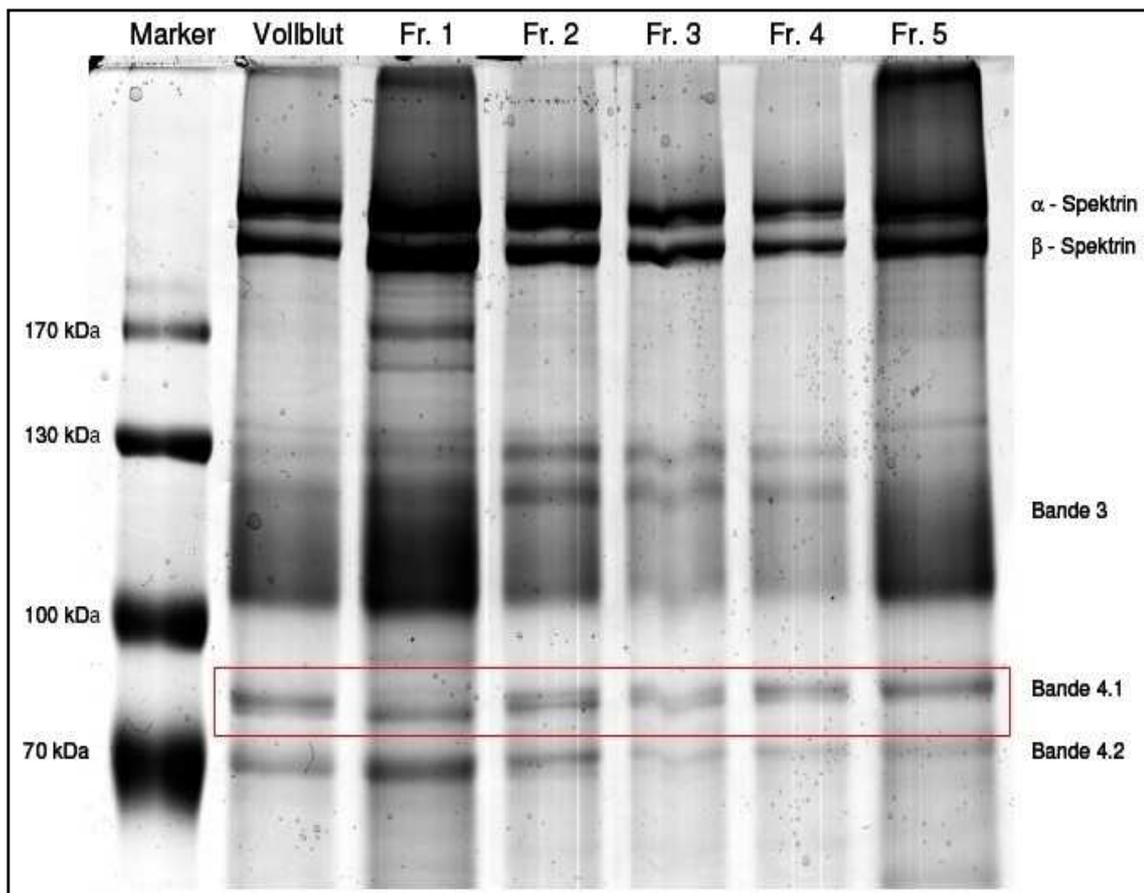


Abb. 63: Gelelektrophoretische Auftrennung der Membranproteine dichteseparierter Erythrozyten.

Rot markiert sind die Banden der Proteine 4.1a und 4.1b (in Zusammenarbeit mit Laura Hertz).

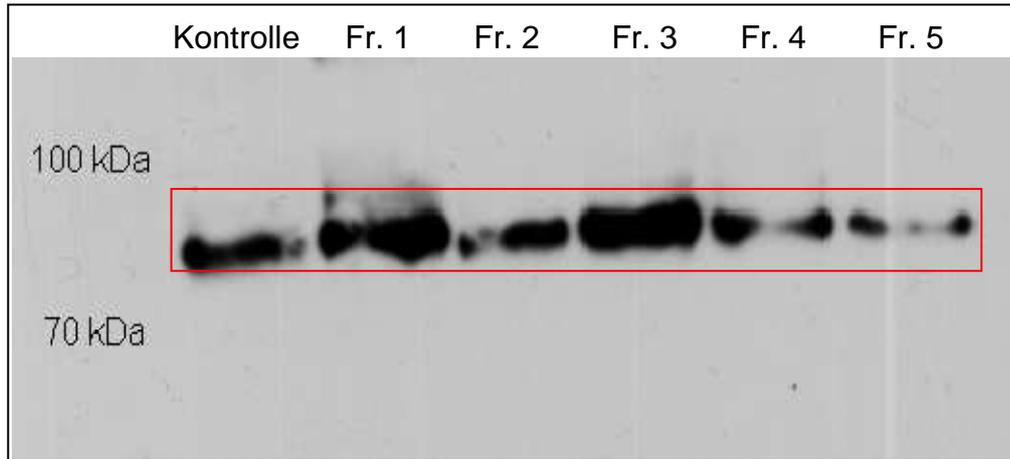


Abb. 64: Western Blot gegen das Protein Bande 4.1. Die rote Markierung zeigt die betreffende Bande in der Kontrollprobe bzw. den einzelnen Fraktionen (in Zusammenarbeit mit Laura Hertz).

Da die Identität der Banden nachgewiesen wurde, konnte das Gel eingescannt und die Intensitäten der Banden bzw. im Anschluss das Verhältnis der Intensitäten ermittelt werden. Eine Schlussfolgerung aus Intensität der Proteinbande und Proteinkonzentration ist möglich, da beide einem linearen Verlauf folgen [114]. Abbildung 65 zeigt die berechneten Intensitätsverhältnisse.

Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5
0,179	0,604	0,722	2,777	> 3

Abb. 65: Intensitätsverhältnisse der Banden 4.1a und 4.1b der einzelnen Fraktionen. Berechnet wurden die Werte aus den Intensitäten, die anhand der Auswertung des Gels erfasst wurden (in Zusammenarbeit mit Laura Hertz).

Literaturwerte geben für junge Zellen einen Wert von 0,1 an, für alte Zellen einen Wert >1 [113]. Die Auswertung des Verhältnisses der beiden Banden zueinander belegt, dass die Dichteseperation gut funktioniert.

III.9.2 PS-Exposition in Erythrozyten unterschiedlichen Zellalters nach Aktivierung der Zellen mit A231287, LPA und PMA

Die Erythrozyten wurden mittels Percoll-Separation aufgetrennt, gewaschen und dann wie oben beschrieben für die Versuche mit A23187, LPA und PMA verwendet. Es wurde jeweils die Größe der Population mit PS-Exposition bzw. erhöhtem intrazellulärem Ca²⁺-Gehalt analysiert.

Aktivierung der dichteseparierten Zellen mit A23187

Abbildung 66 und 67 zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Zellen mit PS-Exposition oder erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt gibt zwischen jungen, mittleren und alten Zellen, wenn die Erythrozyten für 30 min mit 2 μM A23187 inkubiert wurden.

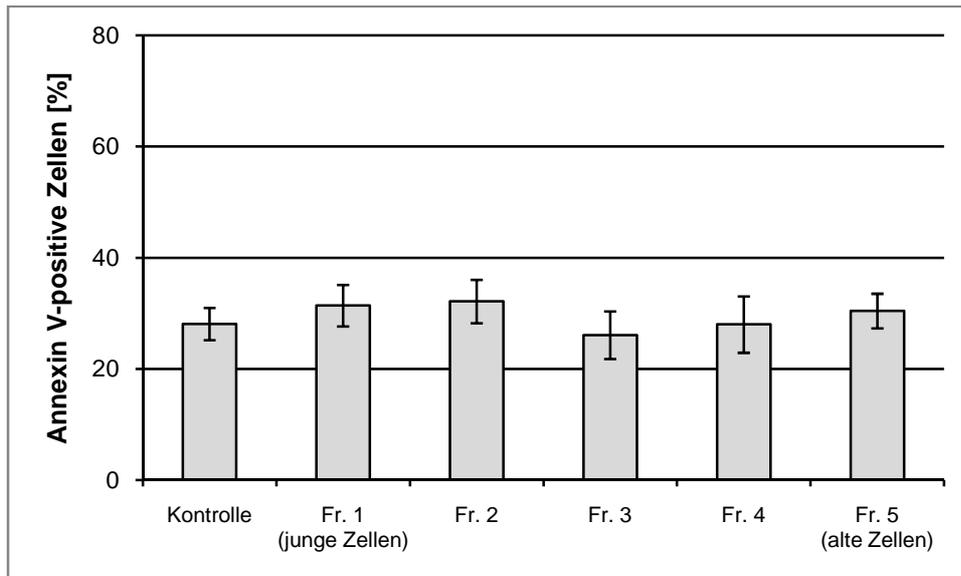


Abb. 66: Annexin V-positive Zellen der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2 μM A23187. Gezeigt sind die Annexin V-positiven Zellen der Gesamterthrozytenpopulation (Kontrolle) und Zellen der unterschiedlichen Fraktionen nach Inkubation mit A23187 für 30 min. Mittelwerte +/- S.D. aus 4 Proben.

