

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Leiter: Professor Dr. Florian Lang

Inhibition der erythrozytären Apoptose durch Catecholamine



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marlis Maria Podolski
aus
Stuttgart

2008

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Florian Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Risler

Für meine Mutter und meine Tante

I Inhaltsverzeichnis

II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	3
2.1	Catecholamine.....	3
2.1.1	Biosynthese der Catecholamine.....	3
2.1.2	Klinische Bedeutung der Catecholamine.....	3
2.2	Dopamin.....	4
2.2.1	Wirkungen von Dopamin im zentralen Nervensystem.....	5
2.2.2	Das nigro-striatale System.....	5
2.2.3	Das mesolimbische System.....	6
2.2.4	Das tubero-infundibuläre System.....	7
2.2.5	Dopamin-Rezeptor.....	7
2.2.6	Periphere Wirkungen von Dopamin.....	8
2.3	Isoproterenol.....	9
2.4	Phenylephrin.....	10
2.5	Dobutamin.....	11
2.6	Apoptose.....	13
2.6.1	Definition des Wortes Apoptose.....	13
2.6.2	Apoptose und ihre Bedeutung im menschlichen Organismus.....	13
2.6.3	Apoptose und Nekrose.....	14
2.7	Mechanismen der Apoptose in kernhaltigen Zellen.....	15
2.7.1	Der rezeptorvermittelte Apoptoseweg.....	16
2.7.2	Mitochondrialer Apoptoseweg.....	18
2.7.3	ER-induzierter Apoptoseweg.....	20
2.8	Exekutivorgane der Apoptose–Caspasen.....	21
2.9	Regulation der Apoptose.....	22

Inhaltsverzeichnis

2.9.1	Apoptoseregulation auf Todesrezeptorebene	22
2.9.2	Apoptoseregulation durch Proteine der Bcl-2-Familie	22
2.9.3	Apoptoseregulation durch Smac/DIABLO und die IAP- Familie..	24
2.10	Klinische Bedeutung der Apoptose	25
2.11	Erythrozyten	25
2.11.1	Morphologie der Erythrozyten	25
2.11.2	Physiologie der Erythrozyten	26
2.12	Eryptose	27
2.12.1	Übersicht über die Signalwege	27
2.12.2	Bedeutung der unselektiven Kationenkanäle bei der Eryptose...	28
2.12.3	Aktivierung der erythrozytären Scramblase	29
2.12.4	Aktivierung eines Ca ²⁺ -abhängigen K ⁺ -Kanals (GARDOS-Kanal)..	29
2.12.5	Aktivierung von Calpain	29
2.12.6	Durch Ceramide induzierte Eryptose	30
2.12.7	Bedeutung der Caspasekaskade bei der Eryptose	31
2.12.8	Hemmung der Eryptose durch Erythropoietin	31
2.12.9	Klinische Bedeutung der Eryptose	32
3	Zielsetzung der Doktorarbeit.....	33
4	Material und Methoden	34
4.1	Gewinnung und Aufbereitung von Erythrozyten	34
4.2	Analyse der Blutzellenanzahl	34
4.3	Verwendete Substanzen	35
4.4	Verwendete Lösungen	37
4.5	FACS-Analyse	40
4.5.1	Allgemeines zur Durchflusszytometrie	40
4.5.2	Geschichtliches zur Durchflusszytometrie	41
4.5.3	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	41
4.5.4	Aufbau eines Durchflusszytometers.....	43

4.5.5	Durchführung einer Annexin-V-Färbung	45
4.6	Durchführung einer intrazellulären Ca^{2+} -Bestimmung.....	46
4.7	Patch Clamp	47
4.7.1	Geschichtliches zur Patch-Clamp-Technik	47
4.7.2	Prinzip der Patch-Clamp-Technik	47
4.7.3	Aufbau einer Patch-Clamp-Apparatur	48
4.7.4	Durchführung der Patch-Clamp-Technik.....	49
4.8	Statistik	50
5	Ergebnisse.....	51
5.1	Auswirkungen der Catecholamine auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran	51
5.1.1	Auswirkungen von Isoproterenol auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran..	51
5.1.2	Auswirkungen von Phenylephrin, Dopamin und Dobutamin auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran	54
5.2	Auswirkungen der Catecholamine auf das erythrozytäre Zellvolumen	55
5.2.1	Auswirkungen von Isoproterenol auf das erythrozytäre Zellvolumen.....	56
5.2.2	Auswirkungen von Dopamin, Phenylephrin und Dobutamin auf das erythrozytäre Zellvolumen	58
5.3	Ermittlung der Ströme über die Erythrozytenmembran anhand des Patch-Clamp-Verfahrens	61
5.4	Auswirkungen von Isoproterenol auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt..	63
5.5	Auflistung der zu untersuchenden Rezeptorantagonisten von Dopamin	66
5.6	Vergleich der Effekte der unterschiedlichen Dopamin-antagonisten..	67
6	Diskussion	69
6.1	Methodendiskussion.....	69

Inhaltsverzeichnis

6.1.1	Lösungen	69
6.1.2	Durchflusszytometrie	69
6.1.3	Patch-Clamp-Messungen	70
6.2	Ergebnisdiskussion	71
6.2.1	Inhibition der unselektiven Kationenkanäle durch die Catecholamine	71
6.2.2	Auswirkung der Catecholamine auf den intrazellulären Ca^{2+} - Gehalt.....	72
6.2.3	Inhibition des Phosphatidylserinscrumbling durch Catecholamine..	73
6.2.4	Inhibition des GARDOS-Kanals durch die Catecholamine.....	73
6.2.5	Interaktionen der Catecholamine mit dem Prostaglandin E_2	74
6.2.6	Vergleich der unterschiedlichen Dopaminantagonisten	75
6.2.7	Schwächen bei der Übertragung der Ergebnisse auf ein biologisches System.....	76
6.3	Schlussfolgerung.....	77
7	Zusammenfassung	80
8	Literaturverzeichnis.....	82
9	Abbildungsverzeichnis	103
10	Publikationsverzeichnis	104
11	Danksagung	105
12	Lebenslauf	106

II Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
°C	Grad Celsius
c	Konzentration eines Stoffes
Ca	Calciumatom
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	caspase activated DNase
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
Cl ⁻	Chloridion
D	Schichtdicke
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DD	death domain, Todesdomäne
DED	death effector domain, Todeseffektordomäne
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	death receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-N- N-N'-N'-Tetraessigsäure
EIPA	N-Ethyl-Isopropyl-Amilorid
F	Faraday-Konstante [10 ⁵ C/mol]

Abkürzungsverzeichnis

FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associating protein with death domain
FLIP	Flice inhibitor protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
G	Gramm
GI	Gleichung
GΩ	Gigaohm
h	Stunde
H	Wasserstoffatom
H ₂	Wasserstoffmolekül
Hb	Hämoglobin
HbO ₂	oxygeniertes Hämoglobin
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N`-2- Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I	Stromstärke [Ampère] zur Zeit t
IAP	Inhibitor of Apoptosis protein
I-V-Kurve	Strom-Spannungskurve
IC ₅₀	Inhibition concentration bei 50%
IK	intermediate conductance
IL	Interleukin
K	Kaliumatom
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumzyanid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
lg	dekadischer Logarithmus
ln	natürlicher Logarithmus

Abkürzungsverzeichnis

Met-Hb	Methämoglobin
Mg	Magnesiumatom
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
N	Stickstoffatom
N	Anzahl voneinander unabhängiger Versuchsdurchführungen
N ₂	Stickstoffmolekül
Na	Natriumatom
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	nerve growth factor
NH ₄ ⁺	Ammonium
Nm	Nanometer
NMDG	N-Methyl-D-Glukamin
NO	Stickstoffmonoxid
O	Sauerstoffatom
O ₂	Sauerstoffmolekül
P	Phosphor
P	Gleichgewichtspotential für ein Ion [V]
pA	Picoampere
PAF	Platelet Activating Factor
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck

Abkürzungsverzeichnis

pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pg	Picogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	pH-Wert; pondus Hydrogenii (lat. Pondus = Gewicht, hydrogenium = Wasserstoff)
pS	Picosiemens
PMT	photomultiplier tube
R	Gaskonstante [8,314 J/(K* <i>mol</i>)]
SE	standard error
SEM	standard error of the mean
SK	small conductance
SM	Sphingomyelin
s.o.	siehe oben
SSC	side scatter
T	absolute Temperatur [K]
Tab	Tabelle
<i>t</i> -BHP	<i>t</i> -Butylhydroperoxid
TDH	thermostable direct hemolysin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRADD	TRADD TNF-RSF1A-associated death domain protein
TRH	toxin related hemolysin
U	Spannung [Volt]
U/ml	Units pro Milliliter
UV	Ultraviolett
X	Anzahl aktiver Kanäle
z _i	Ladung eines diffundierenden Teilchens
Ω	Widerstand [Ohm]
μ	mikro
%	Prozentsatz

1 Einleitung

Bei Blut handelt es sich um einen ganz besonderen Saft, wie Goethe bereits den Mephisto im Faust sagen lässt. Bei diesem roten Lebenssaft in unseren Adern handelt es sich um flüssiges Gewebe, das unseren gesamten Organismus in den grossen Leitungsbahnen ebenso wie in den kleinsten Gefässverästelungen durchströmt, auf diese Weise die Organe miteinander verbindet und die Sauerstoffversorgung aller Zellen des Menschen sicherstellt. Die verschiedenen Bestandteile des Blutes erfüllen dabei zahlreiche Aufgaben: Es dient dem Stoff- und Wärmetransport, der Signalübermittlung, der Pufferung sowie der Abwehr körperfremder Stoffe und Mikroorganismen. Erst die Erfindung des Mikroskops durch den Brillenschleifer Hans Janssen (ca. 1595) ermöglichte es Jan Swammerdam im Jahre 1658, die Erythrozyten als Corpuskeln des Blutes zu beschreiben. Dass es sich dabei um Zellen des Blutes handelt, die vor allem die Funktion des Sauerstofftransports ausüben, konnte erst im Jahre 1864 von Felix Hoppe-Seyler bewiesen werden. In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass die Erythrozyten in der Lage sind, ihre eigene Variante des programmierten Zelltodes durchzuführen, obwohl sie weder einen Zellkern noch andere dafür erforderliche Zellorganellen haben. Für diesen Prozess prägte man den Begriff Eryptose.

Trotz gewisser Ähnlichkeiten im Ablauf von Apoptose (programmiertes Absterben kernhaltiger Zellen) und Eryptose können beide Prozesse klar voneinander abgegrenzt werden. Ihre Unterschiede und Gemeinsamkeiten werden im Folgenden vorgestellt. Die Funktion der Eryptose besteht in der Beseitigung gealterter und beschädigter Erythrozyten, ohne dass dabei „Abfallstoffe“ anfallen. Indem die Erythrozyten sowohl im retikuloendothelialen als auch im monophagozytären System extravasal abgebaut werden, wird effektiv verhindert, dass Membranbestandteile, Rezeptoren, intraerythrozytäre Enzyme (z.B. Caspasen) und Hämoglobin intravasal frei werden.

Beim Abbau der Erythrozyten im mononukleären phagozytotischen System werden deren Grundbestandteile sowie der organische Anteil des Hämoglobins in Bilirubin umgewandelt und in dieser Form ausgeschieden, während die anorganischen Eisenionen wieder dem Blutplasmapool zugeführt werden und somit zur weiteren Verwendung bereit stehen.

Würde dieser „Recycling-Kreislauf“ nicht existieren, käme einerseits das „System Mensch“ mit der Lieferung der für die Erythropoiese „notwendigen Rohstoffe“ nicht mehr nach, andererseits würden die „Abfallstoffe“ an falscher Stelle abgelagert, sich anhäufen und somit zu Schädigungen bzw. Erkrankungen des Organismus führen.

Ein gutes Beispiel für eine mögliche Schädigung ist das Hämoglobin. Im Rahmen einer massiven Hämolyse könnte es zu einer Überschreitung der Bindungskapazität des Proteins Haptoglobin kommen. Infolgedessen käme es zu einem Ausfall des Hämoglobins in den Kapillaren der Nieren, was zu deren Verstopfung und somit zu einem Nierenversagen führen würde. Dies könnte mit dem Tod des Menschen enden.

So zeigt sich am Hämoglobin bereits im „System Mensch“, welche positiven Seiten das Konzept des „Recycling“ für unseren Körper besitzt.

2 Grundlagen

2.1 Catecholamine

Unter diesem Begriff wird eine Reihe von körpereigenen und künstlichen Stoffen zusammengefasst, die eine anregende Wirkung auf die sympathischen Alpha- und Beta-Rezeptoren des Herz-Kreislaufsystems haben und deshalb zu den Sympathomimetika gerechnet werden. Alle Catecholamine sind (als Phenylethylamine) chemisch ähnlich aufgebaut.

Die Hauptvertreter der Gruppe der Catecholamine sind:

- Adrenalin
- Noradrenalin
- Dopamin
- Dobutamin
- Isoproterenol

2.1.1 Biosynthese der Catecholamine

Die Synthese geht von dem Substrat Tyrosin im Nebennierenmark aus. Mittels Hydroxylierung des aromatischen Ringes durch die Tyrosin-3-Monooxygenase entsteht Dopa (3,4- Dihydroxyphenylalanin). Die Reaktion findet mit Hilfe des Coenzym Tetrahydrobiopterin statt. Infolge der Decarboxylierung von Dopa entsteht wiederum Dopamin. In der Nebenniere und in adrenergen Neuronen geht die Synthese weiter. Dort wird Dopamin unter Einwirkung des Coenzym Ascorbat durch die Dopamin- β -Monooxygenase zu Noradrenalin hydroxyliert. Als letzter Schritt erfolgt über die N-Methylierung von Noradrenalin die Bildung des Adrenalins. Coenzym bei dieser Reaktion ist S-Adenylmethionin.

2.1.2 Klinische Bedeutung der Catecholamine

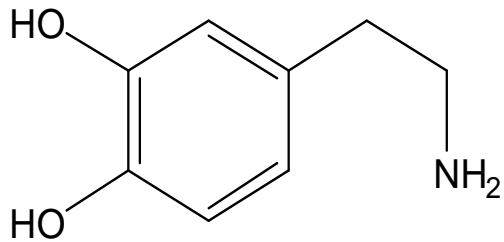
Catecholamine sind als Medikamente im Bereich der Notfallmedizin unverzichtbar. Sie werden beinahe ausschließlich bei der Reanimation und in der Intensivmedizin eingesetzt (Chen *et al.*, 2006). Bei ihrer Verabreichung muss auf eine sehr gleichmäßige Zufuhr geachtet werden, da sonst erhebliche Druck- und Frequenzschwankungen auftreten können.

Catecholamine haben in höherer Dosierung ein erhebliches arrhythmogenes Potential (Tarditi and Hollenberg, 2006), daher ist eine enge Herzkreislaufüberwachung unabdingbar.

2.2 Dopamin

Dopamin ist ein in Ginster und Algen sowie in Früchten, vor allem in Bananen, Äpfeln und Trauben natürlich vorkommendes Catecholamin. Es fungiert sowohl als Hormon als auch als Neurotransmitter und wirkt ebenso auf das periphere wie auf das zentrale Nervensystem. Im peripheren Nervensystem werden seine Effekte über spezielle dopaminerge Rezeptoren, aber auch über adrenerge α - und β -Rezeptoren vermittelt.

Tab. 2.2.1: Chemische Eigenschaften von Dopamin

Name:	Dopamin
Summenformel:	$C_8H_{11}NO_2$
Synonyme:	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylamin, 3,4-Dihydroxyphenylethylamin, 3-Hydroxytyramin, DA, Intropin, 4-(2-Aminoethyl)brenzkatechin,
Kurzbeschreibung:	charakteristischer Geruch. Die freie Base bildet an der Luft rasch verfärbende derbe Prismen.
Strukturformel:	

Tab. 2.2.2: Physikalische Eigenschaften von Dopamin

Aggregatzustand:	Fest
Molmasse:	153,18 g/mol
Schmelzpunkt:	128°C
Löslichkeit:	leicht löslich in Wasser 60g/100ml

2.2.1 Wirkungen von Dopamin im zentralen Nervensystem

Dopamin wirkt an zentralen Synapsen der Basalganglien, des limbischen Systems und der Hypophyse als Neurotransmitter. Somit ist Dopamin an der neuroendokrinen Funktion der Hypophyse, an der Willkürmotorik und an verschiedenen psychischen Prozessen beteiligt. Dieses dopaminerge System kann nochmals in drei Subsysteme eingeteilt werden.

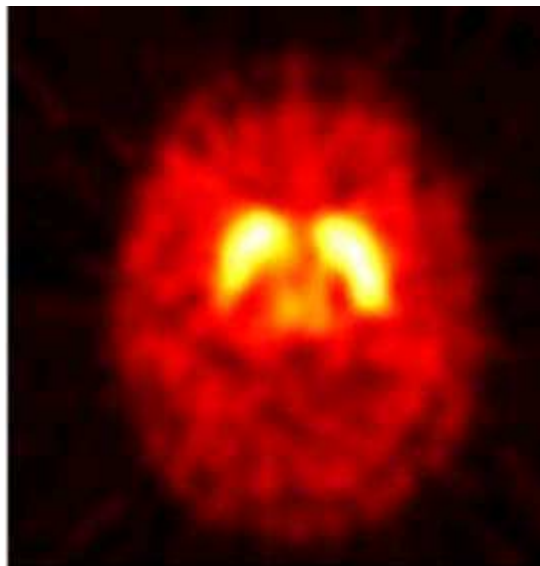


Abb. 2.2.1.1: Darstellung des Dopaminmetabolismus eines menschlichen Gehirns. Der Dopaminmetabolismus im Gehirn eines gesunden Menschen wird anhand einer PET Aufnahme in vivo dargestellt. Als Kontrastmittel wurde der Tracer Fluorometatyrosine, der mit dem Positron Emitter 18 F beladen war, eingesetzt.
<http://bic.berkeley.edu/jagustlab/tools.php>

2.2.2 Das nigro-striatale System

Das nigro-striatale System entspringt im Pars compacta der Substantia nigra. Die dazugehörigen Bahnen ziehen von dort zum Corpus striatum. Im nigro-striatalen System liegen ca. 60-70% des im zentralen Nervensystem vorkommenden Dopamins. Die Beeinflussung der extrapyramidalen Motorik ist die Hauptaufgabe von Dopamin (DiChiara *et al.*, 1992).

Das extrapyramidale motorische System besteht aus den Basalganglien und dem Cerebellum. Diese Einheit ist vor allem für die Kontrolle des Zusammenspiels von Bewegungen verantwortlich. Dazu muss sie auch noch die Feinabstimmung der „geplanten“ Bewegung mit dem Motorkortex, den kortikospinalen Bahnen und motorischen Kernen des Hirnstammes durchführen.

Der Morbus Parkinson ist das Resultat einer Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta und der daraus folgenden Beeinflussung des Striatums (von Bohlen und Halbach, 2005). Bei manifestem Morbus Parkinson liegt die Konzentration des Dopamins der Substantia nigra bei 5 - 15 % der vorherigen Werte. Kardinalsymptome des Morbus Parkinson sind: Akinese, Rigor und Ruhetremor (Hobson 2003, Rao *et al.*, 2006).

2.2.3 Das mesolimbische System

Die Zellkörper des mesolimbischen Systems befinden sich im Mesencephalon. Deren Axone ziehen zu den Strukturen des limbischen Systems, zu denen Nucleus accumbens, Tuberculum olfactorium, Corpora amygdaloidea gehören, und zum Frontalcortex. Dieses gesamte Gefüge dient vor allem der Empfindung und Wahrnehmung von Emotionen und ist somit vor allem für psychische Prozesse verantwortlich. Im mesolimbischen Innervationsgebiet scheinen suchterzeugende Stoffe in starkem Ausmaß die Freisetzung von Dopamin zu triggern. Durch Substanzen, die die Dopaminkonzentration an den dopaminergen Neuronen erhöhen wie z.B. Amphetamin, Cannabis, Alkohol und Cocain, können psychotische Prozesse hervorgerufen werden (Yui *et al.*, 2000, Cheer *et al.*, 2007, DiRocco *et al.*, 2006)

Aufgrund dieser und der folgenden Beobachtung, dass Erfahrungen im Kindesalter die Neuronenarchitektur beeinträchtigen und somit die Dopaminausschüttung beeinflussen können, brachte man exzessive Dopaminfreisetzung im limbischen System mit Schizophrenie in Verbindung (DiForti *et al.*, 2007).

2.2.4 Das tubero-infundibuläre System

Die Zellkörper des tubero-infundibulären Systems liegen im Nucleus arcuatus in der Medulla oblongata. Von dort ziehen Axone zur Eminentia mediana und zum Hypophysenstiel. Diesem System ist der Hypothalamus vorgeschaltet, der das Prolactin-Inhibiting-Hormon (PIH) produziert, welches mit Dopamin identisch ist (Clemens *et al.*, 1980). Wie die meisten anderen hypothalamischen Hormone wird Dopamin hier an Nervenendigungen der Eminentia mediana sezerniert und über ein portales Venensystem zur Hypophyse transportiert. Die wichtigste physiologische Wirkung des Prolactins ist die Vorbereitung der Brustdrüse auf die Laktation und die Förderung der Laktation nach der Geburt (Bachelot and Binart, 2007).

2.2.5 Dopamin-Rezeptor

Der Dopamin-Rezeptor ist die Empfangseinheit für Signale durch den Neurotransmitter Dopamin. Es sind eine Reihe von Dopamin-Rezeptor-Typen beschrieben worden (D1-D5), die in zwei funktionelle Gruppen, D1 und D5 als D1-Gruppe und D2, D3 und D4 als D2-Gruppe, zusammengefasst werden. Alle sind G-Protein-gekoppelt.

- D1/D5-Gruppe (kurz D1-Gruppe):

Die D1-Rezeptoren stimulieren über G-Proteine die Aktivität der Adenylatzyklase, erhöhen dadurch die intrazelluläre cAMP-Menge und aktivieren infolgedessen die cAMP-abhängigen Proteinkinasen und mit deren Hilfe die Ca²⁺-Kanäle (Sidhu 1998, Neve *et al.*, 2004).

- D2/D3/D4-Gruppe (kurz D2-Gruppe):

Die D2-Rezeptoren inhibieren dagegen die Aktivität der Adenylatzyklase, scheinen jedoch auch über zahlreiche andere Effektorsysteme, wie K⁺- und Ca²⁺-Ionenkanäle zu wirken (Neve *et al.*, 2004, Obadiah *et al.*, 1999).

2.2.6 Periphere Wirkungen von Dopamin

Die peripheren Wirkungen sind sowohl durch die Stimulation spezieller Dopaminrezeptoren als auch über die Aktivierung adrenerger Rezeptoren (α_1 , β_1 , β_2) erklärbar. In sehr kleinen Konzentrationen erregt Dopamin selektiv den Dopamin-Rezeptor. Bei Dosissteigerung werden zunächst zusätzlich adrenerge β -Rezeptoren

($\beta_1 > \beta_2$) und zuletzt adrenerge α_1 -Rezeptoren stimuliert. Die α_1 -Rezeptoren werden durch eine dopamininduzierte Noradrenalinfreisetzung stimuliert. Dopamin wirkt also in hohen Dosen wie ein indirekt wirkendes Sympathomimetikum (Goldberg, 1984).

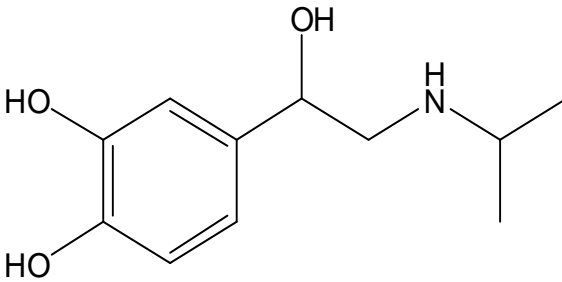
Die Stimulation in den Nieren- und Mesenterialgefäßen führt zu deren Dilatation und damit zum Anstieg der glomerulären Filtrationsrate. Durch die gleichzeitige Aktivierung tubulärer Dopaminrezeptoren wird die Natriumrückresorption gehemmt. Folge davon ist eine Natriurese (Seri., 1990, Furukawa *et al.*, 2002).

Über die Stimulation von α -Adrenozeptoren kommt es in anderen Regionen, z.B. in Haut und Muskulatur, zur Vasokonstriktion. Bei Überdosierung von Dopamin ($> 10 \mu\text{g/kg/min}$) wird somit auch die erwünschte Dilatation der Nierengefäße durch das Überwiegen der α_1 -mimetischen Wirkung aufgehoben (Furukawa *et al.*, 2002).

Über die Erregung von β -Rezeptoren kommt es am Herzen zu einer positiv inotropen Wirkung (Imanaga *et al.*, 1979). Die Herzfrequenz steigt dabei nur wenig an und Arrhythmien werden selten beobachtet. Infolge der Steigerung des Herzzeitvolumens steigt auch der systolische Blutdruck (Leier, 1986, Worthley *et al.*, 1985). Als Nebenwirkungen von parenteral substituiertem Dopamin können Nausea und Emesis auftreten, die über Dopaminrezeptoren in der Area postrema, die außerhalb der Blut-Hirnschranke liegt, hervorgerufen werden (Jovanovic-Micic *et al.*, 1995).

2.3 Isoproterenol

Tab. 2.3.1: Chemische Eigenschaften von Isoproterenol

Name:	Isoproterenol
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃
Synonyme:	Isoprenalin, ±-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-(isopropylamino)ethanol
Kurzbeschreibung:	nahezu weißes kristallines Pulver, geruchlos, schwach bitter
Strukturformel:	

Tab.2.3.2: Physikalische Eigenschaften von Isoproterenol

Aggregatzustand:	Fest
Molmasse:	211,26 g/mol
Schmelzpunkt:	150-155°C
Löslichkeit:	1:4 in Wasser 1:5 in 95% Ethanol

Isoproterenol ist ein natürliches Catecholamin und wirkt β -sympathomimetisch (Ask *et al.*, 1985, Tattersfield 2006). β_1 - und β_2 -Rezeptoren werden in gleichem Maße stimuliert. Isoproterenol kann oral, parenteral, subkutan oder intramuskulär appliziert werden. Es wird schnell resorbiert. Metabolisiert wird es vor allem in der Leber und in anderen Geweben durch die COMT. Dieser Abbau kann auch in Erythrozyten erfolgen (Kübler and Männl, 1970). Da Isoproterenol für die MAO ein verhältnismäßig schlechtes Substrat darstellt und somit nicht in gleichem Maße in sympathische Neurone aufgenommen werden kann, hat es eine längere biologische Halbwertszeit als Adrenalin.

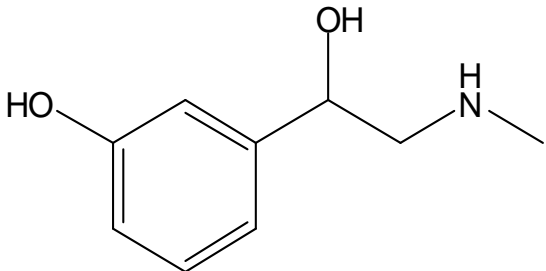
Isoproterenol bewirkt seine positiv inotropen, chronotropen und dromotropen kardialen Effekte durch eine gleichermaßen starke Stimulation der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (Brodde 1988, Motomura *et al.*, 1990, Zerkowski *et al.*, 1986, Brodde and Zerkowski, 1989). Bei zu hoher Dosierung können ventrikuläre Arrhythmien auftreten.

Über die alleinige Stimulation der β_2 -Rezeptoren wirkt es ausgesprochen broncholytisch (Hanania *et al.*, 2006) und vasodilatatorisch (Schindler *et al.*, 2004). Die Vasodilatation kann trotz der gesteigerten Auswurfleistung des Herzens zu einem Blutdruckabfall führen.

Isoproterenol wurde früher vor allem bei Störungen der Reizleitung des Herzens, Herzrhythmusstörungen wie Torsade de pointes und bei Bronchialasthma angewendet. Heutzutage ist es nicht mehr im Handel.

2.4 Phenylephrin

Tab. 2.4.1: Chemische Eigenschaften von Phenylephrin

Name:	Phenylephrin
Summenformel:	$C_9H_{13}NO_2$
Synonyme:	(R)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino)-1-ethanol, Rexoptal, Neosynephrin
Kurzbeschreibung:	weißes bis fast weißes kristallines Pulver
Strukturformel:	

Tab. 2.4.2: Physikalische Eigenschaften von Phenylephrine

Aggregatzustand:	Fest
Schmelzpunkt:	174°C
Molare Masse:	167,21 g/mol
Löslichkeit:	Schwer löslich in Wasser und Alkohol

Phenylephrin ist ein natürliches Catecholamin und gehört zur Gruppe der direkt wirkenden Sympathomimetika mit einer ausgeprägten Wirkung auf α -Rezeptoren und einer geringen Wirkung auf β -Rezeptoren (Yang and Endoh, 1994).

Lokal verabreicht führt Phenylephrin zu Mydriasis und Abschwellung der Nasenschleimhaut. Es wird heutzutage vor allem topisch als Mydriatikum eingesetzt (Huang and Lam, 2007).

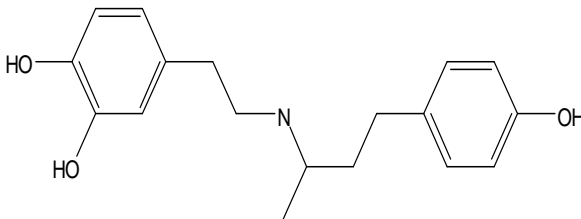
Bei systemischer Anwendung erfolgt aufgrund einer direkten Aktivierung von α_1 -Rezeptoren der Blutgefäße eine periphere Vasokonstriktion (Sink *et al.*, 1979, Park *et al.*, 2006). Der systolische und diastolische Blutdruck sowie der periphere Widerstand erhöhen sich (Pascoe *et al.*, 2006), die Herzfrequenz nimmt aufgrund der Blutdruckerhöhung reflektorisch ab (White *et al.*, 1999, Huchet *et al.*, 1981).

Bei den meisten Gefäßsystemen erfolgt eine Vasokonstriktion (Niere, Milz, Lunge, Haut), während der Koronarfluß sich erhöht (Sink *et al.*, 1979). Eine direkte Herzwirkung durch Stimulation von β -Rezeptoren tritt erst bei sehr hohen Dosen auf. Die biologische Halbwertszeit von Phenylephrin liegt bei ca. vier Stunden.

Eine Überdosierung führt zu einer direkten Aktivierung der β -Rezeptoren und bewirkt Tachykardie und Arrhythmie.

2.5 Dobutamin

Tab. 2.5.1: Chemische Eigenschaften von Dobutamin

Name:	Dobutamin
Summenformel:	$C_{18}H_{23}NO_3$
Synonyme:	\pm -(4-(2-(3-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylpropylamine]-ethyl)-brenzcatechin
Kurzbeschreibung:	kristallines weißes Pulver
Strukturformel:	

Tab. 2.5.2: Physikalische Eigenschaften von Dobutamin

Aggregatzustand:	Fest
Molare Masse:	301,39 g/mol
Schmelzpunkt:	184-186°C
Löslichkeit:	löslich in Wasser

Beim Dobutamin handelt es sich um ein künstlich hergestelltes Catecholamin. Es ähnelt in seinem Aufbau dem Dopamin, weist an der Aminogruppe jedoch einen chiralen, aromatischen Substituenten auf (Tuttle and Mills, 1975). Somit besitzt Dobutamin ein Assymetriezentrum und liegt als Enantiomer vor, wobei das (-)-Enantiomer auf die α_1 -Rezeptoren und das (+)-Enantiomer auf die β -Rezeptoren zu wirken scheint (Ruffolo *et al.*, 1981). In der Klinik wird eine Racematmischung verwendet, die sowohl die β_1 - als auch die β_2 -Rezeptoren stimuliert. Dobutamin scheint einen relativ gezielten Effekt auf die β_1 -Adrenozeptoren zu haben. Demgegenüber ist seine Wirkung auf α_1 - und β_2 -Adrenozeptoren als gering einzustufen (MacGregor *et al.*, 1996). Auf Dopamin-Rezeptoren scheint Dobutamin keinerlei Effekt zu haben. Die Applikation von Dobutamin erfolgt intravenös, da seine biologische Halbwertszeit bei zwei Minuten liegt. Die gezielte positiv inotrope Wirkung des Dobutamins entsteht dadurch, dass die vasodilatierenden Eigenschaften des auf die β_2 -Adrenozeptoren wirksamen (+)-Enantiomers in der Peripherie mit den vasokonstriktiven Eigenschaften des auf die α_1 -Adrenozeptoren wirksamen (-)-Enantiomers antagonisieren. Somit wird die Wirkung des Dobutamins vor allem durch seinen kardiogenen Effekt charakterisiert. Das (+)-Enantiomer wirkt am Herzen positiv inotrop und chronotrop auf β_1 -Adrenozeptoren und das (-)-Enantiomer wirkt positiv inotrop auf α_1 -Adrenozeptoren (Hayes *et al.*, 1985, Ruffolo and Morgan, 1984, Daul *et al.*, 1995, Imanaga *et al.*, 1979). Dobutamin ist das Mittel der Wahl beim kardiogenen Schock und bei akuter Linksherzdekompensation, da es eine Steigerung des Schlagvolumens und somit des Herzminutenvolumens bewirkt, ohne die Herzfrequenz zu erhöhen (Freitas, 1993).

2.6 Apoptose

2.6.1 Definition des Wortes Apoptose

Das Wort Apoptose (griechisch: ἀπόπτωσης) besitzt ursprünglich die Bedeutung „Herabfallen“ und ist unter anderem eine Bezeichnung für das Fallen des Laubes im Herbst. Das Wort „Apoptose“ ist in der Zellbiologie ein eigenständiger Begriff für den programmierten Zelltod. In einer Gruppe gleichartig differenzierter Zellen kommt es zum disseminierten Zellsterben.

2.6.2 Apoptose und ihre Bedeutung im menschlichen Organismus

Der apoptotische Zelltod kann als Selbstmordprozess der Zelle definiert werden, der durch ein evolutionär konserviertes Programm kontrolliert wird. Dieses physiologische Zellsterben ist sowohl für die Entwicklung (Ranganath and Nagashree, 2001, Korsmeyer., 1999) als auch für die Homöostase (Bottger and Alexandrova, 2007, Rudin and Thompson, 1997) eines vielzelligen Organismus von Bedeutung.

Tab. 2.6.2.1: Tabellarische Darstellung der Bedeutung der Apoptose im Organismus

Embryonale Entwicklung	im adulten Organismus
<ul style="list-style-type: none"> Entfernung der Interdigitalhäute zwischen Fingern und Zehen 	<ul style="list-style-type: none"> Kontrolle der Zellzahl und der Größe von Geweben
	<ul style="list-style-type: none"> Verjüngung von Geweben z. B. Riechepithel
	<ul style="list-style-type: none"> Eliminierung entarteter Zellen
<ul style="list-style-type: none"> Lichtdurchlässigkeit der Augenlinse durch apoptotischen Zelltod der Zellen von Glaskörper und Linse 	<ul style="list-style-type: none"> Selektion der Keimzellen
	<ul style="list-style-type: none"> Holokrine Sekretion, z. B. bei der Talgdrüse
	<ul style="list-style-type: none"> Plastizität im zentralen Nervensystem
<ul style="list-style-type: none"> ca. 50% der Neuronen gehen aufgrund fehlerhafter Verschaltung zugrunde. 	<ul style="list-style-type: none"> infolge von Sonnenbrand

2.6.3 Apoptose und Nekrose

Es gibt zwei unterschiedliche Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose.

Früher wurde die Nekrose als akzidenteller Zelltod definiert. Die letzten Forschungsergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass auch ihr Eintritt und Verlauf engmaschig kontrolliert wird (Golstein and Kroemer, 2007, Proskuryakov *et al.*, 2002). Die Nekrose kann durch verschiedene Faktoren wie Hypoxie, Toxine und ionisierende Strahlung ausgelöst werden. Sie ist durch initial auftretende hydropische Zellschwellung des eosinophilen Zytoplasmas, Auseinanderreißen der Plasmamembran und die dadurch bedingte Freisetzung von intrazellulären Proteinen charakterisiert (Golstein *et al.*, 2007, Kroemer *et al.*, 1998). Die freigewordenen Proteine führen zu einer Immunreaktion und lösen infolgedessen eine Entzündung aus (Proskuryakov *et al.*, 2002).

Faktoren, die Apoptose auslösen können, sind: Tumornekrosefaktor (TNF), FAS-Liganden, Cytochrom c aus den Mitochondrien, Killerzellen, Medikamente wie Glucokortikoide und Zytostatika (Wieder *et al.*, 2001, Cariers *et al.*, 2002), ionisierende Strahlung. Die Apoptose verläuft über mehrere Stadien. Zuerst kommt es zum Verlust der Zellkontakte und zum Herauslösen der Zelle aus dem Zellverband. Dann findet eine kernmembrannahe Chromatinverklumpung und Karyopyknose statt. Es folgt die Ausstülpung multipler Zytoplasmablasen an der Zelloberfläche, die als Apoptosekörperchen abgestoßen werden. Dieser Vorgang wird auch als Zeiose oder Blebbing bezeichnet (Kataoka and Tsuruo, 1996). Phosphatidylseringruppen, die normalerweise durch eine ATP-abhängige Flipase zur Innenseite der Membran sortiert werden, lokalisieren sich vermehrt auf der Außenseite der Membran und machen sie dadurch als apoptotische Zelle kenntlich (McIntyre, 2003, Proskuryakov *et al.*, 2002). Makrophagen erkennen diese Moleküle über spezifische Rezeptoren, nehmen die Zellen auf und bauen sie bis auf ihre Grundbausteine ab, ohne dass intrazelluläre Makromoleküle freigesetzt werden, die eine Entzündung auslösen könnten (Lang *et al.*, 2004). Zuletzt kommt es zur Zellschrumpfung und Sequestrierung der Apoptosekörperchen durch Phagozytose ohne entzündliche Gewebereaktion (Krysko *et al.*, 2006, Franc 2002).

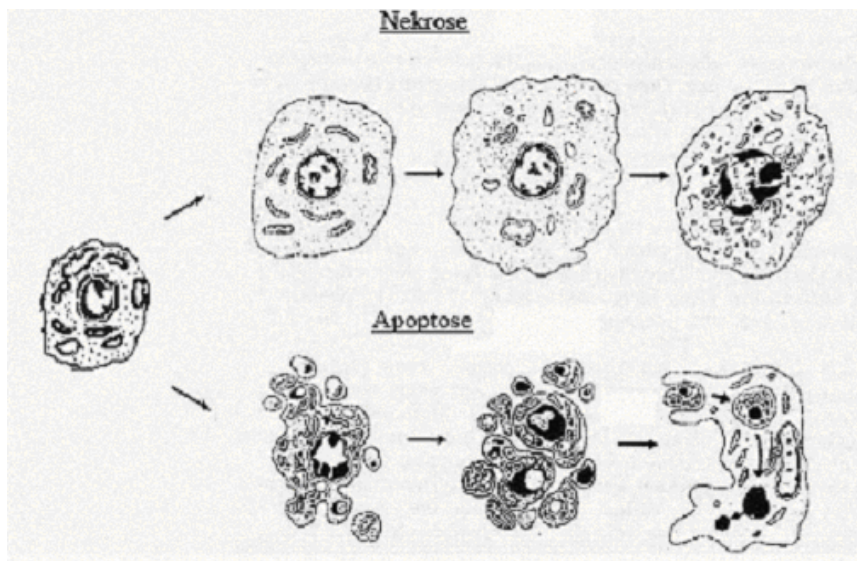


Abb. 2.6.3.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen bei Apoptose und Nekrose.

Die Nekrose ist durch hydropische Zellschwellung, Verdickung der Mitochondrien sowie Ruptur von Zellorganellen und Plasmamembran gekennzeichnet. Dabei kommt es zum Austritt proteolytischer Bestandteile des Zytoplasmas in das umliegende Gewebe mit konsekutiver Entzündungsreaktion. Der apoptotische Zelltod ist dagegen durch Zellschrumpfung und die Bildung zytosolmehaltiger Membranbläschen, die von Makrophagen phagozytiert werden, gekennzeichnet (modifiziert nach Blom, 2000).

2.7 Mechanismen der Apoptose in kernhaltigen Zellen

Bisher sind drei unterschiedliche Wege bekannt, über die Apoptose in kernhaltigen Zellen initiiert werden kann.

1. Über die Aktivierung spezieller Oberflächenrezeptoren, die auch als „Todesrezeptoren“, z. B. als Fas- oder TNF-Rezeptoren, bezeichnet werden, durch Bindung spezifischer Liganden (extrinsischer Weg) (Malhi *et al.*, 2006, Miura and Koyanagi, 2005).
2. Über den mitochondrialen Weg (intrinsischer Weg) (Nieminen 2003).
3. Über das Endoplasmatische Retikulum (van de Water *et al.*, 1999).