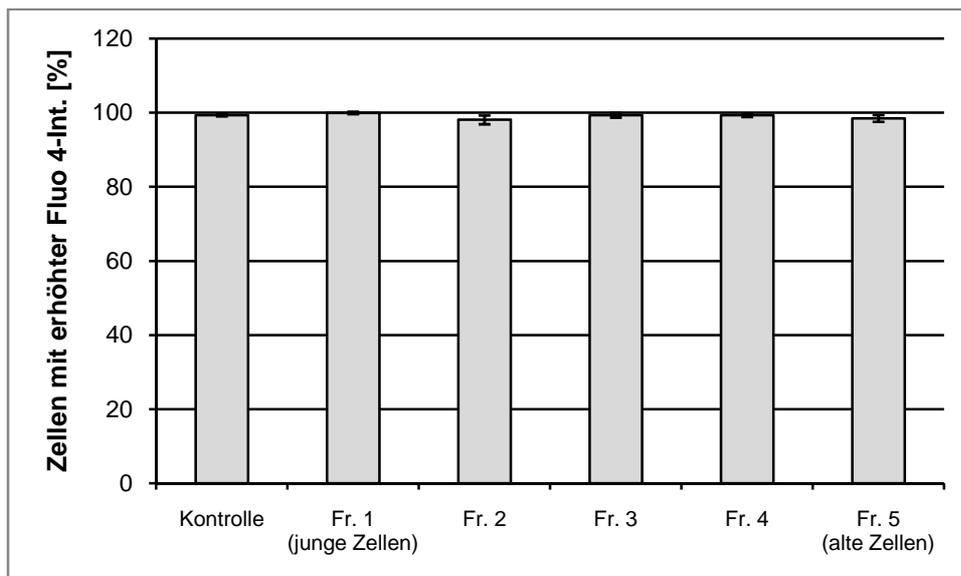


Abb. 67: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2 μM A23187. Gezeigt sind die Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der Gesamterthrozytenpopulation (Kontrolle) und Zellen der unterschiedlichen Fraktionen nach Inkubation mit A23187 für 30 min. Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Proben.

Aktivierung der dichteseparieren Zellen mit LPA

Nach Inkubation der dichteseparieren Erythrozyten mit 2,5 μM LPA für 30 s ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellbar hinsichtlich PS-Exposition oder erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt (s. Abb. 68 und 69).

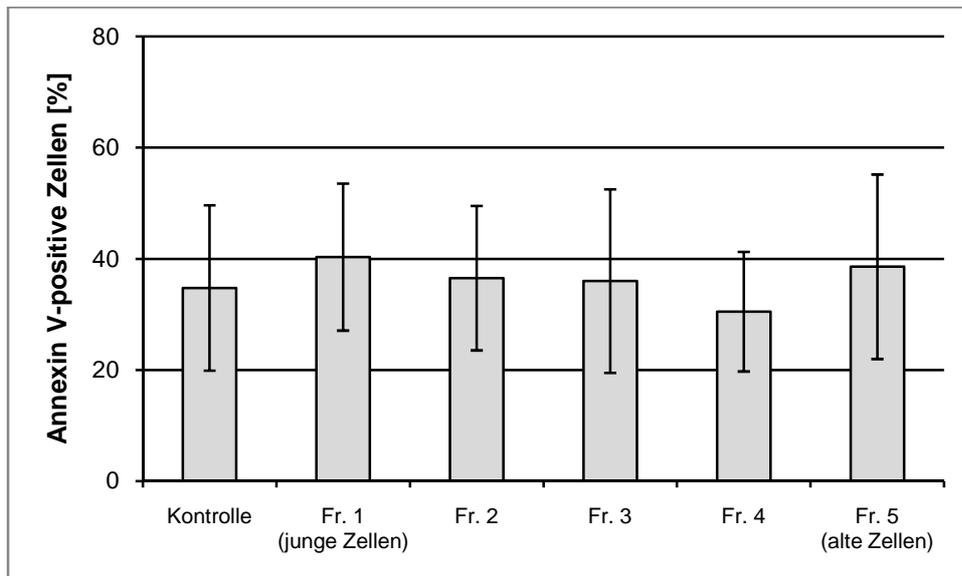


Abb. 68: Annexin V-positive Zellen der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2,5 μM LPA. Gezeigt sind die Annexin V-positiven Zellen der Gesamterthrozytenpopulation (Kontrolle) und Zellen der unterschiedlichen Fraktionen nach Inkubation mit LPA für 30 s. Mittelwerte \pm S.D. aus 4 Proben.

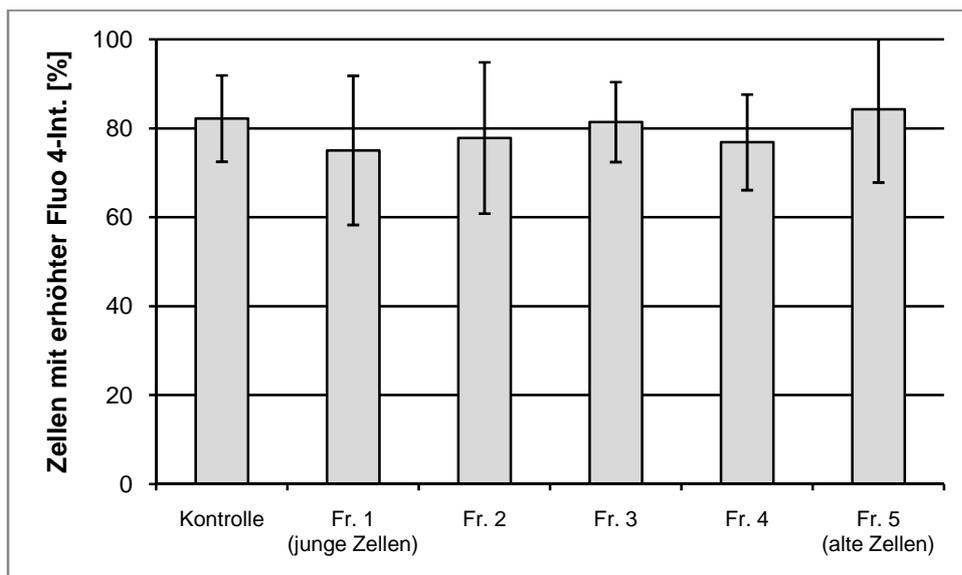


Abb. 69: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 2,5 μM LPA. Gezeigt sind die Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der Gesamterthrozytenpopulation (Kontrolle) und Zellen der unterschiedlichen Fraktionen nach Inkubation mit LPA für 30 s. Mittelwerte \pm S.D. aus 4 Proben.

Aktivierung der dichteseparierten Zellen mit PMA

Wie auch schon für A23187 und LPA zeigt sich nach einer Inkubation mit 6 μM PMA für 30 min kein Unterschied zwischen den Erythrozyten unterschiedlichen Zellalters hinsichtlich PS-Exposition und erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt (s. Abb. 70 und 71).