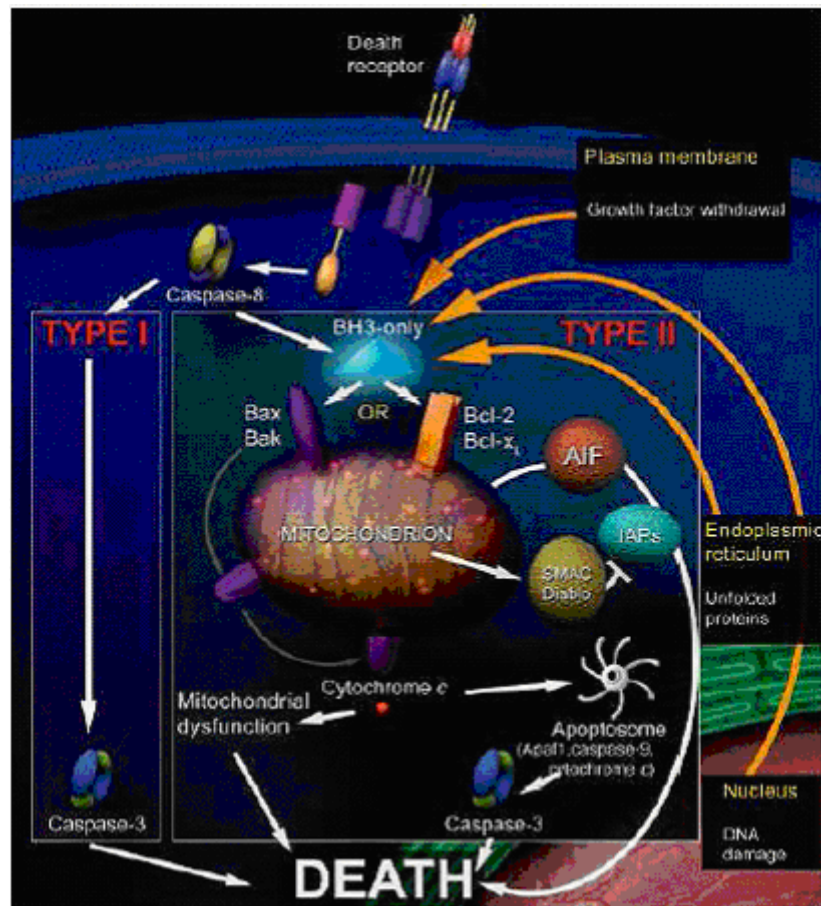


Abb. 2.7.1: Die Signalwege der Apoptose. Diese Abbildung stellt die drei Wege dar, über welche die Apoptose induziert werden kann (siehe Text). (Opferman and Korsmeyer, 2003)

2.7.1 Der rezeptorvermittelte Apoptoseweg

Der rezeptorvermittelte apoptotische Signalpfad wird durch sogenannte Todesrezeptoren (Death-receptors) initiiert. Diese Todesrezeptoren gehören einer Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie an (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Sie sind als Transmembran-Rezeptoren in der Plasmamembran lokalisiert und in ihrer Primärstruktur homolog. Sie besitzen repetitive cysteinreiche extrazelluläre Domänen, die sowohl eine Trimerisierung der Rezeptoren als auch die Bindung der gleichfalls trimeren Liganden ermöglichen (Cosman, 1994). Trotz ihrer homologen Grundstruktur sind es die individuellen strukturellen Züge der einzelnen Familienmitglieder, die das selektive Erkennen des jeweils passenden Liganden zulassen. Momentan sind acht verschiedene Todesrezeptoren bekannt.

Tab. 2.7.1.1: Todesrezeptoren und ihre spezifischen Liganden (Wajant, 2003)

Rezeptor	Ligand
CD 95/Apo 1/ Fas	CD 95 L / Apo-1 L / Fas L
TRAIL - R1	TRAIL /Apo-2L
TRAIL- R2	TRAIL /Apo -2L
TNF – R1	TNF α / TNF β
DR 3	VEGI
DR 6	Unbekannt
p 75 NGFR	NGF
EDAR	EDA – A1

Die Signalübertragung läuft bei allen Todesrezeptoren nach dem gleichen Muster ab. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Oligomerisierung der Transmembranrezeptoren, was zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren führt, sodass sich die Adaptermoleküle wie FADD (Fas associated death domain) oder TRADD (TNF-receptor-1-associated death domain) an die intrazelluläre Death Domäne anlagern können.

Adapterproteine wie FADD oder TRADD enthalten in sich selbst eine Todesdomäne, sodass sie mit der Todesdomäne des Todesrezeptors interagieren können, wodurch der DISC (Death Inducing Signaling Complex) entsteht. Zusätzlich sind die Adapterproteine noch mit einer N-terminalen Todeseffektordomäne (DED), die an eine analoge Domäne der Procaspase 8 bindet, ausgestattet. Durch eine Konformationsänderung kommt es zu einer autokatalytischen Spaltung der Procaspase 8. Die aktive Form der Initiatorcaspase 8 leitet mittels Aktivierung der Effektorcaspasen den Zelltod ein (Thorburn, 2004, Peter and Krammer, 2003, Park *et al.*, 2005).

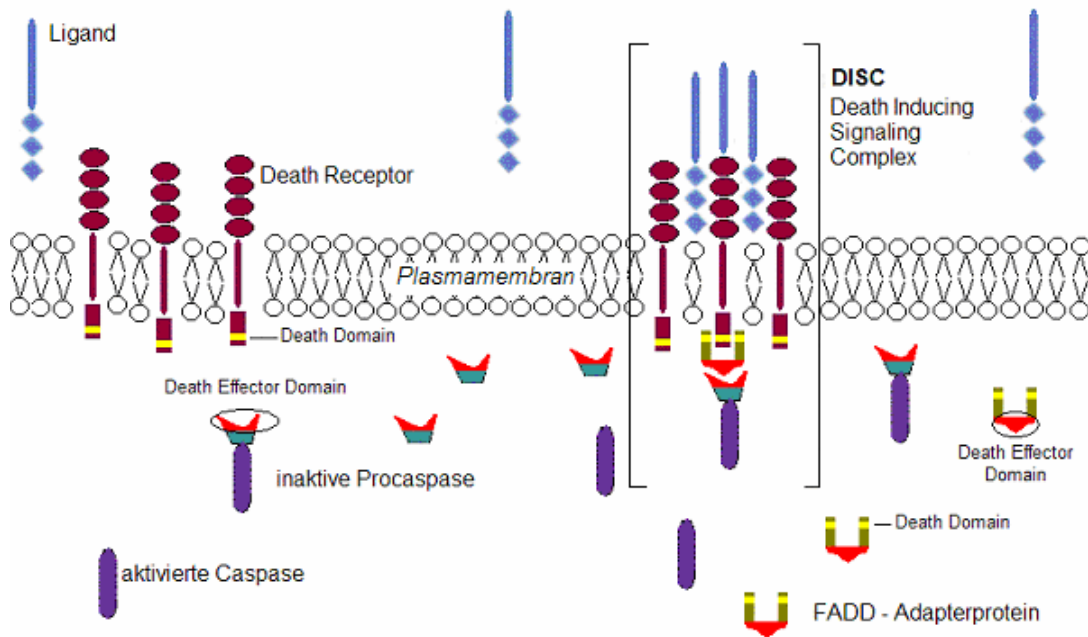


Abb. 2.7.1.1: Schematische Darstellung der Vorgänge, die zur Bildung des DISC führen, anhand des Beispiels von Fas. Aktiviert durch einen apoptotischen Stimulus bindet der Fas-Ligand an den Fas-Rezeptor. Es kommt zur Trimerisierung des Fas-Liganden-Rezeptor-Komplexes. Durch die dadurch bedingte Konformationsänderung des Todesrezeptors kann sich FADD, ein Adapterprotein, über die DD (Death Domain) an Fas anlagern. Die Procaspasen 8 und 10 können sich wiederum über die DED (Death Effector Domain) an FADD anlagern. Diesen gesamten Komplex bezeichnet man als DISC. Die Procaspasen werden über den DISC autokatalytisch aktiviert.

2.7.2 Mitochondrialer Apoptoseweg

Mitochondrien fungieren nicht nur als „Energieförderer“ der Zelle, sondern spielen auch im intrinsischen Apoptoseweg eine zentrale Rolle. Damit reagiert die Zelle auf die Exposition gegenüber verschiedenen exogenen Stimuli, wie Hypoxie, Hitzeschock, dem Entzug von Wachstumsfaktoren, zytotoxischen Substanzen, ionisierender Strahlung (Kluck *et al.*, 1997). Ein Schlüsselschritt im mitochondrial initiierten Signalweg ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien, die durch Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert wird. So sind viele Mitglieder der Bcl-2-Familie in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. An dieser entscheidet sich, ob das Apoptosesignal gehemmt oder weitergeleitet wird. Sofern die Aktivität der proapoptischen Bcl-2-Proteine dominiert, werden Strukturveränderungen der Membranaußenseite induziert, die daraufhin permeabel wird. (Antonsson 2004, Danial *et al.*, 2003, Arnoult *et al.*, 2002)

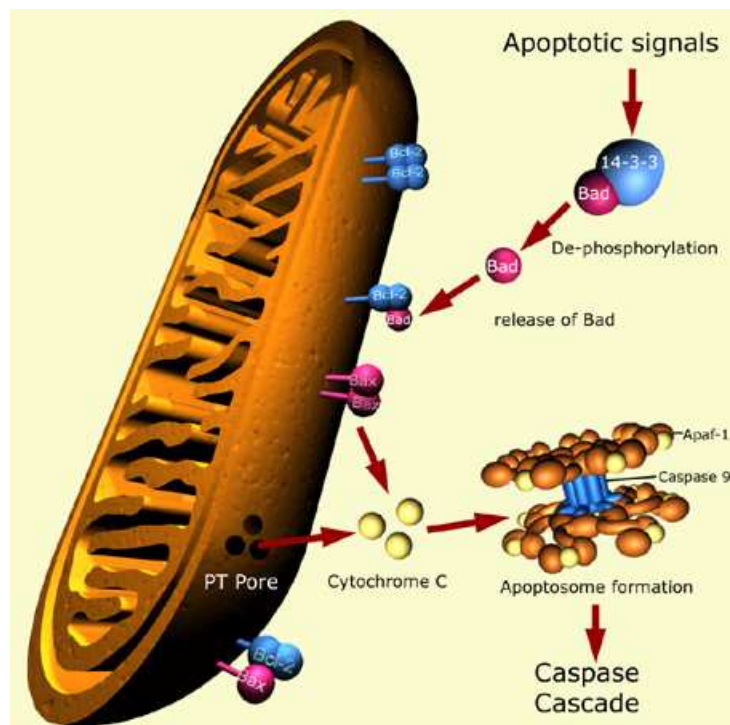


Abb. 2.7.2.1: Rolle der Mitochondrien in der Apoptose.

Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bcl-2 und Bcl-XL sind in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und werden tätig, um das Überleben der Zelle zu fördern. Viele der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bad und Bax wirken über die Mitochondrien, sei es über das Zusammenspiel von Bcl-2 und Bcl-XL oder über direkte Interaktionen mit der mitochondrialen Membran. Mitochondrien wirken apoptosefördernd, indem sie das Cytochrom c freisetzen, das zusammen mit Apaf-1, ATP und Caspase 9 einen Komplex bildet, der Apoptosom genannt wird. Dieser Komplex bewirkt die Aktivierung der Caspase-9 und induziert somit die Caspasekaskade.

<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/receptors.html>

Gleichzeitig bleibt die Atmungskette als Energielieferant, deren essentieller Bestandteil das Cytochrom c ist, aktiv.

Unabhängig davon kann Bax durch Einwirkung auf VDAC (voltage dependent anion channel) die sogenannte PTP (permeability transition pore) aktivieren (Crompton, 2003). Weitere Aktivatoren sind Ceramide, Calpain, der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel und ROS (Decaudin *et al.*, 1998, Liu, 1999). Die Öffnung der Megakanäle bewirkt einen osmotischen Einstrom von Wasser, Ionen und kleinen Molekülen zum Konzentrationsausgleich. Die PTP erlaubt die Passage von Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 kDa (Halestrap *et al.*, 2002). Dies führt zum Anschwellen der Mitochondrien und zum Platzen zuerst der inneren, da diese eine weitaus größere Fältelung aufweist, und später auch der äußeren Membran.

Es kommt zum Zusammenbruch der Atmungskette und des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$), welches die Freisetzung von AIF (apoptosis inducing factor) und Cytochrom induziert (Tsujimoto and Shimizu, 2006). Das nun im Zytosol vorliegende Cytochrom c assoziiert unter Beteiligung von dATP mit dem zytosolischen Adapterprotein Apaf-1. Es kommt zur Konformationsänderung mit Demaskierung der CARD-Region (caspase activation and recruitment domain). Die Procaspase 9 kann sich an Apaf-1 über die CARD-CARD-Wechselwirkungen anlagern. Diesen Komplex, bestehend aus Procaspase 9, Apaf-1, Cytochrom c und ATP, bezeichnet man als Apoptosom. Das Apoptosom stellt das mitochondriale Gegenstück zum DISC dar. In diesem Komplex kommt es zur autokatalytischen Spaltung der Procaspase 9. Die somit aktivierte Initiatorcaspase 9 setzt die Proteasekaskade in Gang (Cain, 2003, Cain *et al.*, 2002, Hill *et al.*, 2003, Pop *et al.*, 2006, Beere *et al.*, 2000).

Nach Apoptoseinduktion werden AIF (Apoptosis Inducing Factor) und Endonuklease G aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt. Sie translozieren über das Zytosol in den Internukleärraum und verursachen sowohl eine DNA-Kondensation als auch eine DNA-Fragmentierung (Susin *et al.*, 1999., Miramar *et al.*, 2001).

2.7.3 ER-induzierter Apoptoseweg

Ein vor kurzem entdeckter dritter Signalweg der Apoptose wird über das Endoplasmatische Retikulum aktiviert (Rao *et al.*, 2004). Dieser Pfad wird durch die Procaspase-12 vermittelt, die spezifisch mit dem ER assoziiert ist (Nakagawa *et al.*, 2000). Caspase-12 wird durch ER-Stress-Signale aktiviert, wie z.B. durch Störungen des Calciumhaushalts im ER oder durch die Akkumulation missgefalteter Proteine im ER, die zur Aktivierung der „unfolded protein response“(UPR) führt (Schroder, 2006, Rao *et al.*, 2004). Die Aktivierung dieses Signalweges ist unabhängig von Death-Rezeptor-Signalen und der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade, wie anhand von Caspase-12-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte.

2.8 Exekutivorgane der Apoptose–Caspasen

Unabhängig vom auslösenden Stimulus spielen Proteasen eine zentrale Rolle bei der Ausführung der Apoptose. Man bezeichnet diese Enzyme, deren aktives Zentrum Cystein enthält und die ihre Substrate selektiv hinter einem Aspartatrest spalten, auch als Caspasen (= Cysteinyl **A**spartat spezifische **P**roteasen). Beim Menschen war es möglich 11 verschiedene Caspasetypen zu identifizieren, in der Gruppe der Säugetiere insgesamt 14 (Los *et al.*, 2001). Die gefundenen Enzyme erweisen sich als struktur- und sequenzhomolog (Nicholson und Thornberry, 1997).

Die Familie der Caspasen hat zwei unterschiedliche Aufgabengebiete. Einerseits ist sie an der Synthese von Cytokinen beteiligt, andererseits triggert sie mit den aktiven Initiator- und Effektorcaspasen eine Signalkaskade, die zum Zelltod führt (Shi 2002, Denault und Salvesen, 2002). Der Einfluss der Cytokin-Aktivatoren (Caspase 1, 4 und 5) auf die Apoptose kann vernachlässigt werden. Diese sind hauptsächlich an Entzündungsprozessen beteiligt (Salvesen 2002, Stennicke and Salvesen 1998).

Extrazelluläre Signale oder zellulärer Stress aktivieren die Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10), deren Aufgabe in der Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) besteht. Die Substrate der Effektorcaspasen sind zelluläre Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus, an der DNA-Reparatur und am Erhalt der Zellstruktur beteiligt sind (Nicholson und Thornberry, 1997). Die Zerstörung lebenswichtiger Strukturproteine führt zum typischen apoptotischen Phänotyp. Das entscheidende Kriterium für die Eingliederung in die Gruppe der Initiator- oder Effektorcaspasen ist die Prodomäne. Initiatorcaspasen enthalten innerhalb dieser wiederum bestimmte Domänen (z.B. CARD, DED), die die Interaktion mit aktivierenden Proteinen (z.B. APAF, FADD) ermöglichen. Effektorcaspasen besitzen dagegen keine oder nur kurze funktionslose Prodomänen.

Die Synthetisierung der Caspasen erfolgt aus katalytisch weitgehend inaktiven Zymogenen, die entweder durch Proximitäts-induzierte Autoproteolyse (z.B. Caspase 8) oder durch vorgelagerte Initiatorcaspasen aktiviert werden.

Bei der Prozessierung kommt es zur proteolytischen Trennung der kleinen (p10) und der großen (p20) Untereinheit und anschließend zur Abspaltung der N-terminalen Prodomäne. Aktive Caspasen bilden ein Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten. Wie bei den Gerinnungskaskaden des Komplementsystems entsteht durch die Aktivierung der Caspasen eine proteolytische Kaskade, die das initiale Signal lawinenartig verstärkt.

2.9 Regulation der Apoptose

2.9.1 Apoptoseregulation auf Todesrezeptorebene

Die Aktivierung der Caspasen durch den CD95-Rezeptor bildet eine Grundlage der Apoptoseregulation. Einerseits kann es dazu nur bei Vorhandensein einer hochaffinen Bindungsstelle für DEDs kommen, andererseits wird durch die Anwesenheit von FLIP (FLICE-inhibitor protein) im DISC die Bindung sowie Aktivierung der Caspase 8 verhindert (Chang und Yang, 2000).

2.9.2 Apoptoseregulation durch Proteine der Bcl-2-Familie

Die Familie der Bcl-2-Proteine nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation der mitochondrial induzierten Apoptose über die Kontrolle der Cyt c-Freisetzung ein. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist das Bcl-2 (B cell lymphoma gene), welches aufgrund einer chromosomalen Translokation in hohen Konzentrationen als Protoonkogen in folliculären Lymphomen vorliegt (Korsmeyer 1992).

Eine Einteilung der Mitglieder der Bcl-2-Familie in drei Gruppen kann sowohl anhand struktureller als auch funktioneller Kriterien erfolgen.

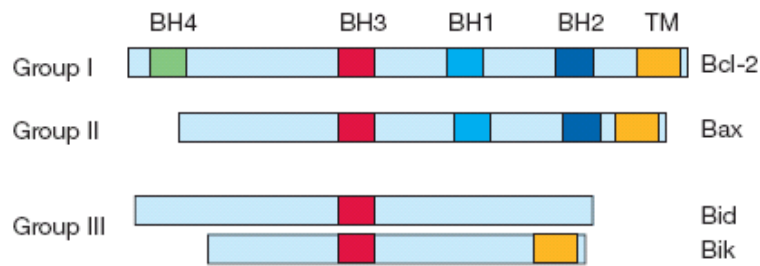


Abb. 2.9.2.1: Schematische Darstellung der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. BH1 bis BH4 stellen die homologen Domänen der Proteinfamilie dar, TM bezeichnet die hydrophobe Transmembrandomäne (Hengartner, 2000).

Charakteristisch für alle Mitglieder der ersten Gruppe ist das Auftreten von vier Domänen mit hoher Sequenzhomologie. BH 1-4. z.B. Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X.

Das C-terminale Ende codiert eine Strecke von hydrophoben Aminosäuren, die für das Andocken an Membranen wichtig ist.

Bcl-2 ist an der cytoplasmatischen Seite der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert, die den Kern und das endoplasmatische Retikulum umhüllt. Während Bcl-2 und die pro-survival-homologen Bcl-XL und Bcl-w, die ihm am ähnlichsten sind, alle vier BH-Bereiche enthalten, besitzen die anderen pro-survival-Mitglieder meistens nur die Bereiche BH1 und BH2. Die Hauptfunktion der Mitglieder dieser Gruppe besteht darin, dass sie alle eine anti-apoptotische Aktivität aufweisen und die Zelle vor dem Zelltod schützen (Reed *et al.*, 1996, Petros *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu entwickeln die Mitglieder der zweiten Gruppe eine proapoptotische Aktivität. Mitglieder dieser Gruppe, die Bax und Bak einschließt, haben fast die gleiche Struktur wie die Proteine der Gruppe 1. Ihnen fehlt die BH4-Domäne (Tsuji moto and Shimizu, 2000). Dagegen besitzen die sieben Mitglieder der Gruppe 3 nur den zentralen kurzen BH3-Bereich und konnten bisher nicht mit einem der bekannten Proteine in Beziehung gebracht werden. BH3-only-Proteine wirken also pro-apoptotisch, indem sie in Bax und dessen Homologen eine Konformationsänderung auslösen und sie dadurch aktivieren (Kuwana *et al.*, 2005, Hacker and Weber, 2007).

Man kann die Bcl-2-Familie in proapoptotisch wirkende Mitglieder wie z.B. Bax und Bad und antiapoptotisch wirkende Mitglieder wie z.B. Bcl-2 oder Bcl-XL unterteilen (Zamzami *et al.*, 1998, Tsuji moto 1998).

Durch Dimerisierung können sich pro- und antiapoptotische Mitglieder gegenseitig in ihrer Wirkung neutralisieren. Die Anfälligkeit einer Zelle für einen apoptotischen Stimulus hängt vom Verhältnis der beiden Subtypen zueinander ab (Korsmeyer, 1995, Yin *et al.*, 1994, Sedlak *et al.*, 1995, Wei 2001). Bax und Bak sind nicht allein auf den Regulationsmechanismus der Heterodimerisierung angewiesen, sondern können auch über die Kontrolle einzelner Initiatorcaspasen und des ER die Apoptose einleiten (Ruiz-Vela *et al.*, 2005, Oakes *et al.*, 2005).

2.9.3 Apoptoseregulation durch Smac/DIABLO und die IAP-Familie

Bei den IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) handelt es sich um eine Familie antiapoptotischer Proteine, die zuerst in Baculoviren nachgewiesen werden konnten. Ihre Rolle in der Apoptose besteht darin, sich an das katalytische Zentrum der Caspasen 3, 7 und 9 anzulagern und somit deren enzymatische Aktivität ohne funktionelle Beeinträchtigung der Caspasen 1, 6, 8 und 10 zu hemmen (Deveraux and Reed, 1999, Salvesen and Duckett, 2002).

Bevor die Apoptose beginnt, werden die überschüssig aktivierten Caspasen durch IAPs gehemmt, damit ein un gelenkter Zelltod verhindert wird. Der hemmende Effekt der IAPs kann wiederum durch Proteine aufgehoben werden, die ein IAP-bindendes Tetrapeptid enthalten (Shi, 2002b). Das erste Mitglied dieser Proteinfamilie ist das im Mitochondrium lokalisierte Protein DIABLO (Verhagen *et al.*, 2000), auch Smac (Second Mitochondria - derived Activator of Caspases) genannt (Du *et al.*, 2000), das im Jahre 2000 erstmals beschrieben wurde. Es ist in der Lage, die IAPs zu inhibieren und die Caspasen über den intrinsischen Signalweg zu stimulieren. Smac/DIABLO wird zusammen mit Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt. Es bildet einen Komplex mit dem Apaf-1-Apoptosom. Ist nun die im Apoptosom befindliche Pro-Caspase 9 durch IAPs inaktiviert, hebt DIABLO diese Inhibition auf und die Apoptose kann fortschreiten.

2.10 Klinische Bedeutung der Apoptose

Die Genese vieler Erkrankungen lässt sich unter anderem durch „zu viel“ oder „zu wenig“ Apoptose in den Zellen der erkrankten Organe erklären. Erkrankungen mit zu viel Apoptose sind z.B. der Schlaganfall, der Herzinfarkt (Lorenz *et al.*, 2000), die Rückenmarksverletzung und AIDS (Thompson 1995, Rudin and Thompson 1997). Krankheiten mit zu wenig Apoptose sind z.B. Krebs (Sarasin 1999) und Autoimmunerkrankungen (Lorenz *et al.*, 2000).

Ein vorstellbarer Therapieansatz bestünde darin, die Dysregulation zwischen Leben und Tod der Zellen zu beseitigen und somit das natürliche Gleichgewicht wiederherzustellen.

Als Beispiel einer Erkrankung mit „zu viel“ Apoptose kann man die Schädigung des Sehnervs durch glaukomatöse Erkrankungen nehmen. Wenn es möglich wäre, durch Hemmung der Apoptose eine nachhaltige Schädigung der Nervenzellen zu verhindern, könnte dadurch den Betroffenen ein größeres Gesichtsfeld bzw. ihre Sehfähigkeit erhalten bleiben.

2.11 Erythrozyten

2.11.1 Morphologie der Erythrozyten

Die Erythrozyten sind 7,5 μm große, bikonkave, elastische, diskusförmige Scheiben mit zentraler Aufhellung, die sich selbst durch die kleinsten Kapillaren (\varnothing 5 μm)

hindurchschlängeln können. Die wichtigste Aufgabe der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff ins Gewebe und der Abtransport von Kohlenstoffdioxid in die Lunge. Dazu sind sie mit Hämoglobin ausgestattet. Um die Aufrechterhaltung der Zellform zu gewährleisten, ist das Zytoskelett der Erythrozyten aus einem Netzwerk aus Spektrin, Ankyrin, Aktin, Protein 4.1, Adducin, Tropomyosin, Tropomodulin, Dematin und p55 aufgebaut. Laterale Wechselwirkungen bewirken den Aufbau eines richtigen Netzwerkes, das durch β -Spektrin, Ankyrin, Band 3 bzw. Protein 4.1 und Glykophorin C in der Lipiddoppelschicht verankert wird (Nunomura *et al.*, 1997).

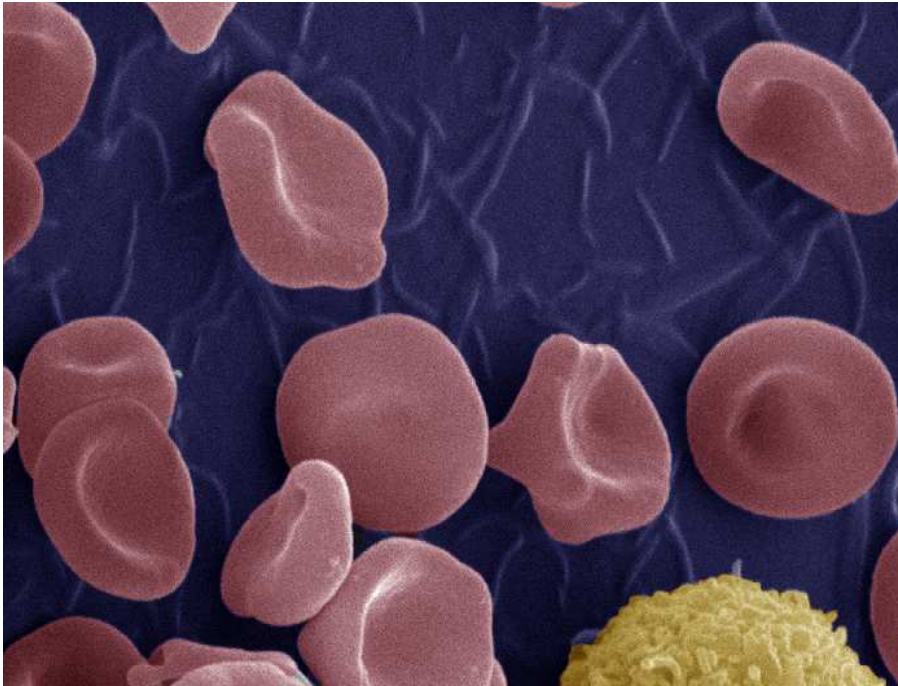


Abb. 2.11.1.1: Eine Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von normozytären Erythrozyten und Echinozyten. (Diese Aufnahme wird mit der freundlichen Genehmigung von Michael Duszenko verwendet. Sie wurde im Interfakultären Institut für Biochemie in Tübingen aufgenommen)

2.11.2 Physiologie der Erythrozyten

Die aerobe Energiegewinnung bleibt den Erythrozyten aufgrund der nichtvorhandenen Mitochondrien verwehrt. Sie sind mit Zellorganellen sparsam ausgestattet. Während ihrer Reifung stoßen sie sowohl den Zellkern als auch die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat aus. Sie gleichen „Zellmumien“, die sich für ihre restliche Lebensdauer von 120 Tagen im Blutstrom treiben lassen. Ihre Energie (ATP) schöpfen sie aus der anaeroben Glykolyse und können damit Zellstruktur und -funktion sowie osmotischen Druck selbst bei fehlendem Zellkern und sich erschöpfender Enzymausstattung aufrechterhalten.

Das Ruhemembranpotential der Erythrozyten liegt bei ca. -10 mV. Dieses Potential wird durch das Zusammenspiel verschiedener Einflüsse geschaffen. Einen dieser Einflüsse stellt die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dar. Sie transportiert aktiv unter Spaltung von ATP 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle hinaus und führt im Austausch 2 K^+ -Ionen in die Zelle hinein. Infolgedessen entsteht ein Ungleichgewicht sowohl der Ionenkonzentration von K^+ und Na^+ als auch der elektrischen Ladungen zwischen intra- und extrazellulärem Raum.

Um dieses Ungleichgewicht auszubalancieren, bilden sich elektrische und chemische Gradienten. Als ein weiterer Einfluss ist die Tatsache zu werten, dass die Zellmembran für Na^+ -Ionen beinahe gar nicht und für K^+ -Ionen nur sehr schlecht permeabel ist. So entspricht das Ruhemembranpotential der Erythrozyten nahezu dem Gleichgewichtspotential für Chlorid, das die Zellmembran sehr gut permeieren kann.

2.12 Eryptose

Faszinierenderweise können Erythrozyten als Reaktion auf gewisse Stimuli wie hyperosmolaren Schock, oxidativen Streß oder Energiemangel eine „ Art von Apoptose“ durchführen (Brand *et al.*, 2003, Duranton *et al.*, 2002, 2003, Lang *et al.*, 2002, 2003a, 2005a). Für diese Form des programmierten Zelltodes wurde die Bezeichnung Eryptose eingeführt (Lang *et al.*, 2005 a). Die Eryptose ist durch Zellschrumpfung, Ablösen der Zellmembran, Aktivierung von Proteasen und Phosphatidylserinexposition an der Membranaußenseite charakterisiert. Durch die Exposition von Phosphatidylserin signalisieren die Erythrozyten den Makrophagen, dass sie „wünschen“ phagozytiert zu werden (Boas *et al.*, 1998, Fadok *et al.*, 2000, Romero and Romero 1999).

2.12.1 Übersicht über die Signalwege

Bisher konnten zwei Signalwege nachvollzogen werden, die die Eryptose auslösen können.

- a) Die Aktivierung der Cyclooxygenase führt zur Bildung des Prostaglandins E_2 , das wiederum zur Aktivierung der Ca^{2+} permeablen Kationenkanäle beiträgt. Der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt in den Erythrozyten zu den in der Abbildung dargestellten Effekten.
- b) Die Aktivierung der Phospholipase A_2 vermittelt die Freisetzung des PAF (Platelet Activating Factor). Dieser aktiviert eine Sphingomyelinase, die zu der Entstehung des proapoptotischen Sphingolipids Ceramid beiträgt.

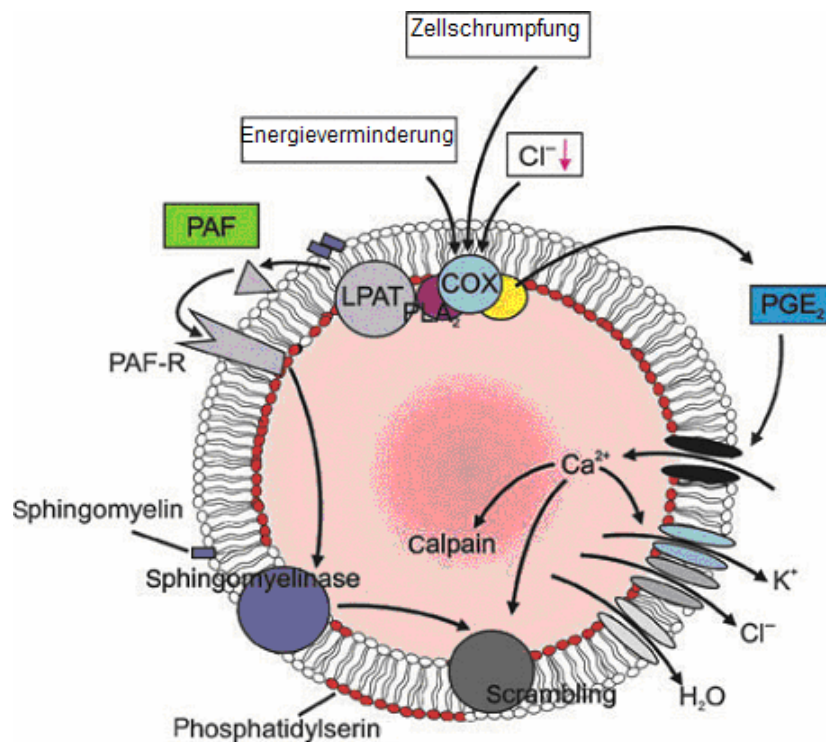


Abb. 2.12.1.1: Darstellung der verschiedenen Signalwege, die zum programmierten Zelltod bei Erythrozyten führen können (siehe Text) (Lang *et al.*, 2004).

2.12.2 Bedeutung der unselektiven Kationenkanäle bei der Eryptose

Unselektive Kationenkanäle in Erythrozyten werden nicht nur durch oxidativen Stress, sondern auch durch Acetylcholin, Membrandepolarisation, osmotischen Schock, Energieverminderung und die Entfernung von intra- und extrazellulärem Chlorid aktiviert. Diese Kationenkanäle sind dadurch charakterisiert, dass sie durch EIPA und Amilorid blockiert werden können. Nach ihrer Aktivierung ist ihre Permeabilität für Calcium stark erhöht und es kommt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, was wiederum die nachfolgenden Veränderungen im Erythrozyteninneren verursacht.

2.12.3 Aktivierung der erythrozytären Scramblase

Durch den erhöhten Ca^{2+} -Einstrom kommt es einerseits zu einer Hemmung der Translokase, welche die Asymmetrie der Zellmembran aufrechterhält, und andererseits zu einer Aktivierung der Scramblase. Die Scramblase trägt zu dem Zusammenbruch der Membranasymmetrie und der Exposition von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite bei (Berg *et al.*, 2001, Bratosin *et al.*, 2001, Daugas *et al.*, 2001). Einen zusätzlichen Aktivierungsmechanismus für die Scramblase stellen die zellvolumensensiblen Kationenkanäle dar.

2.12.4 Aktivierung eines Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanals (GARDOS-Kanal)

Der Ca^{2+} -abhängige K^+ -Ausstrom aus menschlichen Erythrozyten wurde bereits in den fünfziger Jahren beschrieben. Nachfolgende Studien enthüllten, dass ein K^+ -spezifisches Membranprotein (GARDOS-Kanal) für dieses Phänomen (GARDOS-Effekt) verantwortlich ist (Maher *et al.*, 2003).

Die Bedeutung dieses Kanals ist in seiner Funktion bei der pathophysiologischen Zellschrumpfung, wie sie z.B. bei der Sichelzellanämie vorkommt, zu suchen (Hoffmann *et al.*, 2003). Aufgrund der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, kommt es zur Aktivierung von K^+ -Kanälen, was es den K^+ -Ionen ermöglicht, entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten die Zellmembran durch die offenen K^+ -Kanäle zu passieren. Infolgedessen kommt es zu einer Verschiebung des elektrischen Gradienten. Um diesen auszugleichen, strömt Cl^- aus der Zelle, wodurch sich die Osmolarität verändert. Schließlich strömt zum osmotischen Ausgleich Wasser aus der Zelle. Aufgrund des Wasserverlustes kommt es zum Volumenverlust, der zur Zellschrumpfung führt (Hoffmann *et al.*, 2003, Lang *et al.*, 2003).

2.12.5 Aktivierung von Calpain

Die Ca^{2+} -abhängige Papain-ähnliche cytosolische Protease (Kurzbezeichnung Calpain), die beim Abbau des Cytoskeletts eine Rolle spielt, wird durch PGE_2 aktiviert. Das Wirkoptimum von Calpain liegt bei einem neutralen pH-Wert (Guroff *et al.*, 1964). Calpain ist ein Heterodimer. Es hat ein Molekulargewicht von 110 kD.

Die kleine Untereinheit, (30K, CS), hat ein Molekulargewicht von 30 kD, die große Untereinheit (80K, CL) ein Molekulargewicht von 80 kD (Suzuki *et al.*, 2004).

Calpain setzt vor allem die zytosolisch vorliegenden Proteine mit der Schnittstelle Tyr-Leu um, so z. B. Casein, Cytoskelettproteine, p53 und die Proteinkinase c. Zusätzlich vermag Calpain Bid und Bax, ähnlich wie die Caspasen (Johnson and Guttman, 1997, Gao and Dou., 2000), und sogar die Procaspasen 3 und 9 zu spalten, wobei diese jedoch weder aktiviert noch inaktiviert werden. Die Aktivierung von Calpain erfolgt autokatalytisch in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen.

Durch eine Konformationsänderung wird die aktive Stelle zugänglich gemacht und das Enzym vom Zytosol an die Plasmamembran transloziert. Dort baut es Bestandteile des Zytoskeletts wie Ankyrin R ab, wodurch Ausstülpungen der Zellmembran entstehen (Saez *et al.*, 2006).

2.12.6 Durch Ceramide induzierte Eryptose

Die Arbeitsgruppe von Lang *et al.* konnte 2006 nachweisen, dass Erythrozyten, die sich in einem hypertonen Medium befinden, cytosolisch Ceramid anhäufen. Ceramid entsteht aus dem Membranphospholipid Sphingomyelin, welches durch die Sphingomyelinase gespalten wird (Lang *et al.*, 2006). Es wird ebenfalls infolge des durch Aktivierung des GARDOS-Kanals verursachten K^+ -Ausstromes in verstärktem Maße gebildet. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Sensitivität der Scramblase für Ca^{2+} und somit zu einer Steigerung ihrer Aktivität. Die aktivierte Scramblase führt zu einer höheren Phosphatidylserinexposition an der Membranoberfläche (Lang *et al.*, 2006, Lang *et al.*, 2005). Ceramide nehmen bei der Induktion der Apoptose in kernhaltigen Zellen gleichfalls eine zentrale Rolle ein.

2.12.7 Bedeutung der Caspasekaskade bei der Erytose

Reife Erythrozyten enthalten bedeutende Mengen an Procaspase 3 (Effektorcaspase) und 8 (Initiatorcaspase), wohingegen essentielle Bestandteile des mitochondrialen Apoptoseweges, wie Caspase 9, Apaf 1 und Cytochrom c, fehlen (Berg *et al.*, 2001). Die in den Erythrozyten vorhandenen Caspasen können nicht durch die üblichen apoptotischen Stimuli aktiviert werden. Nur bei Procaspase 3 konnte eine Aktivierung durch oxidativen Stress nachgewiesen werden (Mandal *et al.*, 2002).

Die Procaspase 3 scheint, abgesehen von der obengenannten Ausnahme, nicht aktiv am programmierten Zelltod teilzunehmen (Bratosin *et al.*, 2001). Daraus kann man ableiten, dass der programmierte Zelltod in Erythrozyten weitgehend unabhängig von Caspasen abläuft.

2.12.8 Hemmung der Erytose durch Erythropoietin

Erythropoietin, der potenteste Stimulator der Erythropoese, ist dafür bekannt, die Erythrozytenbildung zumindest teilweise zu stimulieren, indem er die Apoptose der EryP-Progenitor-Zellen hemmt (Jelkmann, 1992, Polenakovic and Sikole, 1996). Unter seinem Einfluss entstehen pro Sekunde ca. 1,6 Millionen Erythrozyten im Rückenmark neu. Die klinischen Daten weisen darauf hin, dass Erythropoietin auch die Lebensspanne und die Lebensfähigkeit der zirkulierenden Zellen erhöht (Polenakovic and Sikole, 1996). Die Arbeitsgruppe von Myssina *et al.* konnte mittels Scatchard-Plot-Analysen nachweisen, dass die Erythrozyten eine sehr geringe, aber gerade noch nachweisbare Anzahl an Erythropoietin-Rezeptoren exprimieren. Dennoch reicht die Aktivierung dieser Rezeptoren aus, um den auf die Apoptose folgenden osmotischen Schock zu vermindern (Myssina *et al.*, 2003).

Osmotischer Schock führt offenbar über zwei voneinander unabhängige Signalwege zur Aktivierung der Scramblase. Nur der Pfad, welcher über zellvolumensensible Kationenkanäle den Ca^{2+} -Einstrom reguliert, kann durch Erythropoietin gehemmt werden. Im Gegensatz zu der über osmotischen Schock induzierten kann die durch Entfernung des extrazellulären Chlorids induzierte Apoptose komplett mit Erythropoietin gehemmt werden. Durch Chlorid-Entfernung werden vor allem die unselektiven Kationenkanäle aktiviert.

Die Charakterisierung dieser Kanäle erfolgte in Patch-Clamp-Experimenten mittels EIPA und Amilorid.

Die Bedeutung der protektiven Wirkung von Erythropoietin kann anhand der Beobachtungen an dialysepflichtigen Patienten unterstrichen werden. Der prozentuale Anteil an Phosphatidylserin exponierenden Erythrozyten im zirkulierenden Blut wird innerhalb von drei Stunden nach der Erythropoietin-Gabe bedeutsam erniedrigt (Myssina et al., 2003).

2.12.9 Klinische Bedeutung der Eryptose

Die Eryptose hat bei vielen Erkrankungen eine wichtige Funktion. So kann man bei den verschiedenen Formen von Anämien (z.B. Sichelzellanämie, Eisenmangelanämie, Thalassämie, Glucosephosphatdehydrogenasemangel, Anämie infolge einer Schwermetallintoxikation) beobachten, dass die Erythrozyten empfindlich auf apoptotische Stimuli reagieren, woraus eine gesteigerte Eryptoserate resultiert. Analog dazu wird bei diesen Krankheitsbildern eine deutlich verkürzte Lebensspanne der Erythrozyten beobachtet (Benjamin and Manning, 1986, Corash *et al.*, 1980, Ruymann *et al.*, 1978). Auch bei den Krankheitsbildern Hämolytisch-urämisches Syndrom und Sepsis scheint die Eryptose eine bedeutsame Rolle zu spielen. Der entsprechende pathologische Mechanismus soll auf der erhöhten Exposition von Phosphatidylserin beruhen, was zu einem erhöhten Haftvermögen der Erythrozyten an der Gefäßwand und dadurch zur Unterbrechung der Mikrozirkulation beiträgt (Bonomini *et al.*, 2002, Closse *et al.*, 1999, Eda and Sherman, 2002, Gallagher *et al.*, 2003, Manodori *et al.*, 2000, Setty *et al.*, 2002, Wali *et al.*, 1988).