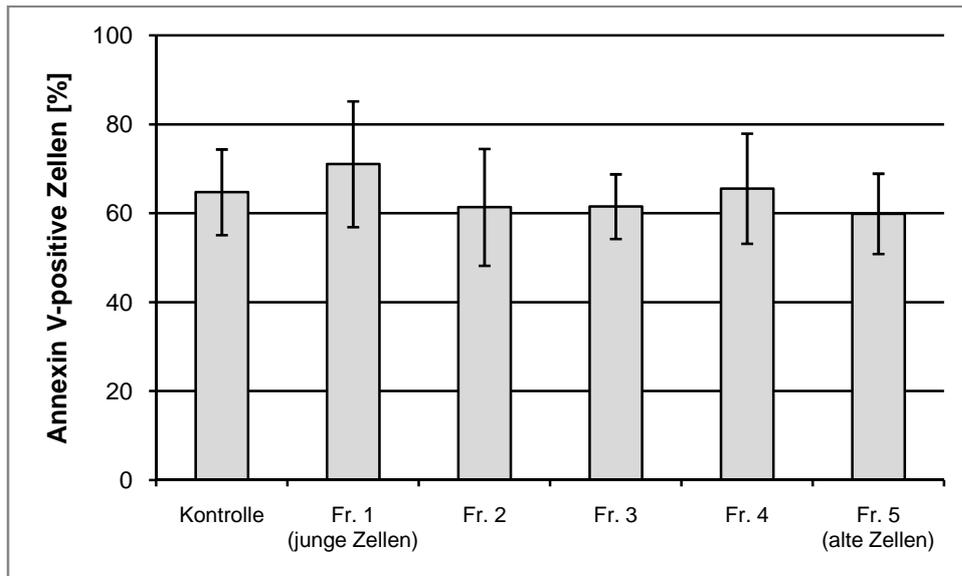


Abb. 70: Annexin V-positive Zellen der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 6 μM PMA. Gezeigt sind die Annexin V-positiven Zellen der Gesamterthrozytenpopulation (Kontrolle) und Zellen der unterschiedlichen Fraktionen nach Inkubation mit PMA23187 für 30 min. Mittelwerte \pm S.D. aus 5 Proben.

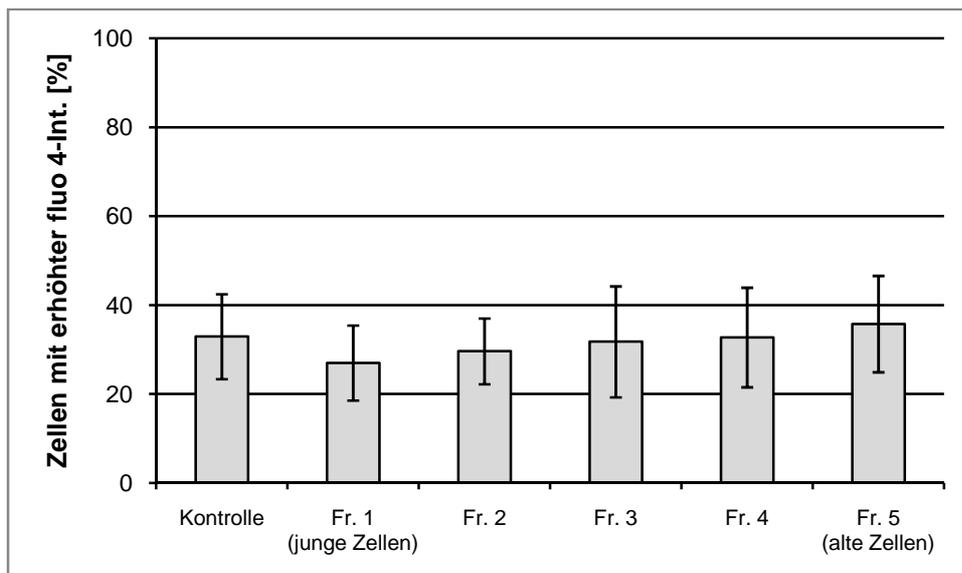


Abb. 71: Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der einzelnen Fraktionen nach Inkubation mit 6 μM PMA. Gezeigt sind die Zellen mit erhöhter Fluo 4-Intensität der Gesamterthrozytenpopulation (Kontrolle) und Zellen der unterschiedlichen Fraktionen nach Inkubation mit PMA für 30 min. Mittelwerte \pm S.D. aus 3 Proben.

IV. Diskussion

Kalibrierungen

Die Kalibrierungen waren notwendig, um die jeweils besten Resultate bezüglich PS-Exposition und Ca^{2+} -Anstieg zu finden. D.h. die Population von Erythrozyten mit PS-Exposition sollte so groß wie möglich sein, die Hämolyserate im Gegenzug jedoch so gering wie möglich. Für A23187, LPA und PMA wurden in diesen Versuchen jeweils Konzentration und Inkubationszeit ermittelt, die zu den gewünschten Ergebnissen führten. Zudem war es nun möglich die Resultate, die mit den drei Substanzen erzielt wurden, miteinander zu vergleichen. Da für den Scramblase-Inhibitor R5421 nur sehr wenige, spärliche Angaben vorlagen, musste hier ebenfalls eine Kalibrierung durchgeführt werden. Ziel war eine größtmögliche Inhibierung der PS-Exposition bei gleichzeitig niedriger Hämolyserate. Auch hier wurde eine akzeptable Kombination aus verwendeter Konzentration und Inkubationszeit gefunden. Für den Inhibitor der PKC, Chelerythrin, war dies nicht nötig. Für diese Substanz liegen in der Literatur ausreichend Erfahrungswerte vor [4, 61], auf die zurückgegriffen werden kann.

Analyse der Population mit PS-Exposition und erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt nach Aktivierung der Zellen mit A23187, LPA und PMA

Nach Inkubation mit A23187 reagierten weniger als ein Drittel der Zellen (27,9%) mit PS-Exposition, jedoch alle Zellen (99,3%) mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} (s. Abb. 34 und 35). D.h. obwohl fast 100% der Erythrozyten erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} zeigen, führt dies nur in weniger als einem Drittel der Zellen zur PS-Exposition. Bei LPA verhält es sich ähnlich. Ein Drittel der Zellen (34,3%) weisen PS-Exposition auf, der Großteil der Zellen (82,2%) haben einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt. Bei beiden Substanzen ist somit auffällig, dass nur jeweils eine kleine Population der Zellen, die erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} zeigt, auch PS zur Membranaussenseite transportiert. Die Versuche mit PMA lieferten interessante Ergebnisse, denn PMA ruft den umgekehrten Effekt hervor: Mehr als zwei Drittel der Zellen (68,2%) zeigen PS-Exposition, wohingegen nur ca. ein Drittel der Erythrozyten (32,9%) ihren intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt erhöht haben. D.h. die Population mit PS-Exposition ist doppelt so groß wie die Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt. Dies ist

erstaunlich, da eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} als Schlüsselereignis für die PS-Exposition angesehen wird.

Die mit A23187, LPA und PMA erzielten Ergebnisse sprechen demnach definitiv für die Existenz zweier verschiedener Signalwege, die nach einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts als initialem Signal zur Aktivierung der Scramblase und schließlich zur PS-Exposition führen. Wie die Ergebnisse der A23187- und LPA-Versuche zeigen, ist nicht die Ca^{2+} -Erhöhung alleine verantwortlich für die Aktivierung der Scramblase. Sonst müssten alle Zellen, deren Ca^{2+} -Gehalt erhöht ist, auch automatisch eine PS-Exposition zeigen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die mit PMA durchgeführten Versuche unterstützen die Hypothese, dass es einen zweiten Mechanismus zur Aktivierung der Scramblase geben muss. Einen Signalweg also, der sich vom durch A23187- oder LPA-induzierten Mechanismus unterscheidet. Die erzielten Ergebnisse unterstützen einerseits die von Bevers und Williamson aufgestellte Hypothese, dass es in Zellen des hämatopoietischen Systems neben dem Ca^{2+} -abhängigen Weg einen weiteren, Ca^{2+} -unabhängigen Weg gibt, der zur Apoptose führt [37]. Dies wäre eine Erklärung für die in den PMA-Versuchen erzielte hohe Zahl an Erythrozyten mit PS-Exposition, die aber gleichzeitig kein erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} besitzen. Die PS-Exposition könnte in diesem Fall auf einem bisher unbekanntem Weg induziert worden sein, der kein erhöhtes Ca^{2+} als Schlüsselsignal benötigt. Andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass in den Zellen mit PS-Exposition, aber ohne erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} , das Calcium zum Zeitpunkt der Messung auch schlicht bereits wieder hinaus gepumpt wurde. Denn eine Aktivierung der PKC bewirkt auch eine erhöhte Aktivität der Ca^{2+} -Pumpe [60]. Aufgrund dieser erhöhten Pumpaktivität wäre es denkbar, dass zum Zeitpunkt der Messung in einem Großteil der Zellen das Ca^{2+} bereits wieder hinaus gepumpt wurde. Es war intrazellulär also zunächst vorhanden, hat die PS-Exposition induziert, wurde dann aber wieder hinaus transportiert. Diese zweite mögliche Erklärung bietet ebenfalls eine plausible Erklärung für die erzielten Ergebnisse, steht jedoch in keinem Widerspruch zu der Hypothese, dass zwei unterschiedliche Wege zur PS-Exposition existieren. Eine Aktivierung der Zellen mit LPA führt nämlich zu einem komplett gegensätzlichen Bild, was PS-Exposition und Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt betrifft. Und auch die Ca^{2+} -Pumpe, die durch den LPA-induzierten Ca^{2+} -Einstrom aktiviert wird ist nicht dazu in der Lage, den intrazellulären

Ca²⁺-Gehalt soweit zu senken, wie es in den mit PMA durchgeführten Versuchen der Fall ist.