Dagegen hat die Eryptose bei einer Malariainfektion eher eine protektive Rolle. Die befallenen Erythrozyten exponieren Phosphatidylserin und können somit aus der Blutbahn entfernt werden. Dadurch kann einer Superinfektion effektiv vorgebeugt werden.

3 Zielsetzung der Doktorarbeit

Wie die Arbeitsgruppe von Myssina et al. bereits 2004 zeigen konnte, werden die unselektiven Kationenkanäle durch Erythropoietin reguliert (Lang *et al.*, 2003, Myssina *et al.*, 2004). Dadurch nimmt die Phosphatidylserinexposition ab und die Lebensspanne der zirkulierenden Erythrozyten verlängert sich. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die unselektiven Kationenkanäle und infolgedessen der programmierte Zelltod der Erythrozyten unter hormoneller Kontrolle stehen. Bereits 2003 konnte die Arbeitsgruppe von Hines et al. zeigen, dass Epinephrin die Bildung von cAMP in Sichelzellen steigert und sich dadurch die Haftfähigkeit von Erythrozyten an Endothelzellen erhöht (Hines *et al.*, 2003). Weiterhin erbrachte die Arbeitsgruppe von Oonishi et al. 1997 den Nachweis, dass Epinephrin anhand Ca^{2+} -abhängiger Signale die Filterfähigkeit und die Verformbarkeit der Erythrozyten moduliert (Oonishi *et al.*, 1997). Es war ausserdem möglich zu beweisen, dass Epinephrin auch die Aufnahme des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* in Erythrozyten beeinflusst (Harrison *et al.*, 2003). Zudem liess sich belegen, dass Epinephrin durch mechanische Verformung die Sichelzellerythrozyten des Hasen zur ATP-Freisetzung anregt (Sprague *et al.*, 2001). Die gegenwärtige Studie wurde durchgeführt, um abzuklären, ob eine Regulation dieser Kationenkanäle auch durch die Catecholamine erfolgt, und um den dahinterstehenden Mechanismus aufzuklären. Dazu wurden mithilfe eines Durchflusszytometers und der Patch-Clamp-Technik nach dem Whole-Cell-Modus experimentelle Untersuchungen über die Effekte der einzelnen Catecholamine auf die unselektiven Kationenkanäle und den daraus resultierenden Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durchgeführt. Um die unselektiven Kationenkanäle zu aktivieren, wurden die Erythrozyten sowohl in einer chloridfreien Lösung als auch in einer Badlösung, die PGE_2 enthielt, inkubiert. Anhand von Fluoreszenz-Messungen mit Fluo-3-AM konnte die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden. Die Aktivität der Scramblase wurde anhand des in proportionalem Ausmaß auftretenden gebundenen Annexins bestimmt.

4 Material und Methoden

4.1 Gewinnung und Aufbereitung von Erythrozyten

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche stellte die Blutbank der Transfusionsmedizin der Universität Tübingen Erythrozytenkonzentrate gesunder freiwilliger Probanden zur Verfügung. Die Ethikkommission der Universität Tübingen überprüfte und genehmigte den Versuchsaufbau. Eine Aufklärungs- und unterschriebene Einwilligungserklärung von allen Probanden ist vorhanden.

Zur Herstellung der Erythrozytenkonzentrate wurde ein „OptiPure RC quadruple blood pack set“ mit einem Filter von Baxter (Unterschleißheim Deutschland) verwendet. Dazu mischt man automatisch 70 ml des CPD-Puffers (siehe Tab. 4.4.1: Zusammensetzung des CPD-Puffers) mit 500ml Blut. Bei 4795 g und 22°C trennen sich die Blutkomponenten bei zehnteiliger Zentrifugieren. Anschließend werden Erythrozyten, Plasma und buffy coat in die entsprechenden Blutbeutel gepresst.

Die Stabilisation der Erythrozyten erfolgte durch Zugabe von SAG-M (siehe Tab. 4.4.2: Zusammensetzung der SAG-M Lösung). Dazu presst man die Lösung bei Raumtemperatur durch einen integrierten Leukozyten-Depletionsfilter und bewahrt das erhaltene Erythrozytenkonzentrat bis zu seiner Verwendung bei 4°C auf. Um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten, führte man die Experimente bei 37°C in isotoner Kochsalzlösung durch.

4.2 Analyse der Blutzellenanzahl

Die Thrombozytenanzahl in den jeweiligen Erythrozytenkonzentraten ließ sich mit Hilfe eines Blutzellanalysegeräts (CellDyn3000, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) automatisch bestimmen. Die Identifikation der Zellen erfolgte durch die Kombination ihrer optischen und elektrischen Eigenschaften in einem geeigneten Zählermedium. Entsprechend der Analyse enthielten die Erythrozytenkonzentrate $2,4 \pm 0,2 \%$ ($n = 22$) der ursprünglichen Anzahl Thrombozyten im Blut.

Alternativ ist es möglich, die Thrombozytenanzahl durchflusszytometrisch unter Verwendung einer Thiazolorange-Färbung zu bestimmen (Kienast and Schmitz, 1990). Bei dieser Messung wurde das Retic-COUNT-Reagens (Thiazole orange) von Becton Dickinson eingesetzt. Die Messungen fanden in einem FACS-Calibur (Becton Dickinson) entsprechend der Gebrauchsanleitung der Hersteller statt. Die Zellzahl im Thrombozyten-Gate der entsprechenden Vorwärtstreuung (forward scatter, FSC) wurde gegen die Thiazolorange-Fluoreszenz-Intensität (FL-1H) aufgetragen und mit dem Cell-Quests-Programm ausgewertet.

Die Messung der Leukozyten in den Erythrozytenkonzentraten ließ sich durchflusszytometrisch mit Hilfe eines Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) erfassen. Ein TrueCount Kit der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) stellte die interne Normalisierung ein. Entsprechend den Messergebnissen enthielten die Erythrozytenkonzentrate $0,012 \pm 0,001$ % ($n = 22$) der ursprünglichen Anzahl Leukozyten im Blut. Folglich war die Konzentration der Leukozyten in den Erythrozytenkonzentraten so gering, dass sie die Messung in keiner Weise beeinträchtigen konnte.

Mit dem elektronische Hämatologie-Teilchenzähler (MDM 905, Medical Diagnostics Marx, Butzbach, Deutschland) wurde die Zahl der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten in den Erythrozytenkonzentraten bestimmt.

4.3 Verwendete Substanzen

Dobutamin

Die Herstellung der Dobutaminlösung erfolgte in der Konzentration 10 mM. Um diese Konzentration zu erhalten, wurden 3,0 mg Dobutamin in 888 µl destilliertem Wasser gelöst.

Dopamin

Die Herstellung der Dopaminlösung erfolgte in der Konzentration 10 mM. Um diese Konzentration zu erhalten, wurden 5,0 mg Dopamin in 3,26 ml destilliertem Wasser gelöst.

Isoproterenol

Die Herstellung der Isoproterenollösung erfolgte in der Konzentration 100 mM. Um diese Konzentration zu erhalten, wurden 38 mg in 153,4 ml destilliertem Wasser gelöst.

Phenylephrin

Die Herstellung der Phenylephrinlösung erfolgte in der Konzentration 50 mM. Um diese Konzentration zu erhalten, wurden 4,8 mg in 471,4 µl destilliertem Wasser gelöst.

Ionomycin

Der Stoff Ionomycin ist ein Produkt der Firma Sigma Aldrich. In der Natur kommt es als Antibiotikum in *Streptomyces conglobatus* vor. Es wird vor allem gegen grampositive Bakterien eingesetzt. Auf Säugetierzellen wirkt Ionomycin als ein sehr starkes Calcium Ionophor, das Calcium im Komplex 1:1 bindet und durch biologische Membranen transportiert. Für die durchgeführten Versuche wurden Ionomycinlösungen in den Konzentrationen 0,01 µM bis 1 µM aus Ionomycin in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt.

Annexin-V-Fluos

Ein frühes Merkmal der Apoptose ist der Verlust der asymmetrischen Anordnung der Membranphospholipide. Dabei wird Phosphatidylserin, das normalerweise streng an der cytoplasmatischen Innenschicht der Zellmembran lokalisiert ist, vermehrt in die äußere Schicht der Zellmembran transloziert und dort exponiert. Auf diesem Umstand basiert die Messung apoptotischer Zellen mit dem Durchflußzytometer.

Annexin-V ist ein 35 kD großes Protein mit antikoagulierender Wirkung, das sich bevorzugt Ca^{2+} -abhängig an anionische Phospholipide anlagert. Zu Phosphatidylserin, einem Vertreter dieser Phospholipide, besteht eine besonders hohe Affinität. Um das an Phosphatidylserin gebundene Annexin zu markieren, findet eine Konjugation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Annexin-V-Fluos) statt. Dazu wird der Farbstoff Fluorochrom Fluoreszenzthiocyanat (FITC) benutzt.

Für die durchgeführten Versuche wurde ein Produkt der Firma Roche (Penzburg, Deutschland) eingesetzt. Die Herstellung frischer Aliquots wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers im Verhältnis von je 20 µl Annexin-V-Fluos zu 1 ml Waschpuffer vorgenommen, und die so erhaltenen Lösungen bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -15 bis -25°C in Dunkelheit gelagert.

Fluo-3 AM

Bei Fluo-3 AM handelt es sich um ein **Acetoxymethylester-Derivat (AM)**, das als lipophiles Molekül die Zellmembran sehr gut permeieren kann. Sobald es sich innerhalb der Zelle befindet, werden die lipophilen „Blockgruppen“ durch zelluläre Esterasen hydrolysiert. Dadurch bildet sich ein geladenes Molekül, für das die Zellmembran nicht mehr permeabel ist, und es kommt zu einer Anreicherung dieses Moleküls in der Zelle. Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an dieses Molekül führt zu einer starken Zunahme der Fluoreszenzintensität, die durchflusszytometrisch erfasst werden kann. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM wird von der Firma Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) hergestellt.

Fluo-3 AM fluoresziert im Gegensatz zu anderen Ca^{2+} -selektiven Farbstoffen erst nach intrazellulärer Hydrolyse und Konjugation mit Ca^{2+} . Dadurch kann man intrazelluläres Ca^{2+} sehr spezifisch erfassen. Das Absorptionsmaximum von Fluo-3AM liegt bei einer Wellenlänge von 506 nm, daher ist es durch den Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert, gut anregbar. Das Emissionsmaximum liegt dagegen bei 526 nm.

4.4 Verwendete Lösungen

CPD-Puffer

Diese Lösung wird zur Herstellung von Erythrozytenkonzentraten verwendet.

Tab. 4.4.1: Zusammensetzung des CPD-Puffers

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

SAG-M-Lösung

Diese Lösung dient der Stabilisierung der gewonnenen Erythrozyten.

Tab. 4.4.2: Zusammensetzung der SAG-M-Lösung

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

Ringerlösung

Die Ringerlösung (siehe Tab. 4.4.3: Zusammensetzung der Ringerlösung) wurde als Basislösung für die meisten Experimente benutzt. Die Lösung wurde mit Natronlauge (NaOH) und N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure (HEPES) auf pH 7,4 titriert. Die Osmolarität der Lösung betrug 300 mOsm und ließ sich anhand eines VAPRO 5520 Dampfdruck-Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) überprüfen.

Tab. 4.4.3: Zusammensetzung der Ringerlösung.

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

0-Chlorid-Lösung

Die 0-Chlorid Lösung (siehe Tab. 4.4.4: Zusammensetzung der 0-Chlorid-Lösung) ist die Grundlage für viele Versuche. Sie entstand, indem das Chlorid der Ringerlösung durch den gleichen Betrag an Gluconat ersetzt wurde. Auch diese Lösung kann mit Natronlauge (NaOH) und N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure (HEPES) auf pH 7,4 eingestellt werden. Die Osmolarität der Lösung betrug 300 mOsm und wurde mit Hilfe eines VAPRO 5520 Dampfdruck-Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) überprüft.

Tab. 4.4.4: Zusammensetzung der 0-Chlorid-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]
CaCl ₂	1
Glucose	5
HEPES	32
Na-gluconate	125
MgSO ₄	1

Annexin-Waschpuffer

Nach der der Inkubation der Erythrozyten mit und ohne Zugabe von Catecholaminen, wurde ein Annexin-bindender Puffer zum Waschen und Verdünnen der Proben eingesetzt (siehe Tab. 4.4.5: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers). Derselbe Puffer wird verwendet, um den Fluoreszenzfarbstoff Annexin-V-Fluos zu verdünnen (1:50). Die Lösung lässt sich mit Natronlauge (NaOH) und N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ehansulfonsäure (HEPES) auf pH 7,4 titrieren

Tab. 4.4.5: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers

Substanz	Konzentration [mg/ml]
CaCl ₂	5
HEPES	10
NaCl	140
NaOH	nach Bedarf

Pipettenlösung

Diese Lösung wird bei allen Patch-Clamp-Versuchen als Pipettenlösung verwendet.

Tab. 4.4.6: Zusammensetzung der Pipettenlösung pH 7,4.

Substanz	Konzentration [mM]
EGTA	1
HEPES/NaOh	5
NaCl	10
Na- gluconat	115
MgATP	1

Badlösung

Die vor allem zu Kontrollzwecken eingesetzte NaCl-haltige Badlösung bestand aus folgenden Substanzen (siehe Tab. 4.4.7: Zusammensetzung der Badlösung mit einem pH-Wert von 7,4).

Tab. 4.4.7: Zusammensetzung der Badlösung mit einem pH-Wert von 7,4.

Substanz	Konzentration [mM]
CaCl ₂	5
HEPES/NaOH	20
MgCl ₂	10
NaCl	115

Chloridfreie Badlösung

Diese Lösung hemmt bei den Patch-Clamp-Experimenten einen möglichen Cl⁻-Einstrom. Die chloridfreie Badlösung ist bei dieser Arbeit auch in etwas modifizierter Form, z.B. durch die Zugabe verschiedener Substanzen wie Isoproterenol 10 µM, eingesetzt worden.

Tab. 4.4.8: Zusammensetzung der chloridfreien Badlösung mit einem pH-Wert von 7,4.

Substanz	Konzentration [mM]
CaCl ₂	1
HEPES/NaOH	10
MgCl ₂	1
Na-gluconat	140

4.5 FACS-Analyse

4.5.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die Abkürzung FACS steht für **F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting und beschreibt eine Methode, die vor allem in der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung eingesetzt wird. Der Ausdruck „FACS“ ist von der Firma Becton Dickinson patentrechtlich geschützt. Die allgemein gebräuchliche Bezeichnung ist Durchflusszytometrie.

4.5.2 Geschichtliches zur Durchflusszytometrie

1949 wurden die Voraussetzungen für die Durchflusszytometrie, wie sie heutzutage bekannt sind, von Wallace Coulter geschaffen. Er entwickelte ein Patent, mit dessen Hilfe man Teilchen, die sich in Lösung befinden, zählen kann. Durch dieses Patent wurde z. B. das Zählen der Leukozyten im Rahmen der Blutanalyse vereinfacht. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Entdeckung der hydrodynamischen Fokussierung durch Van Dilla. Dank der technischen Fortschritte auf den Gebieten der Laser- und Computertechnik, war es möglich den Vorläufer des heutigen Durchflusszytometers zu entwickeln.

Mit den heutigen Messgeräten ist es möglich, eine standardisierte Analyse von ca. 5000 Partikeln in einer Sekunde durchzuführen. Durch Zusatzausstattungen kann man die Geschwindigkeit auf 20.000 und mehr Teilchen in einer Sekunde steigern. Bei einer Messung können gleichzeitig etwa sieben Parameter untersucht werden. Die heutzutage leistungsfähigsten Sorter können sogar bis zu 10 Parameter bei einer Teilchenzählrate von 70.000 pro Sekunde sortieren und analysieren.

4.5.3 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der FACS-Analyse kann man die Menge der Oberflächenmoleküle und intrazellulären Proteine bestimmen. Dabei ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt wird, Grundvoraussetzung. Mit einer Kapillare lassen sich die Zellen einer Einzelzellsuspension ansaugen. Diese Zellen wandern im Sensormodul infolge der hydrodynamischen Fokussierung quasi „im Gänsemarsch“ an einem Laserstrahl mit einer definierten Wellenlänge vorbei.

Hydrodynamische Fokussierung der Teilchen bedeutet eine wesentlich höhere Messauflösung, da ein Zusammenfall verschiedener Messereignisse verhindert wird und man eine genaue Positionierung der Teilchen in der Durchflusszelle erreicht. Diese genaue Positionierung erhält man, indem man unter Anwendung von Pressluft die Partikel im Probenstrom mit einem höheren Druck als die Flüssigkeit des Hüllstromes (sheath) in die Kammer drückt.

Die dadurch entstehende laminare Strömung gewährleistet die saubere Aneinanderreihung der Partikel.

Durch den monochromatischen Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes, wenn sie mit der entsprechenden Energiemenge angeregt werden, auf eine höhere Energiestufe gehoben. Nach der Anhebung auf ein höheres Energieniveau fallen die Elektronen unter Freisetzung von Lichtenergie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Anhand eines Photodetektors registriert man die freigesetzte Photonenkonzentration. Sie ist proportional der Zahl gebundener Antikörper pro Zelle. Aufgrund der Lichtbeugung und Lichtstreuung können Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns sowie Struktur der Zellwand) erlangt werden. Eine FACS-Analyse kann prinzipiell mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig durchgeführt werden. Die für die Messung verwendeten Farbstoffe lassen sich zwar bei der gleichen Wellenlänge anregen, besitzen aber für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren.

Bei der Erfassung dieser Faktoren helfen zwei Parameter. Das Vorwärtstreulicht Forward Scatter (FSC) dient als Maß für die Größe der Zelle und das Seitwärtstreulicht (SSC) dient als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns). Anhand dieser beiden Parameter kann man die Blutzellen relativ gut sortieren. Zusätzlich kann man die Probe vorher mit Antikörpern, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen beladen sind, inkubieren. Die Antikörper sind gegen spezielle Oberflächenantigene (z.B. CD=Cluster of differentiation) gerichtet. Erst wenn eine Markierung der entsprechenden Merkmale möglich ist, kann auch eine Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Eine zusätzliche Steigerung der Informationsdichte ist durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser möglich, die ihrerseits den Einsatz unterschiedlicher Farbstoffe erlauben.

4.5.4 Aufbau eines Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer ist in der Regel aus drei funktionellen Einheiten aufgebaut:

- Meist dient ein Laser als Lichtquelle, die durch eine Messkammer und einen Photodetektor unterstützt wird.
- Ein Ansaug- und Passagesystem reguliert den Einstrom der Teilchen.
- Eine Rechneinheit, erfasst und interpretiert die elektrischen Signale.

Der Laserstrahl einer definierten Wellenlänge regt die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes an. Dadurch werden sie auf eine höhere Energieschale gehoben. Sobald sie diese Schale wieder verlassen und auf ihr ursprüngliches Niveau zurückfallen, setzen sie Energie in Form von Photonen frei. Ein Photodetektor registriert diese Photonenstrahlung und bringt einen kurzen elektrischen Impuls hervor. Das Signal ist proportional zur Menge der entstandenen Strahlung und somit auch proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Die Resultate werden in Schaubildern, den so genannten Dot Plots, veranschaulicht. In diesen Dot Plots stellt jeder Punkt einen Messwert dar.

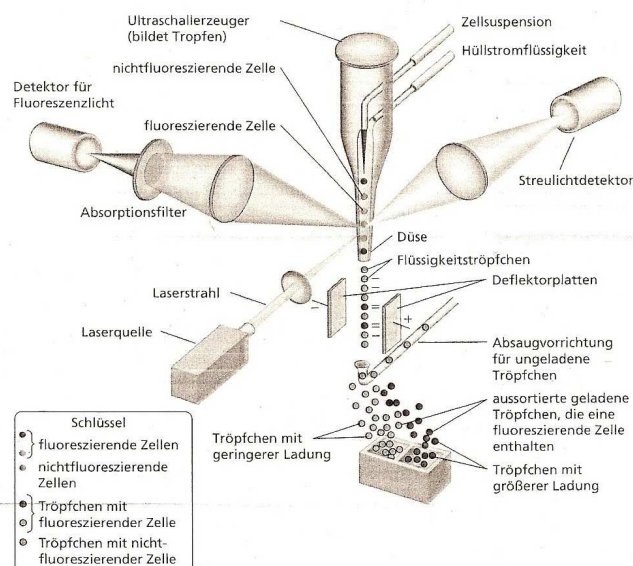


Abb. 4.5.4.1: Schematische Darstellung der zentralen Komponenten eines FACS-Systems (Durchfluss, Analyse und Sorter). Die Funktion der einzelnen Komponenten wird im Text beschrieben (Parks and Herzenberg, 1982).