Zusätzlich zur Analyse von PS-Exposition und intrazellulärem Ca²⁺-Gehalt wurde noch untersucht, welchen Einfluss A23187, LPA und PMA auf das Zellvolumen der Erythrozyten haben. Nur A23187, welches eine artifizielle und starke Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Gehaltes zur Folge hat, bewirkt eine signifikante Änderung des Zellvolumens (s. Abb. 33 und Abb. 36). LPA und PMA, die beide *in vivo* auftretende Signalwege induzieren, bewirken keine signifikante Änderung des Zellvolumens. Sie führen lediglich zu einer Formveränderung der Erythrozyten, denn in beiden Fällen werden die Zellen runder (s. Abb. 33). D.h. unter diesen physiologischeren Bedingungen sind die Erythrozyten dazu in der Lage, ihr Zellvolumen konstant zu halten. Sind die Zellen jedoch hohen Konzentrationen oder langen Inkubationszeiten ausgesetzt, werden sie apoptotisch und schrumpfen schließlich [16, 20, 21].

Eine gleichzeitige Aktivierung beider Signalwege, die durch gleichzeitige oder direkt hintereinander ausgeführte Aktivierung der Zellen mit LPA und PMA erreicht werden sollte, hat keine Ergebnisse erzielt. Die Größe der Population mit PS-Exposition konnte nicht weiter erhöht werden als in den Versuchen, die mit PMA alleine durchgeführt wurden. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Maximum an Zellen mit PS-Exposition bereits durch die Verwendung von PMA erreicht wurde und die restlichen Zellen aus bislang ungeklärter Ursache nicht sensitiv für eine Aktivierung durch LPA und PMA sind. Denkbar wäre auch, dass eine Induktion beider Signalwege unter den gegebenen Versuchsbedingungen schlicht nicht möglich ist.

Inhibierung der Scramblase mit R5421

Eine Inhibierung der Scramblase mit R5421 reduzierte die A23187-induzierte PS-Exposition ebenso wie die LPA- und PMA-induzierte PS-Exposition (s. Abb. 39). Im Falle von A23187 konnte die Zahl der Erythrozyten mit PS-Exposition nach vorangehender Inhibierung der Scramblase um 79,6% gesenkt werden, im Falle von LPA um 42,9% und im Falle von PMA um 39,9%. Bemerkenswert ist, dass die durch A23187 induzierte PS-Exposition, welche aus einer künstlichen Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Gehaltes resultiert, durch eine Inhibierung der Scramblase um fast 80% gesenkt werden kann. Bei LPA und PMA hingegen, die vermutlich unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktivieren, kann der prozentuale Anteil an

Zellen mit PS-Exposition nur um jeweils ca. 40% reduziert werden. Betrachtet man jedoch die absoluten Zahlen, so verbleibt nach Inhibierung der Scramblase durch R5421 nach Aktivierung mit A23187 noch ein kleiner Rest an Zellen mit PS-Exposition (5,7%). Nach einer Aktivierung mit LPA zeigen immerhin noch 20,2% der Zellen PS-Exposition und nach Aktivierung mit PMA sind es trotz inhibierter Scramblase noch 41,0% Zellen mit exponiertem PS. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass die rein Ca^{2+} -induzierte PS-Exposition, die durch A23187 induziert wird, durch Verwendung des Inhibitors geblockt wird. Wohingegen der Ca^{2+} -unabhängige Mechanismus, der durch die Verwendung von LPA und vor allem durch PMA aktiviert wird, weiter funktioniert. Da der genaue Wirkmechanismus von R5421 nach wie vor unbekannt ist lässt sich weiter spekulieren, wie diese Ergebnisse zustande kommen. Denkbar wäre auch, dass R5421 ein Signalintermediat des Aktivierungsweges blockt, das zur Aktivierung der Scramblase nötig ist. Bei LPA und PMA, die beide *in vivo* vorkommende, physiologische Prozesse aktivieren, könnten diese Intermediate im Gegensatz zur A23187-Aktivierung verstärkt auftreten und nach wie vor zu einer PS-Exposition in 20,2% (LPA) bzw. 41,0% (PMA) der Zellen führen.

Zumindest teilweise hat R5421 einen Einfluss auf die Größe der Zellpopulation, die mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt reagiert (s. Abb. 40). Bei A23187 ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Populationen mit erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt durch die Verwendung des Inhibitors. Im Falle von LPA hingegen ist die Population an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt nach einer Vorinkubation mit R5421 um 14,5% erhöht. Die Erklärung hierfür ist relativ simpel. Durch eine Inkubation mit LPA werden die Erythrozyten gestresst. Dies beweist alleine die Tatsache, dass eine längere Inkubation der Erythrozyten mit LPA (> 1 min) zur Hämolyse vieler Zellen führt. Werden die Zellen nun in R5421 vorinkubiert, gewaschen und anschließend mit LPA inkubiert, erhöht dies den Stressfaktor für die Zellen beträchtlich, so dass mehr Zellen ein erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} -Level besitzen. Bei den mit PMA erzielten Ergebnissen zeigt sich ein gegensätzliches Bild. Wird die Scramblase mit R5421 inhibiert und anschließend erfolgt eine Aktivierung der PKC mit PMA, verkleinert sich die Population der Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt um 43,8%. Zunächst einmal liegt dies daran, dass die Zellen durch eine Inkubation mit PMA nicht in gleichem Maß gestresst werden, wie dies durch Verwendung von LPA der Fall ist. Eine mögliche Erklärung für die stark

verkleinerte Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt ist, dass die Ca^{2+} -Pumpe durch eine Inhibierung der Scramblase noch stärker aktiviert wird, als dies durch die Verwendung von PMA schon alleine der Fall ist. Unter diesen Umständen wurde das Ca^{2+} zum Zeitpunkt der Messung aus einem noch größeren Anteil der Zellen bereits wieder hinaus transportiert. Eine weitere mögliche Erklärung wäre auch, dass eine Inhibierung der Scramblase durch R5421 auf einem bisher unbekanntem Weg dazu führt, dass die Wirkung der PKC reduziert wird. Dies würde dann nicht nur die verkleinerte Population an Erythrozyten mit PS-Exposition erklären, sondern auch die Verringerung der Populationsgröße in Bezug auf den erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt. Da die PKC nach ihrer Aktivierung zu einer weiteren Verstärkung des Ca^{2+} -Einstromes führt, würde eine inhibierte PKC eine gute Erklärung für die verminderte Ca^{2+} -Aufnahme liefern, da die verstärkende Wirkung somit wegfällt.

Die durch A23187, LPA und PMA induzierten morphologischen Veränderungen stehen in keinem direkten Bezug zu PS-Exposition und intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt, denn eine Vorinkubation mit R5421 wirkt diesen Veränderungen nicht entgegen.

Inhibierung der PKC mit Chelerythrin

Eine Inhibierung der PKC mittels Chelerythrin zeigt lediglich eine Auswirkung auf die durch PMA induzierten Mechanismen (s. Abb. 42 und Abb. 43). In den mit A23187 und LPA durchgeführten Versuchen zeigten sich keine signifikanten Änderungen in PS-Exposition oder intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt, wenn die Erythrozyten zuvor mit Chelerythrin inkubiert wurden. Die Größe der Population mit PS-Exposition blieb jeweils gleich groß, ob die PKC nun inhibiert wurde oder nicht. Die Größe der Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} blieb ebenfalls in beiden Fällen unverändert. Die PMA-induzierte PS-Exposition wurde durch eine Inhibierung der PKC um 38,1% verringert. Die Größe der Population mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt verringerte sich um 55,3%. Diese Ergebnisse belegen zwei Dinge. Zum einen wird deutlich, dass durch eine Inhibierung der PKC der verstärkte Ca^{2+} -Einstrom, der als Folge einer PKC-Aktivierung üblicherweise auftritt, abgeschwächt wird. Dies liefert auch eine Erklärung für die verringerte Populationsgröße der Zellen mit PS-Exposition. Zum anderen belegen diese Versuche, dass es sich beim durch LPA induzierten Mechanismus um einen Weg handelt, der vom PMA-induzierten

Mechanismus verschieden sein muss. Denn eine Inhibierung der PKC mittels Chelerythrin hat überhaupt keinen Einfluss auf den durch LPA induzierten Signalweg.