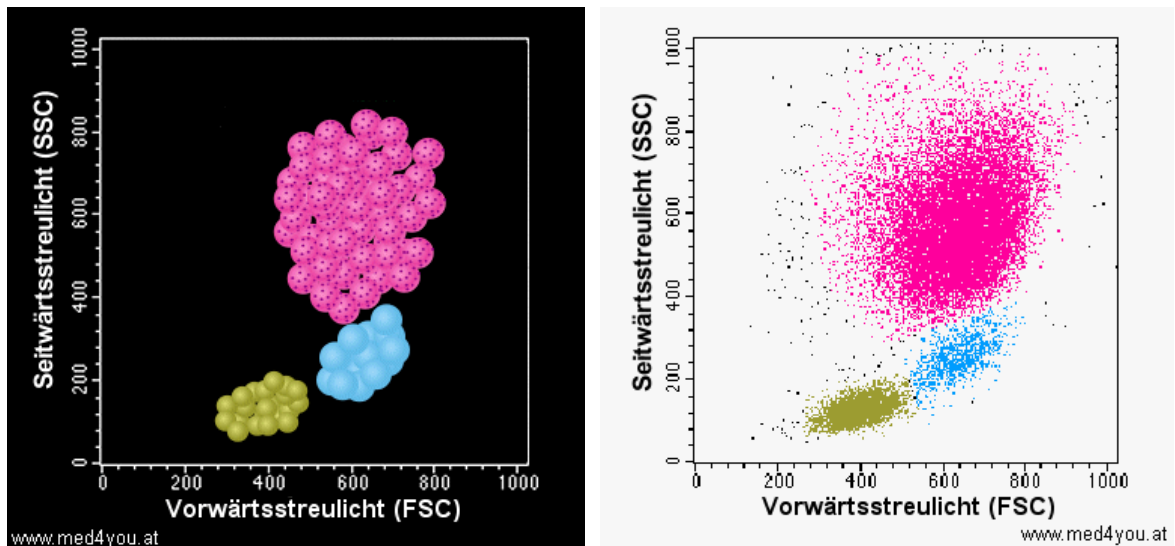


Abb. 4.5.4.2: In dieser Abbildung werden sowohl die schematische (rechts) als auch die reale Darstellung eines Dot Plots (links) gezeigt. Die Zellen werden sowohl nach ihrem FSC (Vorwärtsstreulicht) als auch nach ihrem SSC (Seitwärtsstreulicht) im Diagramm dargestellt. In der linken Abbildung entspricht jeder einzelne der gezeigten Punkte einer gemessenen Zelle bzw. einem zu messenden Ereignis.

Die durchflusszytometrischen Analysen sind am Physiologischen Institut der Universität Tübingen mit einem FACS-CALIBUR der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt worden.

Das FACS-CALIBUR ist mit einem Argonlaser der definierten Wellenlänge von 488 nm, die im blauen Bereich des Farbspektrums liegt, ausgestattet. Zusätzlich ist noch ein Diodenlaser mit der definierten Wellenlänge von 635 nm, die der Farbe rot entspricht, vorhanden. Diese zwei Laser ermöglichen die gleichzeitige Messung von bis zu vier unterschiedlichen Farben. Die suspendierten Zellen werden mit einer Geschwindigkeit von 6 m/s in die Messkammer gesaugt. Um die von den Zellen ausgesandten Emissionsspektren zu differenzieren, benutzt man Interferenzfilter. Die unterschiedlichen Emissions- bzw. Fluoreszenzspektren werden jeweils verschiedenen Kanälen zugeordnet. Auf diese Weise wird vom Fluoreszenzkanal FL-1 ein Spektrum im Bereich von 515-545 nm registriert. Eine Rechereinheit (MacIntosh 7600/132) registriert und bearbeitet die erhobenen Daten mit Hilfe des Programms CellQuest Research, Version 3,01f, das ebenfalls von der Firma Becton Dickinson vertrieben wird. Das Zellvolumen der Erythrozyten konnte in den vorliegenden Experimenten anhand der Analyse mit dem Forward Scatter bestimmt werden.

Die Leuchtstärke des benutzten Fluorochroms Annexin-V-Fluos wurde in FL1 (Wellenlänge der Exzitation 488 nm, Wellenlänge der Emission 530 nm) gemessen.

Im Forward Scatter werden die Messwerte linear und bei der Fluoreszenz-Analyse logarithmisch verstärkt. Es wurden jeweils 20.000 Zellen pro Probe gemessen. Die zuletzt erfolgte Tabellenkalkulation und Erstellung der Diagramme erfolgte mit Hilfe von „Excel“ (Microsoft, Unterschleissheim, Deutschland).

4.5.5 Durchführung einer Annexin-V-Färbung

Alle Versuchsansätze wurden bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank verarbeitet. Alle Annexinfärbungen wurden nach der Methode von Andree et al. (Andree et al., 1990) bearbeitet.

Zuerst wurde eine Erythrozytensuspension (3 µl Erythrozytenkonzentrat auf 1 ml der jeweils verwendeten Lösung) hergestellt. Daraufhin erfolgte der Zusatz anderer wirksamer Substanzen in den angegebenen Konzentrationen. Schließlich wurden die Zellen bei 37°C während einer definierten Zeitspanne inkubiert.

Zur Färbung wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen und in 1 ml Annexin-Waschpuffer verdünnt. Die erhaltenen Ansätze kamen für fünf Minuten bei 3600 rpm in die Zentrifuge (Zentrifuge Sorvall RT 6000B, Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Die Resuspension des dabei erhaltenen Pellet erfolgte auf dem Vortexrührer (Carl Roth, Karlsruhe, D) in 100 µl einer aus Annexin-V-Fluos und Annexin-Waschpuffer im Verhältnis 1:50 zusammengesetzter Lösung. Daraufhin schloss sich eine zehnmünütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur in Dunkelheit an. Zum Schluss wurde der Färbevorgang durch die Zugabe von 400 µl Waschpuffer angehalten und die Proben durchflusszytometrisch (FL1, FSC) analysiert.

4.6 Durchführung einer intrazellulären Ca^{2+} -Bestimmung

Zur durchflusszytometrischen Ca^{2+} -Bestimmung ging man nach der Methode von Andrews et al. (Andrews et al., 2002) vor. Nach dieser Methode werden die Erythrozyten mit Fluo-3 AM (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) beladen. Alle Versuchsansätze wurden ebenfalls bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank verarbeitet.

Im ersten Arbeitsschritt stellte man eine Erythrozytensuspension (2 μl Erythrozytenkonzentrat auf 1 ml der jeweils verwendeten Lösung) her. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 2 μl einer Fluo-3 AM Stammlösung [2,0 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO)]. Der erhaltene Versuchsansatz wurde für den Zeitraum von 15 Minuten bei einer Temperatur von 37°C in völliger Dunkelheit und unter stetem Durchschütteln inkubiert. Danach fügte man den Proben weitere 2 μl Fluo-3 AM Stammlösung zu und inkubierte die Zellen anschließend nochmals über einen Zeitraum von 25 Minuten.

Die erhaltenen Proben wurden bei 22°C für die Dauer von fünf Minuten bei 1000 g zentrifugiert, zweimal mit einer Ringerlösung, die 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) enthielt, und einmal in reiner Ringerlösung gewaschen.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die mit Fluo-3 AM beladenen Erythrozyten mit 1 ml Ringerlösung resuspendiert. Die erhaltenen Suspensionen einer Versuchsreihe wurden, abgesehen von den Kontrollen, mit dem zu testenden Wirkstoff (Dopamin, Isoproterenol, Phenylephrine oder Dobutamin) bzw. mit Calcium Ionophor Ionomycin (1 μM , Sigma, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und während unterschiedlicher Zeiträume bei 37°C inkubiert.

Zuletzt erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Dabei wurde die durch Ca^{2+} -bedingte Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL 1 bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

4.7 Patch Clamp

4.7.1 Geschichtliches zur Patch-Clamp-Technik

1976 wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann die Patch-Clamp-Technik als eine Verfeinerung der Spannungsklemme (Voltage Clamp) konstruiert, um die Ströme in einzelnen Ionenkanälen zu messen. 1991 wurde ihnen für diese Erfindung der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen.

4.7.2 Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Bei der Patch-Clamp-Technik handelt es sich um eine elektrophysiologische Methode, mit der man sowohl die Vorgänge beim Öffnen und Schließen als auch die Ionenleitfähigkeit eines einzelnen Ionenkanals messen kann. Diese Technik misst den elektrischen Strom, der durch Ionenwanderungen über einem Patch bzw. schmalen Zellmembranstück (engl. patch ~ Fleck) hervorgerufen wird. Durch das Anlegen eines Unterdruckes und das Ansaugen der Membran an die Pipettenspitze wird ein so genanntes Gigaseal (engl. seal ~ Dichtung) hergestellt. Je größer das Seal - in der Regel liegt der Widerstand bei ca. $1\text{ G}\Omega$ - desto geringer ist das durch die Leckströme bedingte Hintergrundrauschen. Erstaunlicherweise haftet das Membranstück sehr fest an der Glaspipette, wodurch sich verschiedene Manipulationsmöglichkeiten und infolgedessen unterschiedliche Messkonfigurationen ergeben. Bei der im Experiment genutzten Whole-Cell-Konfiguration kann man das Membranstück unter der Pipette mit einem kurzen Saugpuls durchbrechen und somit einen direkten Kontakt zwischen Patch-Pipette und Cytosol herstellen. Man misst dabei die Ströme über der gesamten Zellmembran wie bei der konventionellen intrazellulären Ableitung.

Das Membranpotential einer Zelle unterliegt normalerweise ständigen Schwankungen. Anhand einer elektrischen Regelschaltung (clamp) hält man das Potential auf einem Sollwert konstant. In der mit der Pipettenlösung befüllten Glaspipette befindet sich eine Messelektrode, die als sogenannter Klemmverstärker die Spannung in der Pipette auf einen Sollwert einstellt und den durch die Kanäle der Plasmamembran fließenden Strom misst.

Bei der Registrierung eines Membranstroms wird dieser durch einen Kompensationsstrom gleicher Amplitude aber entgegengesetzter Polarität ausgeglichen. Dadurch finden eine Messung des aktuellen Membranpotentials der Zelle und ein Vergleich des Messergebnisses mit der Sollspannung statt. Bei Differenzen zwischen diesen beiden Spannungen wird ein entgegen gerichteter Strom in die Zelle injiziert. Der im Bereich von wenigen Mikrovolt liegende Kompensationsstrom wird in Patch-Clamp-Versuchen gemessen.

4.7.3 Aufbau einer Patch-Clamp-Apparatur

Abbildung 4.7.4.1 zeigt eine schematische Darstellung der Messanordnung, die bei der Patch-Clamp-Technik angewendet wird.

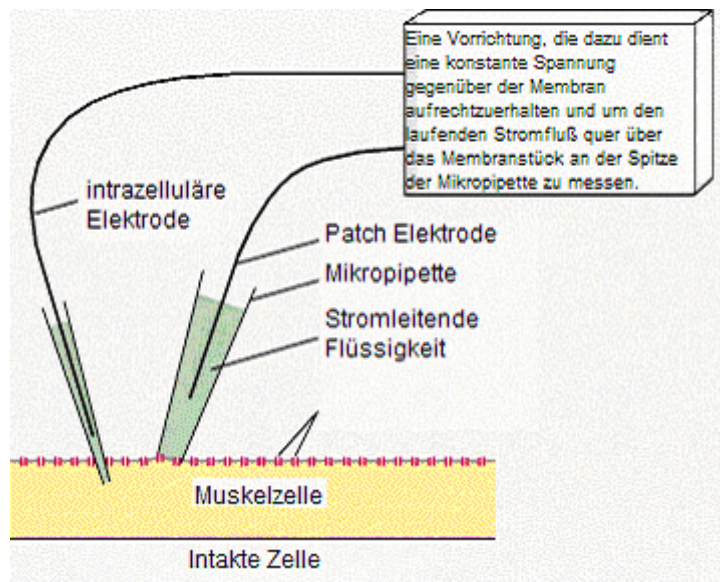


Abb. 4.7.3.1: Schematischer Überblick über die Patch-Clamp-Technik. Dargestellt ist eine einfache Anlage, die dazu gedacht ist, den Stromfluß durch einzelne Ionenkanäle in der Plasmamembran einer lebenden Zelle zu messen. Die Patch-Elektrode ist mit einer stromleitenden Salzlösung befüllt und wird mit einem leichten Sog an die Plasmamembran angelegt. Die 0,5 µm im Durchmesser messende Spitze bedeckt ein Gebiet, das nur einen oder wenige Ionenkanäle enthält. Die zweite Elektrode wird in das Zytosol eingetaucht. Das aufnehmende Gerät misst nur den Strom, der durch die Kanäle in diesem Membranabschnitt fließt (**Neher and Sakmann, 1992**).

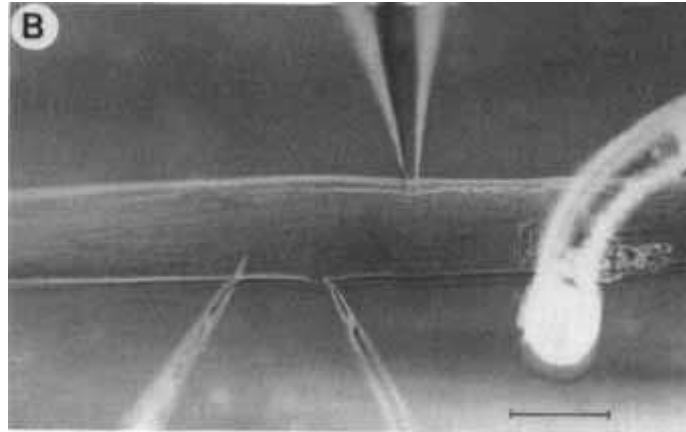


Abb. 4.7.3.2: Auf diesem mikroskopisch aufgenommenen Bild sieht man die einzelne Muskelfaser eines Frosches mit der nackten Endplatte nach der Entfernung der Nervenanschlussklemme. Die Spitze der Patch-Pipette berührt die Endplatte (Lichtstreifen). Zwei intrazelluläre Mikroelektroden werden genutzt, um an dieser Stelle das Membranpotential der Faser abzuklemmen (Sakmann, 1992).

4.7.4 Durchführung der Patch-Clamp-Technik

Die Patch Clamp Experimente wurden entsprechend dem „fast whole cell mode“ nach Hamill et al. (Hamill et al., 1981) durchgeführt. Es wurden eigens Glaspipetten aus Borosilikatglas (Borosilikatglaskapillaren, 150 TF-10, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK) hergestellt. Die Kapillaren konnten auf einem Mikroprozessor-getriebenen DMZ Puller (Zeitz, Augsburg, Deutschland) gezogen und in Kombination mit einem elektrischen Mikro-manipulator MS 314 (MW, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt werden. Der Durchmesser der erhaltenen Pipettenspitze betrug 1 μm . Anhand eines chlorierten Silberdrahtes wurden die selbstgezogenen Pipetten aus Borosilikatglas, deren Spitzenwiderstand zwischen acht und zwölf Megaohm lag, mit einem EPC 9 Verstärker (Heka, Lambrecht, Deutschland) gekoppelt. An einem Computer mit ITC-16 Schnittstelle (Instrutech, Port Washington, N.Y., USA) (Duranton et al., 2002) unter Verwendung der Pulse Software (Heka, Lambrecht, Deutschlands) erfolgte die Aufzeichnung der dabei erhaltenen Ströme. Bei jeder durchgeführten Messung wurden die Zellen kontinuierlich superfundiert und das Bad über eine NaCl-Ringerbrücke geerdet.

Das Liquid-Junction-Potential zwischen Bad- und Pipettenlösung, sowie zwischen Badlösung und der NaCl-Ringerbrücke wurde nach Barry und Lynch (Barry and Lynch, 1991) korrigiert und die Offsetpotentiale, die sich spontan zwischen den beiden Elektroden bildeten, wurden vor der Messung ausgeglichen. Für die Whole-Cell-Konfiguration wurde das Haltepotential an den Erythrozytenmembranen auf -30 mV geklemmt und anschließend 400 oder 700 ms lange Rechteckpulse von -100 mV bis +100 mV in 20 mV-Schritten appliziert. Die ursprünglichen Ableitungen nach der Whole-Cell-Konfiguration wurden ohne Filterung gemessen (Aquisitionsrate 5 kHz).

Die Analyse der gemessenen Ströme erfolgte anhand der Durchschnittswerte zwischen 350 und 375 ms jedes Rechteckpulses. Die gemessenen Potentiale gelten für die zytoplasmatische Seite der Zellmembran in Bezug auf den Extrazellulärraum.

4.8 Statistik

Aus den erhaltenen Daten ergab sich das arithmetische Mittel und der SEM (Standardfehler des Mittelwertes). „n“ nennt die Zahl voneinander unabhängiger durchgeführter Messungen. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des gepaarten oder ungepaarten t-Tests bei der Gegenüberstellung zweier Experimente bzw. mit dem ANOVA-Test (Analysis of variance) beim Vergleich einiger Versuchsreihen ausgeführt. Dabei wurden nur p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Auswirkungen der Catecholamine auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran

Die in diesen Versuchen eingesetzten humanen Erythrozyten wiesen nach 36-stündiger Inkubation bei 37°C in Ringerlösung eine geringe, aber bereits nachweisbare Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche auf. Die Menge der betroffenen Erythrozyten lässt sich anhand des Bindungsgrades von Annexin-V ermitteln.

5.1.1 Auswirkungen von Isoproterenol auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran

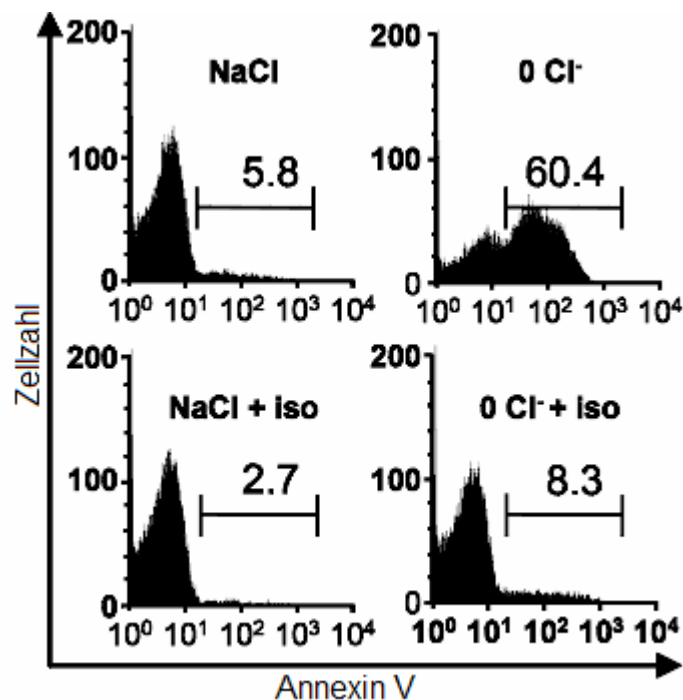


Abb. 5.1.1.1: Inhibition der Zunahme der Phosphatidylserinexposition in chloridfreier Lösung infolge von Isoproterenol. Die Durchflußzytometerhistogramme stellen die Bindung von Annexin an die Erythrozyten dar, die über einen Zeitraum von 36 Stunden einer Lösung, die NaCl enthielt (Tafeln links), bzw. einer chloridfreien Lösung (Tafeln rechts) ausgesetzt waren. Auf den oberen Tafeln kann man das Verhalten der Erythrozyten in Abwesenheit und auf den unteren Tafeln in Anwesenheit von Isoproterenol (10 µM) erkennen.

Vor der 36-stündigen Inkubation mit einer chloridfreien Lösung wurde das Annexin nur durch eine geringe Anzahl von Erythrozyten gebunden, was auf die Aufrechterhaltung der Phosphatidylserin-asymmetrie über die gesamte Zellmembran hindeutet. Es liess sich zeigen, dass es bei den in chloridfreier Badelösung inkubierten Erythrozyten zum Auftreten einer erhöhten Apoptoserate kam. Der Prozentsatz der annexinbindenden Erythrozyten erhöhte sich auf ca. zwei Drittel der gesamten Erythrozytenpopulation, was man mittels der erhöhten Annexinbindungsrate sichtbar machen konnte. Der Zusatz von Isoproterenol zu diesem Ansatz reduzierte die Menge an annexinbindenden Erythrozyten signifikant. Das Ausmaß der jeweiligen Inhibition zeigte sich abhängig sowohl von der eingesetzten Konzentration der Hemmstoffe als auch von der Inkubationszeit, während sich bei den Versuchsansätzen, die Ringerlösung enthielten, nach Zusatz von Isoproterenol keine nennenswerten Effekte darstellen liessen.