Gleichzeitige Inhibierung von Scramblase und PKC

Eine gemeinsame Inhibierung von Scramblase und PKC erbrachte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine weitere Reduktion in der Größe der Population mit PS-Exposition bzw. erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt, wenn die Zellen mit A23187 oder PMA induziert wurden. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch den Einsatz von R5421 bzw. Chelerythrin bereits die maximal mögliche Reduktion erreicht wird. Denkbar wäre auch, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine weitere Reduzierung der PS-Exposition aus bislang unbekannter Ursache nicht möglich ist.

Nach einer Inkubation mit LPA waren die Ergebnisse nicht auswertbar, da durch eine Vorinkubation mit beiden Inhibitoren und anschließender Inkubation mit LPA die Zellen so stark gestresst waren, dass die Hämolyserate zu hoch war.

Inhibierung des K^+ -Effluxes durch Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration

Im Falle von A23187 wird die Größe der Population mit PS-Exposition um 57,0% reduziert, wenn die Versuche in physiologischer Lösung mit erhöhter extrazellulärer K^+ -Konzentration durchgeführt werden. Unter diesen Versuchsbedingungen wird der Ausstrom der K^+ -Ionen nach einer Öffnung des Gardos-Kanals inhibiert, was als Resultat eine verringerte PS-Exposition zur Folge hat. Bei Verwendung von LPA wird die Populationsgröße unter den gleichen Versuchsbedingungen um 40,8% verringert (s. Abb. 51). Anders verhält es sich, wenn die Erythrozyten mit PMA angeregt werden. Es findet sich keine Reduktion der PS-Exposition, wenn der K^+ -Ausstrom geblockt wird. Unter diesen Versuchsbedingungen ergibt sich ein umgekehrtes Bild zu den Versuchen, in denen die PKC mit Chelerythrin inhibiert wurde: Bei einer Inhibierung des K^+ -Effluxes wird der A23187- und LPA-induzierte Mechanismus, der zur PS-Exposition führt, zumindest in einem Teil der Zellen geblockt. Der durch PMA induzierte Mechanismus hingegen wird nicht beeinflusst. Die Population an Zellen mit PS-Exposition ist bei beiden Versuchsbedingungen gleich groß. Diese

Ergebnisse liefern einen weiteren Nachweis dafür, dass es sich beim durch LPA und PMA induzierten Mechanismus um zwei jeweils verschiedene Signalwege handelt. Sowohl bei einer Anregung der Zellen durch A23187 als auch durch LPA bewirkt eine reine Inhibierung des K^+ -Effluxes, dass die PS-Exposition in einem Großteil der Zellen nicht stattfindet. Womit der Ausstrom von K^+ -Ionen als Trigger für die PS-Exposition zumindest im durch LPA induzierten Signalweg belegt ist.

Die Analyse des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes ergab, dass sich die Population an Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} in der 7,5 mM KCl-Lösung und der 150 mM KCl-Lösung weder bei Verwendung von A23187, noch bei Verwendung von LPA oder PMA voneinander unterschied (s. Abb. 52). Bei beiden Versuchsbedingungen erfolgte der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} demnach jeweils in eine gleich große Population an Zellen. Somit ist gesichert, dass die Inhibierung des K^+ -Effluxes im Falle von A23187 und LPA verantwortlich ist für die reduzierte PS-Exposition und nicht der Ca^{2+} -Einstrom.

Einfluss des Zellvolumens auf die PS-Exposition

Die Überlegung war, ob das Zellvolumen selbst einen direkten Einfluss auf die PS-Exposition besitzen könnte. D.h. ob eine Veränderung im Volumen ein Trigger zum Auswärtstransport von PS darstellt. Altern Erythrozyten oder werden sie eryptotisch, kommt es zu einer Änderung im Zellvolumen, neben weiteren Faktoren wie z.B. dem Auswärtstransport von PS. Unklar war bisher, ob die gleichzeitig auftretenden Vorgänge PS-Exposition und Volumenänderung miteinander in Zusammenhang stehen oder ob sie bloß zwei parallel ablaufende, voneinander unabhängige Begleiterscheinungen von Alterungsprozess und Eryptose sind. Lang et al. vermuteten, dass ein Schrumpfen der Zellen eventuell am Triggering der Scramblase beteiligt sein könnte [115]. Zur Überprüfung eines mutmaßlichen Zusammenhangs der Faktoren wurde das Volumen der Erythrozyten experimentell verändert, indem die Zellen einmal in „Shrinking Solution“ Lösung gegeben wurden, in der es aufgrund von einer erhöhten Osmolarität zum Schrumpfen der Erythrozyten um ca. 10% kommt. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen in „Swelling Solution“ inkubiert, worin sie um ca. 10% anschwellen.

Die Frage, ob eine reine Änderung des Zellvolumens als Trigger für die PS-Exposition in Frage kommt, kann nach Auswertung der erhaltenen Ergebnisse

eindeutig mit „Nein“ beantwortet werden. Ein Schrumpfen bzw. Anschwellen der Erythrozyten hat keine PS-Exposition zur Folge (s. Abb. 54). Die Volumenänderung, die unter bestimmten experimentellen Bedingungen (z.B. nach Inkubation mit A23187) bzw. *in vivo* auftritt, ist also eine Begleiterscheinung intrazellulär ablaufender Prozesse und kein eigenständiger Trigger für die PS-Exposition.

Einfluss des pH-Wertes auf die PS-Exposition

Bucki et al. mutmaßten in einer 2005 veröffentlichten Publikation, dass der intrazelluläre pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die PS-Exposition haben könnte bzw. dass eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes nötig sei, damit die PS-Exposition überhaupt stattfinden könne [86]. Der in der Publikation diskutierte, durch A23187 ausgelöste Effekt wurde hierbei mit der auftretenden intrazellulären Alkalisierung in Zusammenhang gebracht. Eine Aktivierung des NHE führt durch den auftretenden Na^+ -Influx zur PS-Exposition in Thrombozyten. Dies ist jedoch nur der Fall, wenn zeitgleich eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes stattfand [86].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen intrazellulärem pH-Wert und PS-Exposition untersucht. Steht der durch A23187 ausgelöste Effekt in Zusammenhang mit einer intrazellulären Alkalisierung, so müsste eine verstärkte Alkalisierung des Intrazellularraumes eine im Vergleich zu Kontrollbedingungen verstärkte PS-Exposition zur Folge haben. Die PS-Exposition wurde einmal in einer Kontrolllösung mit physiologischem pH-Wert ermittelt (pH 7,4) und einmal in einer Lösung mit einem pH-Wert von 8,0 (s. Abb. 55). Befinden sich die Erythrozyten in einer Lösung mit erhöhtem pH-Wert, steigt der intrazelluläre pH-Wert der Zellen ebenfalls leicht an [106, 107]. Die Messungen ergaben jedoch, dass der pH-Wert selbst keinen Einfluss auf die PS-Exposition hat. Eine Alkalisierung des Intrazellularraumes wirkt sich nicht verstärkend auf die PS-Exposition aus und kann somit als Trigger für die PS-Exposition vernachlässigt werden. Vielmehr ist die auftretende Alkalisierung eine Folge der Aktivierung des NHE, jedoch kein eigenständiger Trigger.

Einfluss des Zellalters auf PS-Exposition und intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt

Kontrollversuche zur Auftrennung in verschiedene Altersklassen mittels Percoll-Separation

Die dichteseparieren Erythrozyten wurden nach der Dichtegradientenzentrifugation auf mögliche PS-Exposition untersucht und der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt wurde analysiert. Es sollte vor der Durchführung weiterer Experimente sichergestellt werden, dass die Auftrennung in der Percoll-Lösung selbst keinen Einfluss auf die PS-Exposition und den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt hat. Dies konnte zweifelsfrei belegt werden (s. Abb. 57 und Abb. 58). Nachdem dies sichergestellt war galt es herauszufinden, ob die Methode eine verlässliche Auftrennung der Erythrozyten in die verschiedenen Altersklassen erbrachte. Hierzu wurden weitere Parameter analysiert: Anzahl der Retikulozyten in den einzelnen Fraktionen, Aktivität des PMRS, Analyse des Zellvolumens und Auswertung des Verhältnisses der Proteine Bande 4.1a und 4.1b.

Die Analyse der Retikulozytenzahl in den einzelnen Fraktionen ergab, dass sich die Retikulozyten nach der Separation fast ausschließlich in Fraktion 1, also der Fraktion mit den jüngsten Zellen, befanden (s. Abb. 59). Dies lieferte einen ersten Hinweis auf die Funktionalität der Methode und stellte zudem sicher, dass die anderen Fraktionen nicht mit Retikulozyten verunreinigt sind.

Die Aktivität des PMRS nimmt mit zunehmendem Zellalter ab [111], weshalb dieses Redoxsystem ein guter Indikator für die Verlässlichkeit der verwendeten Separationsmethode darstellt. Ist das Redoxsystem weniger aktiv, wird weniger Ferrocyanid gebildet, was als sicherer Indikator für die verringerte Aktivität des PMRS und damit dem höheren Zellalter dient. Die durchgeführten Versuche bestätigten, dass die Redoxaktivität mit zunehmendem Zellalter signifikant abnimmt (s. Abb. 60).

Auch das Zellvolumen unterschied sich zwischen den jüngsten, mittleren und ältesten Erythrozyten signifikant (s. Abb. 61 und Abb. 62). Die Analyse dieser beiden Faktoren, Aktivität des PMRS und Zellvolumen, weisen recht sicher nach, dass die Percoll-Separation in unserem Labor erfolgreich etabliert wurde und eine verlässliche Auftrennung der verschiedenen Altersklassen ermöglicht. Ein weiterer, sehr sicherer Nachweis des Zellalters, kann durch die Analyse des Verhältnisses der Proteine

Bande 4.1a und 4.1b erbracht werden [109, 113]. Anhand dieses Indikators sollte ausgeschlossen werden, dass die Aktivität von Proteinen wie z.B. dem PMRS, lediglich auf Volumeneffekte zurückzuführen ist und eventuell gar nicht in direktem Zusammenhang mit dem Zellalter selbst steht. Die Auswertung des Verhältnisses der Proteine Bande 4.1a und 4.1b (s. Abb. 64) ergab jedoch, dass die Auftrennung der Erythrozyten mittels Percoll-Separation sehr zuverlässig funktioniert und die Auftrennung selbst keinen Einfluss auf die Zellen ausübt. Unterschiede in der Aktivität von Proteinen sind nach Auswertung der Ergebnisse nicht bloß auf Volumenänderungen zurückzuführen und die verschiedenen Altersklassen sind weder durchmischt noch mit Zellen anderer Altersklassen „verunreinigt“.

Analyse der Populationen mit PS-Exposition und erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt in Erythrozyten unterschiedlichen Zellalters nach Aktivierung der Zellen mit A231287, LPA und PMA

Nachdem die Dichteseparation in unserem Labor erfolgreich etabliert werden konnte und sich als zuverlässige Methode erwiesen hatte, wurde die PS-Exposition in den verschiedenen Altersklassen analysiert. Hierzu erfolgte eine Inkubation der Zellen mit A23187, LPA und PMA (s. Abb. 66, 68, 70). Die Analyse ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Erythrozyten unterschiedlichen Zellalters. Das gleiche Ergebnis ergab sich, wenn die Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt analysiert wurden (s. Abb. 67, 69, 71) Im Vergleich zur Kontrollprobe, die die Gesamterthrozyten vor der Separation enthielt, konnte in beiden Fällen keine signifikante Veränderung ausgemacht werden. Die Tatsache, dass immer eine Population der Erythrozyten auf die Stimulierung mit A23187, LPA und PMA mit PS-Exposition bzw. einem erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt reagiert und ein anderer Teil nicht sensitiv ist, hängt demnach nicht mit dem Alter der Zellen zusammen. Das Zellalter und der damit einhergehende Funktionsverlust etlicher Proteine kann als Erklärung für die Tatsache, dass es Erythrozyten gibt, die nicht mit PS-Exposition reagieren, ausgeschlossen werden. Vermutet werden könnte, dass die Unterschiede in der Reaktionsweise eher mit dem Expressionslevel der beteiligten Proteine zusammenhängen oder einem anderen, bislang unbekanntem Faktor.

Literaturverzeichnis

- [1] Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage, WILEY-VCD Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004, S. 1500.
- [2] Bessis M, Delpech G, *More Microscopical Observations made by the fame Leeuwenhoek. Communicated in his letters of August 15, 1673.* Blood Cells, 1981, 7: 447-480.
- [3] Höflechner W, Wagner A, Wagner IM, Brücke HG, *Alexander Rollet, Seine Welt in Briefen 1844-1903.* Band 42/1, Akademische Druck. u. Verlagsanstalt Graz, Graz, 2012.
- [4] Andrews DA, Yang L, Low PS, *Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells.* Blood. 2002, 100: 3392-3399.
- [5] Govekar RB, Zingde SM, *Protein kinase C isoforms in human erythrocytes.* Ann. Hematol., 2001, 80: 531-534.
- [6] Horne MK 3rd, Cullinane AM, Merryman PK, Hoddeson EK, *The effect of red blood cells on thrombin generation.* Br. J. Haematol., 2006, 133: 403-408.
- [7] Harrison MJ, Pollock S, Kendall BE, Marshall J, *Effect of haematocrit on carotid stenosis and cerebral infarction.* Lancet, 1981, 18;2: 114-115.
- [8] Biochemie des Menschen, 5. Auflage, Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2012, S. 483-488.
- [9] www.di.uq.edu.au/sparq/images/haemoglobin.png.
- [10] Roche Lexikon Medizin, 4. Aufl., Urban & Fischer, 1999.
- [11] Testa U, *Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis.* Leukemia, 2004, 18: 1176-1199.
- [12] Mohandas N, Groner W, *Cell membrane and volume changes during red cell development and aging.* Ann. NY Acad. Sci., 1989, 554: 217-224.
- [13] Freikman I, Ringel I, Fibach E, *Oxidative stress-induced membrane shedding from RBCs is Ca flux-mediated and affects membrane lipid composition.* J. Membr. Biol., 2011, 240(2): 73-82.
- [14] Goodnough LT, *Red cell growth factors in patients with chronic anemias.* Curr. Hematol. Rep., 2002, 1: 119-123.
- [15] Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, 2012.

- [16] Lang F, Qadri SM, *Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes*. Blood Purif., 2012, 33: 125-30.
- [17] Silbernagl S, Despopoulos A, Taschenatlas Physiologie, 7. Auflage, 2007, Georg Thieme Verlag, S. 88-106.
- [18] Bassé F, Stout JG, Sims PJ, Wiedmer T, *Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid*. J. Biol. Chem., 1996, 271: 17205-17210.
- [19] Piomelli S, Seaman C, *Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age*. Am. J. Hematol., 1993, 42: 46-52.
- [20] Wolfs JL, Comfurius P, Bekers O, Zwaal RF, Balasubramanian K, Schroit AJ, Lindhout T, Bevers EM, *Direct inhibition of phospholipid scrambling activity in erythrocytes by potassium ions*. Cell. Mol. Life Sci., 2009, 66: 314-23.
- [21] Lang F, Birka C, Myssina S, Lang KS, Lang PA, Tanneur V, Durantion C, Wieder T, Huber SM, *Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis*. Adv. Exp. Med. Biol., 2004, 559: 211-217.
- [22] Connor J, Pak CC, Schroit AJ, *Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells*. J. Biol. Chem., 1994, 269: 2399-2404.
- [23] Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Föller M, *Ceramide in suicidal death of erythrocytes*. Cell. Physiol. Biochem., 2010, 26:21-28.
- [24] Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM, *A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells*. Nature, 2000, 405: 85-90.
- [25] Freikman I, Amer J, Ringel I, Fibach E, *A flow cytometry approach for quantitative analysis of cellular phosphatidylserine distribution and shedding*. Anal. Biochem., 2009, 393: 111-116.
- [26] Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL, *Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age*. Blood, 1992, 79: 1351-1358.
- [27] Haest, C.W.M., *Distribution and movement of membrane lipids*. In: Red cell membrane transport in health and disease. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003, S. 1-25.
- [28] *Lerninhalte: Erythrozytenmembran als Untersuchungsobjekt*, <http://lerninhalte.blogspot.de/2013/12/erythrozyten-membran-als.html>.