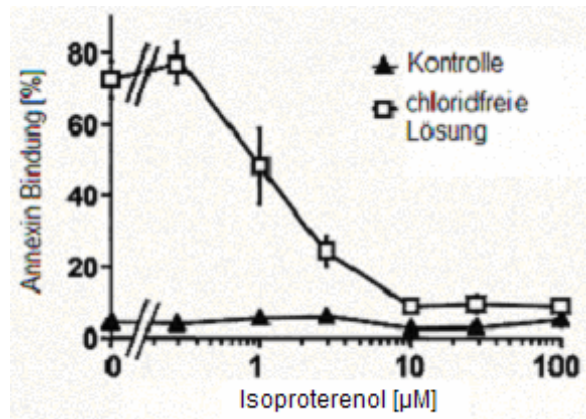


Abb. 5.1.1.2: Prozentualer Anteil der Annexin-bindenden Erythrozyten, aufgetragen gegen die jeweils eingesetzte Isoproterenol-Konzentration. Die Zellen wurden 36 h in Ringerlösung bzw. chloridfreier Badelösung in Anwesenheit von Isoproterenol unterschiedlicher Konzentration (0,3 bis 100 µM) inkubiert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 3$.

Nach Zugabe von Isoproterenol in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 bis 100 µM) zu den Versuchsansätzen mit chloridfreier Lösung, liess sich eine signifikante Reduzierung des Prozentsatzes annexinbindender Zellen nachweisen.

Die Dosiswirkungskurve zeigte einen halbmaximalen Wirkungseffekt bei 1 μM Isoproterenol. Während sich bei den Versuchsansätzen, die Ringerlösung enthielten, nach Zusatz von Isoproterenol keine nennenswerten Effekte feststellen liessen.

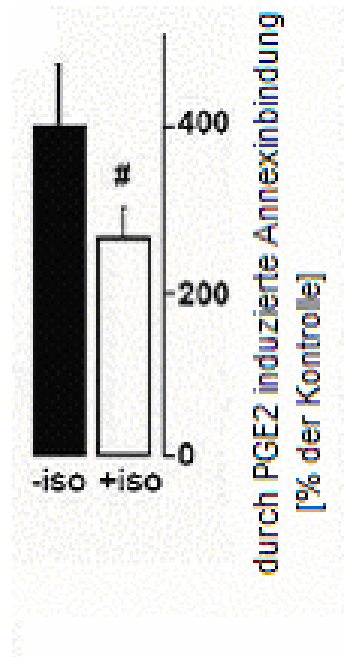


Abb. 5.1.1.3: Prozentualer Anteil der PGE₂-induzierten Annexinbindung in An- bzw. Abwesenheit von Isoproterenol. Die Zellen wurden für 24 h PGE₂ (50 μM) ausgesetzt, entweder in Anwesenheit (+iso, heller Balken) oder Abwesenheit (-iso, dunkler Balken) von Isoproterenol (1 μM). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 6.

Es erfolgte eine Inkubation der Erythrozyten über einen Zeitraum von 24 Stunden in Anwesenheit von PGE₂ (50 μM). PGE₂ hat einen aktivierenden Einfluss auf die unselektiven Kationenkanäle. Bei Zusatz von Isoproterenol (1 μM) ist im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Verringerung im Ausmass der Phosphatidylserinexposition ($p < 0,05$, gepaarter t-test) von PGE₂-behandelten Zellen zu erkennen. Dies verdeutlicht wiederum den inhibitorischen Effekt von Isoproterenol.

5.1.2 Auswirkungen von Phenylephrin, Dopamin und Dobutamin auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran

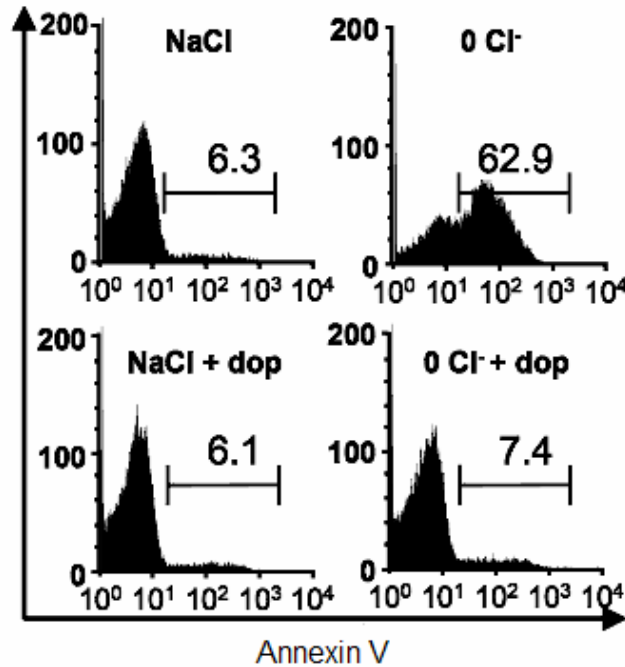


Abb. 5.1.2.1: Die Durchflusszytometerhistogramme stellen die Bindung von Annexin an die Erythrozyten dar. Die Erythrozyten wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden in Ringerlösung (Tafeln links) oder chloridfreier Lösung (Tafeln rechts) in Abwesenheit (Tafeln, oben) oder in Anwesenheit (Tafeln, unten) von Dopamin (10 μ M) inkubiert.

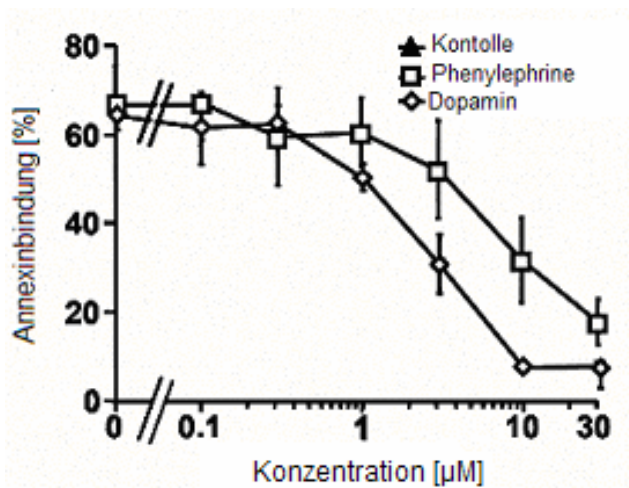


Abb. 5.1.2.2: Prozentualer Anteil der Annexinbindenden Erythrozyten aufgetragen gegen die jeweils eingesetzte Phenylephrin- bzw. Dopamin-Konzentration. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden in chloridfreier Lösung entweder in Anwesenheit von Phenylephrin (Quadrate) oder Dopamin (Diamanten) inkubiert. Beide Lösungen lagen in Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 30 μ M vor. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 3.

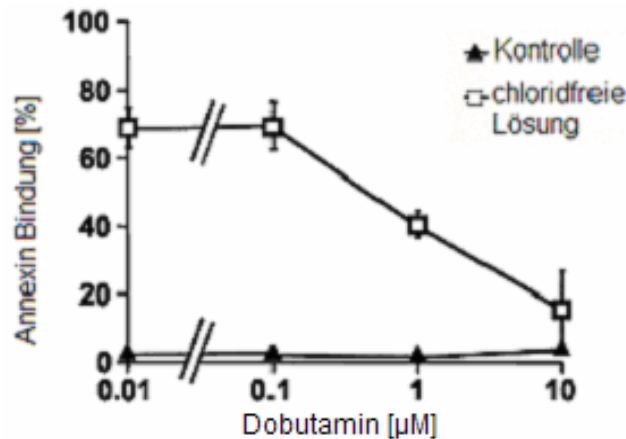


Abb. 5.1.2.3: Prozentualer Anteil der Annexinbindenden Erythrozyten, aufgetragen gegen die jeweils eingesetzte Dobutamin-Konzentration. Die Zellen werden über einen Zeitraum von 36 Stunden in Ringerlösung (schwarze Dreiecke) bzw. in chloridfreier Lösung (weiße Quadrate) in An- oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von Dobutamin (0,01 bis 100 µM) inkubiert. Arithmetische Mittel ± Standardabweichung bei n = 3.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Phenylephrin, Dopamin und Dobutamin die Exposition von Phosphatidylserin in chloridfreier Lösung hemmen und somit den Effekt von Isoproterenol imitieren. Der Zusatz dieser Substanzen zu den Versuchsansätzen mit Ringerlösung zeigt ebenfalls keinerlei Wirkung. Dagegen konnte der in chloridfreier Badlösung induzierte Anstieg der annexinbindenden Zellen unter dem Einfluss dieser Substanzen (Phenylephrin, Dopamin, Dobutamin) deutlich vermindert werden. Die erforderliche Konzentration von Phenylephrin für die halbmaximale Hemmung liegt jedoch höher ($IC_{50} \sim 10 \mu\text{M}$) als die von Isoproterenol (vgl.: Abb. 5.1.2.2). Dopamin benötigte ebenfalls eine etwas höhere Konzentration für denselben Effekt ($IC_{50} \sim 3 \mu\text{M}$) als Isoproterenol (vgl.: Abb. 5.1.2.2). Dagegen befindet sich der halbmaximale Wirkungseffekt von Dobutamin mit ($IC_{50} \sim 1 \mu\text{M}$) ungefähr in der Größenordnung von Isoproterenol (vgl.: Abb. 5.1.2.3).

5.2 Auswirkungen der Catecholamine auf das erythrozytäre Zellvolumen

Die Bestimmung des erythrozytären Zellvolumens erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers. Die Messung wurde mit dem Forward Scatter durchgeführt. Beim erythrozytären Zelltod kommt es meist zu einer Schrumpfung der Erythrozyten. Entsprechend der bisherigen Theorie konnte die Inhibition der Zellschrumpfung durch die Catecholamine bestätigt werden.

5.2.1 Auswirkungen von Isoproterenol auf das erythrozytäre Zellvolumen

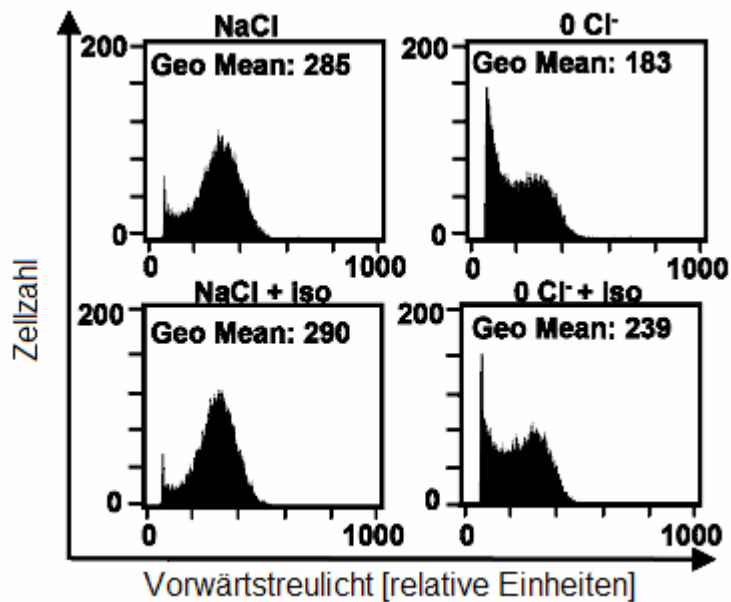


Abb. 5.2.1.1: Inhibition der Zellschrumpfung von Erythrozyten unter Einwirkung von Isoproterenol. Die Histogramme zeigen den Forward Scatter in einem repräsentativen Experiment. Dabei wurden die Erythrozyten sowohl in chloridhaltigen (Tafeln rechts) als auch chloridfreien Lösungen (Tafeln links) inkubiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Abwesenheit (Tafeln oben) bzw. Anwesenheit (Tafeln unten) von Isoproterenol (10 µM).

Es konnte nachgewiesen werden, dass es bei völliger Chloridfreiheit zu einer relevanten Abnahme der Zellgröße der Erythrozyten kommt. Diese Größenabnahme liess sich durch Isoproterenol hemmen. In einer chloridhaltigen Lösung zeigte Isoproterenol dagegen keinen Effekt.

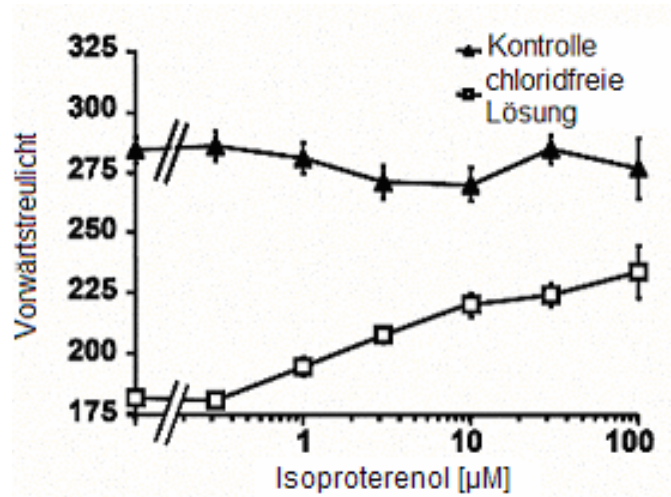


Abb. 5.2.1.2: Einfluss von Isoproterenol auf Erythrozyten, die in chloridfreier (helle Vierecke) bzw. chloridhaltiger Badlösung (schwarze Dreiecke) inkubiert wurden. Die Messung erfolgte anhand des Forward Scatter. Die Zellen wurden 36 Stunden in Anwesenheit von Isoproterenol verschiedener Konzentrationen (von 30 nm bis zu 100 µM) inkubiert. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 3$.

In einer chloridhaltigen Badlösung verändert sich das Zellvolumen der Erythrozyten nicht. Wird die chloridhaltige Lösung dagegen durch eine chloridfreie ersetzt, kommt es zur Abnahme des erythrozytären Zellvolumens. Bei Zusatz von Isoproterenol zu der chloridfreien Lösung verhält sich die Inhibition dieses Effektes proportional zu der eingesetzten Dosis. Im Kontrast dazu stehen die Erythrozyten, die in einer chloridhaltigen Lösung inkubiert wurden. Bei diesen zeigt der Zusatz von Isoproterenol unabhängig von der Dosis keinerlei Wirkung.

5.2.2 Auswirkungen von Dopamin, Phenylephrin und Dobutamin auf das erythrozytäre Zellvolumen

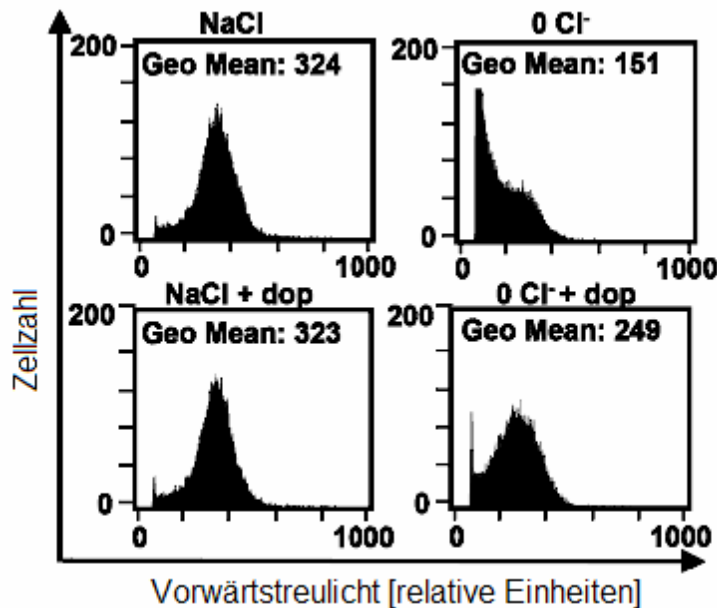


Abb. 5.2.2.1: Hemmung der Zellschrumpfung der Erythrozyten in chloridfreier Lösung durch Dopamin. Die Histogramme zeigen den Forward Scatter in einem repräsentativen Experiment. Dabei wurden die Erythrozyten unterschiedlichen Lösungen ausgesetzt. Die Zellen wurden in chloridfreien (Tafeln rechts) oder chloridhaltigen (Tafeln links) Badlösungen inkubiert. Auf den oberen Tafeln kann man das Verhalten der Erythrozyten in Abwesenheit und auf den unteren Tafeln in Anwesenheit von Dopamin (10 μ M) erkennen.

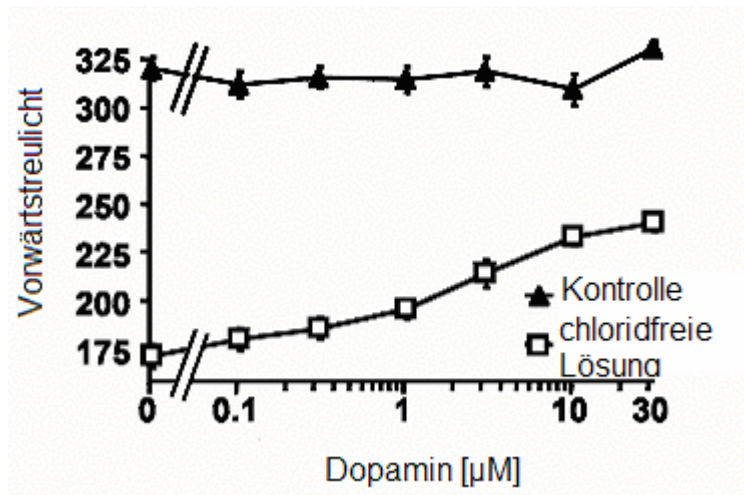


Abb. 5.2.2.2: Einfluss von Dopamin auf Erythrozyten, die in chloridfreier (helle Vierecke) bzw. chloridhaltiger Badlösung (schwarze Dreiecke) inkubiert wurden. Die Messung erfolgte anhand des Forward Scatter. Die Zellen wurden 36 Stunden in Anwesenheit von Dopamin verschiedener Konzentrationen (von 0,1 μ m bis zu 30 μ m) inkubiert. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 3.

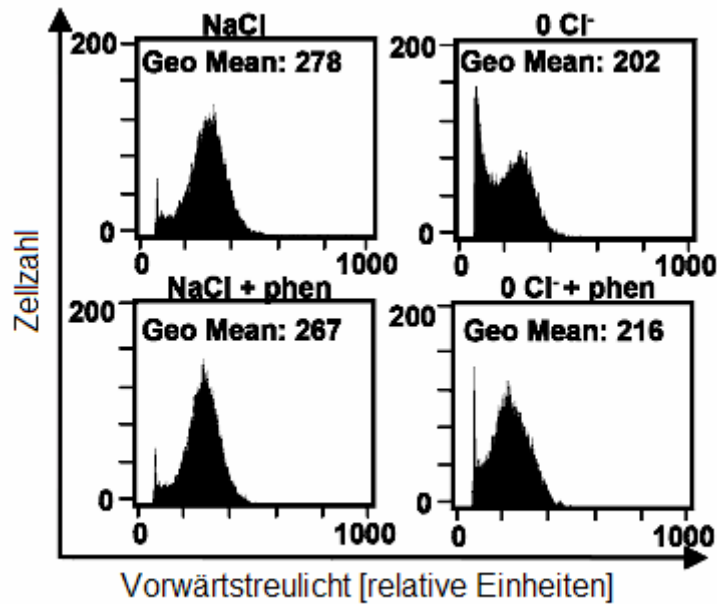


Abb. 5.2.2.3: Hemmung der Zellschrumpfung der Erythrozyten in chloridfreier Lösung durch Phenylephrin. Die Histogramme zeigen den Forward Scatter in einem repräsentativen Experiment. Dabei wurden die Erythrozyten unterschiedlichen Lösungen ausgesetzt. Die Zellen wurden in Badlösungen, die Chlorid enthalten (linke Tafeln), oder in Anwesenheit von Phenylephrin (10 μ M) (untere Tafeln) inkubiert.

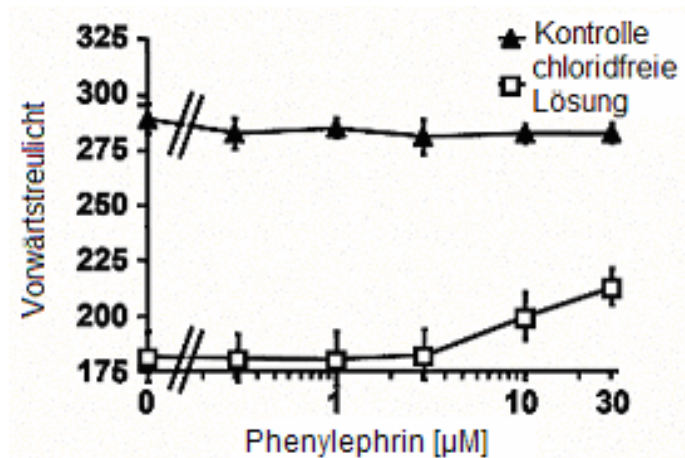


Abb. 5.2.2.4: Einfluss von Phenylephrin auf Erythrozyten, die in chloridfreier (helle Vierecke) bzw. chloridhaltiger Badlösung (schwarze Dreiecke) inkubiert wurden. Die Messung erfolgte anhand des Forward Scatter. Die Zellen wurden 36 Stunden in Anwesenheit von Phenylephrin verschiedener Konzentrationen (von 0,2 μ M bis zu 30 μ M) inkubiert. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 3.