- [29] Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage, WILEY-VCD Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004, S. 1718.
- [30] Low PS, *Where spectrin snuggles with ankyrin*. Blood, 2009, 113: 5372-5373.
- [31] Nelson GJ, *Lipid composition and metabolism of erythrocytes*. In: Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, composition, and metabolism. Wiley Interscience, New York, 1972, S. 317-386.
- [32] Shohet SB, *Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids*. New Engl. J. Med., 1972, 286: 577-583.
- [33] Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage, WILEY-VCD Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004, S. 681.
- [34] Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM, *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells*. Cell. Mol. Life Sci., 2005, 62: 971-988.
- [35] McEvoy L, Williamson P, Schlegel RA, *Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83: 3311-3315.
- [36] Zwaal RF, Bevers EM, Comfurius P, Rosing J, Tilly RH, Verhallen PF, *Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance*. Mol. Cell. Biochem., 1989, 91: 23-31.
- [37] Bevers EM, Williamson PL, *Phospholipid scramblase: an update*. FEBS Lett., 2010, 584: 2724-2730.
- [38] Daleke DL, *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. J. Lipid Res., 2003, 44: 233-242.
- [39] Bretscher MS, *Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes*. Nat. New Biol., 1972, 236: 11-12.
- [40] Boas FE, Forman L, Beutler E, *Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1998, 95:3077-3081.
- [41] Seigneuret M, Devaux PF, *ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1984, 81: 3751-3755.
- [42] Schroit AJ, Zwaal RFA, *Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes*. Biochim. Biophys. Acta., 1991, 1071: 313-329.

- [43] Devaux PF, Zachowski A, *Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry*. Chem. Phys. Lipids, 1994, 73: 107–120.
- [44] Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF, *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*. Biochim. Biophys. Acta., 1999, 1439: 317-30.
- [45] Tang X, Halleck MS, Schlegel RA, Williamson P, *A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity*. Science, 1996, 272: 1495-1497.
- [46] Daleke DL, Huestis WH, *Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes*. Biochemistry, 1985, 24: 5406-5416.
- [47] Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T, *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb. Haemost., 2002, 88: 186-193.
- [48] Bitbol M, Fellmann P, Zachowski A, Devaux PF, *Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes*. Biochim. Biophys. Acta., 1987, 904: 268-282.
- [49] Bitbol M, Devaux PF, *Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85: 6783–6787.
- [50] Connor J, Pak CH, Zwaal RFA, Schroit AJ, *Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells*. J. Biol. Chem., 1992, 267: 19412–19417.
- [51] Dekkers DW, Comfurius P, van Gool RG, Bevers EM, Zwaal RF, *Multidrug resistance protein 1 regulates lipid asymmetry in erythrocyte membranes*. Biochem. J., 2000, 350: 531-535.
- [52] Williamson P, Christie A, Kohlin T, Schlegel RA, Comfurius P, Harmsma M, Zwaal RF, Bevers EM, *Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes*. Biochemistry, 2001, 40: 8065-8072.
- [53] Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF, *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*. Biochim. Biophys. Acta., 1999, 1439: 317-330.
- [54] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2003, S. 359-366.

- [55] Bernhardt I, *Biomembranen – Wächter des zellulären Grenzverkehrs. Von Pumpen, Carriern und Kanälen*. Biologie in unserer Zeit, 2007, 37: 310-319.
- [56] Kaestner L, Tabellion W, Lipp P, Bernhardt I, *Prostaglandin E2 activates channel-mediated calcium entry in human erythrocytes: an indication for a blood clot formation supporting process*. Thromb. Haemost., 2004, 92: 1269-1272.
- [57] Andrews DA, Yang L, Low PS, *Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells*. Blood, 2002, 100: 3392-3399.
- [58] Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM, *Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis*. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2003, 285: 1553-1560.
- [59] Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P, *Rapid loss and restoration of lipid asymmetry by different pathways in resealed erythrocyte ghosts*. Biochim. Biophys. Acta., 1992, 1104: 15-23.
- [60] Vestergaard-Bogind B, Bennekou P, *Calcium-induced oscillations in K⁺ conductance and membrane potential of human erythrocytes mediated by the ionophore A23187*. Biochim. Biophys. Acta., 1982, 688: 37-44.
- [61] De Jong K, Rettig MP, Low PS, Kuypers FA, *Protein Kinase C Activation Induces Phosphatidylserine Exposure on Red Blood Cells*. Biochemistry, 2002, 41: 12562-12567.
- [62] Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM, *Lipid-protein interactions in blood coagulation*. Biochim. Biophys. Acta., 1998, 1376: 433-453.
- [63] Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR, *Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium*. Br. J. Haematol., 1999, 107: 300-302.
- [64] Gallagher PG, Chang SH, Rettig MP, Neely JE, Hillery CA, Smith BD, Low PS, *Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis*. Blood, 2003, 101: 4625-4627.
- [65] Haynes J Jr, Obiako B, King JA, Hester RB, Ofori-Acquah S, *Activated neutrophil-mediated sickle red blood cell adhesion to lung vascular endothelium: role of phosphatidylserine-exposed sickle red blood cells*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2006, 291: 1679-1685.

- [66] Andrews DA, Low PS, *Role of red blood cells in thrombosis*. Curr. Opin. Hematol., 1999, 6: 76-82.
- [67] Setty BN, Betal SG, *Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes*. Blood, 2008, 111: 905-914.
- [68] Steffen P, Jung A, Nguyen DB, Müller T, Bernhardt I, Kaestner L, Wagner C, *Stimulation of human red blood cells leads to Ca²⁺-mediated intercellular adhesion*. Cell Calcium, 2011, 50: 54-61.
- [69] Sahu SK, Aradhyam GK, Gummadi SN, *Calcium binding studies of peptides of human phospholipid scramblases 1 to 4 suggest that scramblases are new class of calcium binding proteins in the cell*. Biochim. Biophys. Acta., 2009, 1790: 1274-1281.
- [70] UniProt, www.uniprot.org
- [71] Sahu SK, Gopala Krishna A, Gummadi SN, *Over-expression of recombinant human phospholipid scramblase 1 in E. coli and its purification from inclusion bodies*. Biotechnol. Lett., 2008, 30: 2131-2137.
- [72] Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ, *Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1*. Blood, 2002, 99: 4030-4038.
- [73] Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ, *Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids*. J. Biol. Chem., 1997, 272:18240-18244.
- [74] Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ, *Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1*. Blood, 2002, 99: 4030-4038.
- [75] Brunner JD, Lim NK, Schenck S, Duerst A, Dutzler R, *X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase*. Nature, 2014, 516:207-212.
- [76] Gardos G, *The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes*. Biochim. Biophys. Acta., 1958, 30: 653-654.
- [77] Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A, *The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 7366-7371.

- [78] Tiffert T, Daw N, Etzion Z, Bookchin RM, Lew VL, *Age decline in the activity of the Ca²⁺-sensitive K⁺ channel of human red blood cells*. J. Gen. Physiol., 2007, 129: 429-436.
- [79] Lew VL, Bookchin RM, *Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model*. J. Membr. Biol., 1986, 92: 57-74.
- [80] Rohwer JM, Kuchel PW, Maher AD, *ThermoKinetic modelling. Membrane potential as a dependent variable in ion transport processes*. Mol. Biol. Rep., 2002, 29: 217-25.
- [81] Maher AD, Kuchel PW, *The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2003, 35: 1182-1197.
- [82] www.promega.com, *Protein Kinase C*, Kapitel 3, S. 2-7.
- [83] Palfrey HC, Waseem A, *Protein kinase C in the human erythrocyte. Translocation to the plasma membrane and phosphorylation of bands 4.1 and 4.9 and other membrane proteins*. J. Biol. Chem., 1985, 260: 16021-16029.
- [84] Raval PJ, Allan D, *The effects of phorbol ester, diacylglycerol, phospholipase C and Ca²⁺ ionophore on protein phosphorylation in human and sheep erythrocytes*. Biochem. J., 1985, 232: 43-47.
- [85] Malo ME, Fliegel L, *Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2006, 84: 1081-95.
- [86] Bucki R, Pastore JJ, Giraud F, Janmey PA, Sulpice JC, *Involvement of the Na⁺/H⁺ exchanger in membrane phosphatidylserine exposure during human platelet activation*. Biochim. Biophys. Acta., 2006, 1761: 195-204.
- [87] Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA, *Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes*. Cell Death Differ., 2000, 7: 645-53.
- [88] Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Shattil SJ, Weiss HJ, Zwaal RF, Sims PJ, *Defective Ca²⁺-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome*. Blood, 1992, 79: 380-388.
- [89] Kojima H, Newton-Nash D, Weiss HJ, Zhao J, Sims PJ, Wiedmer T, *Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome*. J. Clin. Invest., 1994, 94: 2237-2244.

- [90] Avron M, Shavit N, *A sensitive and simple method for determination of ferrocyanide*. Anal. Biochem., 1963, 6: 549-554.
- [91] Invitrogen, *Annexin V Conjugates for Apoptosis Detection*. <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp13199.pdf>, S.1.
- [92] Kaestner L, Tabellion W, Weiss E, Bernhardt I, Lipp P, *Calcium imaging of individual erythrocytes: problems and approaches*. Cell Calcium, 2006, 39: 13-19.
- [93] Invitrogen, *Fluo Calcium Indicators*. <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp01240.pdf>, S.2.
- [94] Reed PW, Lardy HA, *A23187: a divalent cation ionophore*. J. Biol. Chem., 1972, 247: 6970-6977.
- [95] Lexikon der Biologie, *A23187*, www.spektrum.de/lexikon/biologie/a23187/3.
- [96] Gbotosho OT, Cytlak UM, Hannemann A, Rees DC, Tewari S, Gibson JS, *Inhibitors of second messenger pathways and Ca²⁺-induced exposure of phosphatidylserine in red blood cells of patients with sickle cell disease*. Pflugers Arch., 2014, 466: 1477-1485.
- [97] Desmaret S, Qian L, Vanloo B, Meerschaert K, Van Damme J, Grooten J, Vandekerckhove J, Prestwich GD, Gettemans J, *Lysophosphatidic acid affinity chromatography reveals pyruvate kinase as a specific LPA-binding protein*. Biol. Chem., 2005, 386: 1137-1147.
- [98] Panetti TS, *Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells*. Biochim. Biophys. Acta., 2002, 1582: 190-196.
- [99] Morris AJ, Panchatcharam M, Cheng HY, Federico L, Fulkerson Z, Selim S, Miriyala S, Escalante-Alcalde D, Smyth SS, *Regulation of blood and vascular cell function by bioactive lysophospholipids*. J. Thromb. Haemost., 2009, 7: 38-43.
- [100] Yang L, Andrews DA, Low PS, *Lysophosphatidic acid opens a Ca²⁺ channel in human erythrocytes*. Blood, 2000, 95: 2420-2425.
- [101] Depositar EL, Santore DT, Shipley RK, *Method of determining hemoglobin in blood*. United States Patent US 3663175 A, 1972.

- [102] Gonzalez LJ, Gibbons E, Bailey RW, Fairbourn J, Nguyen T, Smith SK, Best KB, Nelson J, Judd AM, Bell JD, *The influence of membrane physical properties on microvesicle release in human erythrocytes*. PMC Biophys., 2009, 2: 7.
- [103] Dekkers DW, Comfurius P, Vuist WM, Billheimer JT, Dicker I, Weiss HJ, Zwaal RF, Bevers EM, *Impaired Ca²⁺-induced tyrosine phosphorylation and defective lipid scrambling in erythrocytes from a patient with Scott syndrome: a study using an inhibitor for scramblase that mimics the defect in Scott syndrome*. Blood, 1998, 91: 2133-2138.
- [104] Smith SK, Farnbach AR, Harris FM, Hawes AC, Jackson LR, Judd AM, Vest RS, Sanchez S, Bell JD, *Mechanisms by which intracellular calcium induces susceptibility to secretory phospholipase A2 in human erythrocytes*. J. Biol. Chem., 2001, 276: 22732-22741.
- [105] Wagner, L, *Untersuchung dynamischer Prozesse an der Membran humaner Erythrozyten in Abhängigkeit vom Zellalter*. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, 2009.
- [106] Glaser R, *The shape of red blood cells as a function of membrane potential and temperature*. J. Membr. Biol., 1979, 51: 217-228.
- [107] Bernhardt, I, *Die Bedeutung des elektrischen Potentials für die Regulation des Membrantransports monovalenter Kationen am menschlichen Erythrozyten*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1981.
- [108] Bosman G, Ghashghaeinia M, Cluitmans JCA, Akel A, Dreischer P, Toulany M, Köberle M, Skabytska Y, Saki M, Biedermann T, Duszenko M, Lang F, Wieder T, *The impact of erythrocyte age on eryptosis*. Br. J. Haematol., 2012, 157: 606-614.
- [109] Lutz HU, Stammer P, Fasler S, Ingold M, Fehr J, *Density separation of human red blood cells on self forming Percoll R gradients: correlation with cell age*. Biochim. Biophys. Acta., 1992, 1116: 1-10.
- [110] Rennie CM, Thompson S, Parker AC, Maddy A, *Human erythrocyte fraction in "Percoll" density gradients*. Clin. Chim. Acta., 1979, 98: 119-125.

- [111] Lawen A, Martinus RD, McMullen GL, Nagley P, Vaillant F, Wolvetang EJ, Linnane AW, *The universality of bioenergetic disease: The role of mitochondrial mutation and the putative inter-relationship between mitochondria and plasma membrane NADH oxidoreductase*. Mol. Aspects Med., 1994, 15: 13-27.
- [112] Rizvi SI, Jha R, Maurya PK, *Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging*. Rejuvenation Res., 2006, 9: 470-474.
- [113] Mueller TJ, Jackson CW, Dockter ME, Morrison M, *Membrane Skeletal Alterations During in Vivo Mouse Red Cell Aging: Increase in the Band 4.1a:4.1b Ratio*. J. Clin. Invest., 1986, 79: 492-499.
- [114] Dyballa N, Metzger S, *Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics*. Methods Mol. Biol., 2012, 893: 47-59.
- [115] Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM, *Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis*. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2003, 285: 1553-1560.

Publikationen, Vorträge, Poster

Publikationen:

Wagner-Britz L, Wang J, Kaestner L, Bernhardt I, *Protein kinase Ca and P-type Ca channel CaV2.1 in red blood cell calcium signaling*. Cell. Physiol. Biochem., 2013, 31: 883-891.

Wang J, Wagner-Britz L, Bogdanova A, Ruppenthal S, Wiesen K, Kaiser E, Tian Q, Krause E, Bernhardt I, Lipp P, Philipp SE, Kaestner L, *Morphologically homogeneous red blood cells present a heterogeneous response to hormonal stimulation*. PLoS One, 2013, 8: 367691.

Kucherenko YV, Wagner-Britz L, Bernhardt I, Lang F, *Effect of chloride channel inhibitors on cytosolic Ca²⁺ levels and Ca²⁺-activated K⁺ (Gardos) channel activity in human red blood cells*. J. Membr. Biol., 2013, 246: 315-326.

Kaestner L, Steffen P, Nguyen DB, Wang J, Wagner-Britz L, Jung A, Wagner C, Bernhardt I, *Lysophosphatidic acid induced red blood cell aggregation in vitro*. Bioelectrochemistry, 2012, 87: 89-95.

Nguyen DB, Wagner-Britz L, Maia S, Steffen P, Wagner C, Kaestner L, Bernhardt I, *Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells*. Cell. Physiol. Biochem., 2011, 28: 847-856.

Vorträge:

Parameters involved in the phosphatidylserine exposure on the outer membrane leaflet of human red blood cells,

Wagner-Britz L, Nguyen DB, Lovergine I, Lang J, Bernhardt I,
18th Meeting of the European Association for Red Cell Research, Mai 2011,
Szklarska Poreba, Polen

Ca²⁺ content and Phosphatidylserine Exposure of Red Blood Cells,

Nguyen DB, Moersdorf D, Wagner-Britz L, Bernhardt I,

17th Meeting of the European Association for Red Cell Research, April 2009,
Triuggio, Italien

Poster:

Intracellular Ca²⁺ Content and the Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells,

Wesseling MC, Huppert H, Alkhaled Y, Hanf B, Wagner-Britz L, Bernhardt I,

19th Meeting of the European Red Cell Society, Oktober 2013, Forteiland,
Niederlande

ONCOHIST® Inhibits Survival of Human Leukaemia Cells,

Maia S, Wagner-Britz L, Heider-Lipps B, Formicka-Zeppezauer G, Zeppezauer M,
Bernhardt I,

European Leukemia Net Frontiers Meeting, Oktober 2010, Wien

Apoptosis in Human Red Blood Cells?,

BD Nguyen, Moersdorf D, L Wagner-Britz, I Bernhardt,

17th Meeting of the European Association for Red Cell Research, April 2009,
Triuggio, Italien

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ingolf Bernhardt für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem zweiten Betreuer Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr.

Bei meinen Kollegen Jörg Riedel, Daniel Mörsdorf und Sara Maia möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen anregenden Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Stefan Wagner, der mich jederzeit tatkräftig moralisch unterstützt hat.

Ebenso möchte ich meinen Eltern Hedi und Wolfgang Britz für die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Meiner ständigen Begleiterin Cassie ein dickes Dankeschön für ihr Treue und allzeitige Unterstützung.