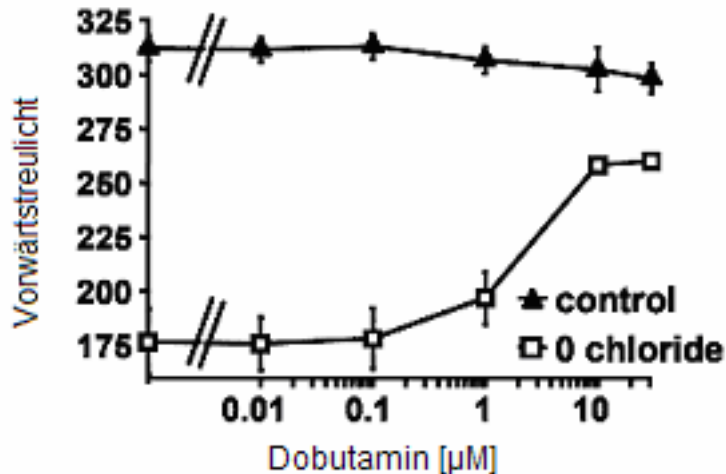


Abb. 5.2.2.5: Einfluss von Dobutamin auf Erythrozyten, die in chloridfreier (helle Vierecke) bzw. chloridhaltiger Badlösung (schwarze Dreiecke) inkubiert wurden. Die Messung erfolgte anhand des Forward Scatter. Die Zellen wurden 36 Stunden in Anwesenheit von Dobutamin verschiedener Konzentrationen (von 0,01 bis 30 µM) inkubiert. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung bei n = 3.

Der Effekt von Isoproterenol auf die Annexinbindung und die erythrozytäre Zellgröße lässt sich durch Dobutamin reproduzieren, das auf ähnliche Art und Weise die Zunahme der Annexinbindung (Abb. 5.2.2.1) und die Abnahme des Zellvolumens im Forward Scatter (Abb. 5.2.2.5) infolge der extrazellulären Entfernung von Chlorid inhibiert. Die Konzentration von Dobutamin, die für die halbmaximale Hemmung benötigt wurde ($IC_{50} \sim 1 \mu M$), war analog zu der von Isoproterenol.

Außerdem war es möglich zu beweisen, dass auch Phenylephrin und Dopamin die Wirkung von Isoproterenol imitieren. Diese Substanzen zeigten denselben hemmenden Effekt auf die Abnahme des Zellvolumens und die Zunahme der Annexinbindung. Von Dopamin benötigte man eine etwas höhere Konzentration ($IC_{50} \sim 3 \mu M$) als von Isoproterenol, um die halbmaximale Wirkung zu erreichen, während die erforderliche Konzentration von Phenylephrin ($IC_{50} \sim 10 \mu M$) deutlich höher lag. (Abb. 5.2.2.2. und 5.2.2.4)

5.3 Ermittlung der Ströme über die Erythrozytenmembran anhand des Patch-Clamp-Verfahrens

Meine Arbeitsgruppe führte 2005 Patch-Clamp-Untersuchungen nach der „Whole-Cell“-Konfiguration durch, um den Effekt von Isoproterenol auf die unselektiven Kationenkanäle zu untersuchen (Lang et al., 2005).

Die Ströme wurden mit chloridfreier Pipettenlösung und chloridhaltiger Badlösung aufgezeichnet. Nach Austausch der chloridhaltigen durch eine chloridfreie Badlösung konnte innerhalb von 30 Sekunden eine signifikante Zunahme der ein- und auswärtsgerichteten Ströme festgestellt werden. In der Abbildung 5.3.1 ist erkennbar, dass die Superfusion mit Isoproterenol in chloridfreier Lösung zu einer zeitabhängigen Inhibition sowohl der einwärts- als auch der auswärtsgerichteten aktivierten Ströme führt.

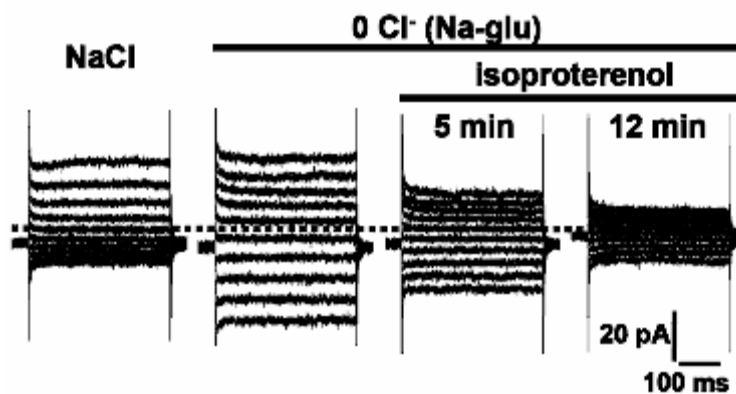


Abb. 5.3.1: „Whole-Cell“-Stromspuren eines menschlichen Erythrozyten.

Aufzeichnung der Stromspuren eines humanen Erythrozyten in chloridhaltiger Lösung (ganz links), in chloridfreier Lösung (zweiter von links), in chloridfreier Lösung 5 Minuten nach Zugabe von Isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) (zweiter von rechts) und in chloridfreier Lösung 12 Minuten nach Zugabe von Isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) (ganz rechts). Die gestrichelte Linie zeigt den Nullwert an. Das Membranpotential wurde bei -30 mV gehalten.

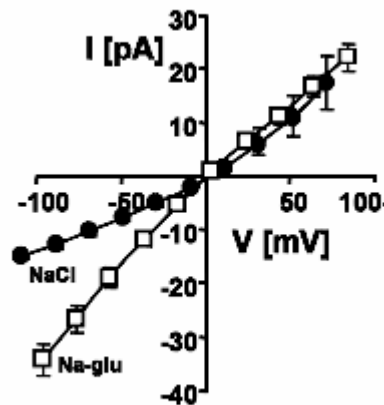


Abb. 5.3.2: Einfluss der chloridhaltigen bzw. chloridfreien Spüllösung auf die Stromverhältnisse, gemessen nach der „Whole-Cell“-Konfiguration. Die durchschnittlichen Stromspannungsverhältnisse wurden zwischen 350 und 375 ms nach einem Onset Pulse gemessen. Die Mittelwerte der I-V-Kurve (\pm Standardabweichung) wurden sowohl in chloridfreier Pipettenlösung und chloridhaltiger Badelösung (schwarze Kreise, $n = 5$) als auch in chloridfreier Pipettenlösung und chloridfreier Badelösung (weiße Quadrate, $n = 4$) ermittelt.

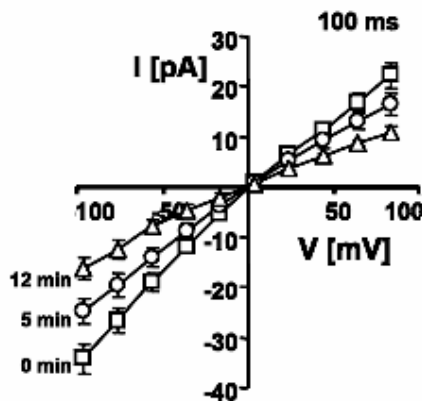


Abb. 5.3.3: Einfluss des Isoproterenols auf die Stromverhältnisse in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, gemessen nach der „Whole-Cell“-Konfiguration.

Die Mittelwerte der I-V-Kurve (\pm Standardabweichung) wurden sowohl in chloridfreier Pipettenlösung als auch in chloridfreier Badelösung vor (weiße Quadrate, $n = 4$), 5 Minuten nach (weiße Kreise, $n = 4$) oder 12 Minuten nach (weiße Dreiecke, $n = 4$) Zugabe von Isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) bestimmt. Die durchschnittlichen Stromspannungsverhältnisse erhielt man in 4 gepaarten Experimenten, die unter unterschiedlichen Bedingungen aufgezeichnet wurden.

Diese durch Isoproterenol inhibierten Ströme waren nicht-selektiv, was sich aus folgenden Beobachtungen ableiten lässt: Die Mittelwerte der „slope conductance“ (mit der linearen Regression zwischen -100 und -40 mV ausgerechnet) erreichten 375 ± 32 pS ($n = 4$) und die Steigung der Strom-Spannungskurve (I-V-Kurve) verhielt sich annähernd linear. Der Austausch der chloridhaltigen Badlösung durch eine chloridfreie Badlösung beeinflusste das Umkehrpotential ($E_{rev.}$) nicht, was in der Abbildung 5.3.2 zu erkennen ist. Das deutet darauf hin, dass der induzierte Strom durch monovalente Ionenflüsse verursacht wird. Während Langzeit-„whole-cell“-Messungen, bei denen eine chloridfreie (NaGluconat) Pipettenlösung in Kombination mit einer ebenfalls chloridfreien Badlösung verwendet wurde, erschöpften sich die „Whole-Cell“-Ströme nicht. Dies weist auf eine signifikante Inhibition der unselektiven Kationenkanäle infolge der Einwirkung von Isoproterenol hin. Die „slope conductance“, die entsprechend der linearen Regression zwischen -100 und -40 mV ausgerechnet wurde, nahm nach 12 Minuten nur um $4,5 \pm 6,2$ % ab, $n = 4$. Im Gegensatz dazu wurde der Zusatz von Isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) zu der chloridfreien Badlösung von einer zeitabhängigen Inhibition beider (ein- und auswärtsgerichteten) Ströme gefolgt. Die entsprechenden Stromspannungskurven, die vor, bzw. 5 und 12 Minuten nach Zusatz von Isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) aufgezeichnet wurden, sind in der Abbildung 5.3.3 dargestellt

5.4 Auswirkungen von Isoproterenol auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt

Wie die Arbeitsgruppe von Lang F. et al. 2006 beschrieb, geht einer der eryptotischen Signalwege mit einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration einher (Lang F. et al., 2006, Lang K.S. et al., 2005). Diese Versuche wurden durchgeführt um abzuklären, ob und inwiefern sich die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Zusatz von Isoproterenol verändert.

Um die Effekte der An- und Abwesenheit von Isoproterenol in chloridfreier Lösung auf die Fluo-3-AM-Fluoreszenz besser erfassen zu können, wurden die Erythrozyten mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoff Fluo-3 ($2 \mu\text{M}$ Fluo-3 AM) markiert.

Auf diese Weise konnte der vermutete hemmende Effekt von Isoproterenol auf den Ca^{2+} -Einstrom, der durch die Cl^- -Entfernung verursacht wird, bestimmt werden (siehe Abbildung 5.1.4). Die Experimente wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers als Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

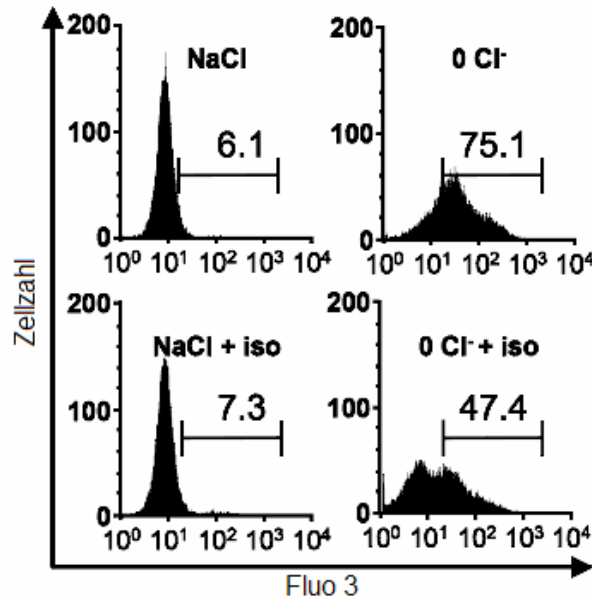


Abb. 5.4.1: Inhibition der Zunahme der Fluoreszenz in Erythrozyten nach Einwirkung von Isoproterenol. Die Abbildung zeigt die originalen Durchflußzytometerhistogramme einer repräsentativen Messung, die die Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenz Fluo-3.AM-beladener Erythrozyten zeigt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden in Ringerlösung (rechte Tafeln) oder einer chloridfreien Lösung (linke Tafeln) in Anwesenheit (untere Tafeln) bzw. in Abwesenheit (obere Tafeln) von Isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) inkubiert.

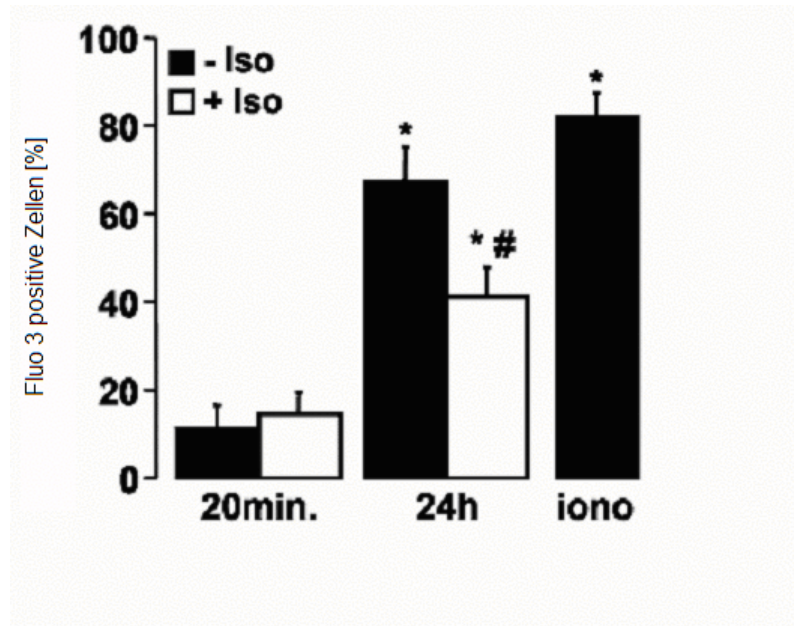


Abb.5.4.2: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz \pm Standardabweichung Fluo-3-AM-beladener Erythrozyten. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 Minuten bzw. 24 Stunden in chloridfreier Lösung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Isoproterenol (10 μ M) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein unabhängiges Experiment durchgeführt, bei dem zu den Erythrozyten das Calcium Ionophor Ionomycin (1 μ M) zugesetzt wurde.

In chloridfreier Lösung konnte man eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität nachweisen. Nach Zusatz von Isoproterenol (10 μ M) zu den Versuchsansätzen mit chloridfreier Lösung kam es zu einer deutlichen Reduktion der Fluoreszenz. Dagegen war es nicht möglich, in chloridhaltiger Lösung einen bedeutsamen Effekt von Isoproterenol festzustellen.

Die Bestimmungen der Fluo-3-Fluoreszenz ergaben eine Zunahme des Prozentsatzes an Zellen, deren Ca^{2+} -Aktivität infolge der Cl^- -Wegnahme anstieg. Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzabnahme im Verhältnis zur Inkubationszeit stand. Nach einer 20-minütigen Inkubation lag die cytosolische Ca^{2+} -Aktivität sowohl mit als auch ohne Zusatz von Isoproterenol in derselben Größenordnung, wogegen die Fluoreszenzintensität nach einer 24-stündigen Inkubation unter Einfluss von Isoproterenol deutlich abnahm. Diese Wirkung liess sich durch Isoproterenol zwar verringern, aber nicht völlig aufheben. Die gemessene Fluoreszenzintensität bestimmt man im Verhältnis zu der Fluoreszenzintensität, die nach Einwirkung des Calcium Ionophors Ionomycin (1 μ M) gemessen wird.

5.5 Auflistung der zu untersuchenden Rezeptorantagonisten von Dopamin

Tab. 5.5.1: Auflistung der unterschiedlichen Rezeptorantagonisten von Dopamin.

Name	c[μ mol/l]	spez. Rez.
		Dopamin [D*]
Domperidon	5	D1/D2
Raclopride	10	D2
Clozapin	5	D4
Metoclopramid	10	D2
		Alpha [A**]
Prazosin	5	A1
Rauwolscin	5	A2
		Beta [B***]
Propranolol	10	B1/B2
Betaxolol	10	B1
Butoxamin	100	B2

*Dopamin Rezeptor ** α -Rezeptor *** β - Rezeptor

Für Dopamin existieren mehrere Rezeptoren. Es konnten bisher allein fünf verschiedene, in zwei Gruppen eingeteilte, Dopaminrezeptoren (D_1 bis D_5) nachgewiesen werden (siehe Einleitung).

Dopamin kann seine Effekte jedoch auch über die adrenergen β_1 - und β_2 -Rezeptoren vermitteln, die jedoch keine so hohe Affinität zu Dopamin haben, und über die ebenfalls adrenergen α_1 - und α_2 -Rezeptoren, die die niedrigste Rezeptorempfindlichkeit für Dopamin aufweisen. Die aufgelisteten Dopaminantagonisten inhibieren selektiv jeweils einen oder zwei dieser Rezeptoren. Somit konnte man im Rahmen einer Ausschlussanalyse untersuchen, ob und über welchen Rezeptor die Effekte von Dopamin vermittelt werden.

5.6 Vergleich der Effekte der unterschiedlichen Dopaminantagonisten

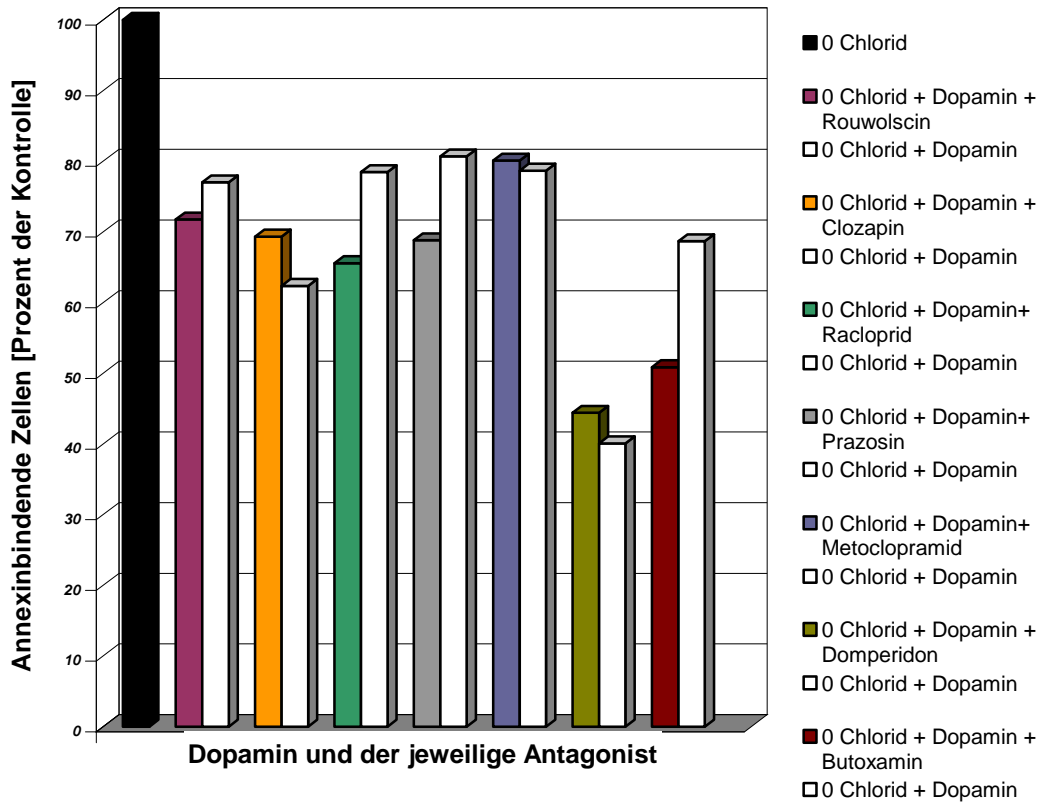


Abb. 5.6.1: Effekte der Dopaminantagonisten auf in chloridfreier Lösung inkubierte Erythrozyten. Bei diesem Versuch wurden Erythrozyten in chloridfreier Lösung unter Zusatz von Dopamin (5 μ M) inkubiert. Es wird versucht mit dem jeweiligen Antagonisten den inhibitorischen Effekt von Dopamin aufzuheben. Als Antagonisten wurden eingesetzt: Rouwolscin (5 μ M), Clozapin (5 μ M), Racloprid (10 μ M), Prazosin (5 μ M), Metoclopramid (10 μ M), Domperidon (5 μ M), Butoxamin (100 μ M). Für die Balkengrafik wurden die Mittelwerte von 2-4 Einzelexperimenten verwendet. Die Abweichung der Einzelwerte lag innerhalb eines Bereiches von 10%. Die eingesetzten Kontrollerythrozyten wurden in chloridfreier Ringerlösung inkubiert. Diese Kontrollerythrozyten enthielten ($60,29 \pm 7,31\%$ SEM) annexinbindender Zellen. Vergleichsweise dazu lagen die Kontrollen in chloridhaltiger Ringerlösung bei $5,79 \pm 0,64$ SEM.

Bei Erythrozyten, die unter Einfluss von Dopamin in chloridfreier Lösung inkubiert wurden, konnte ein inhibitorischer Effekt auf die Eryptose nachgewiesen werden. In diesem Versuch wurden die Effekte der Antagonisten (Rouwolscin, Clozapin, Racloprid, Prazosin, Metoclopramid, Domperidon und Butoxamin) von Dopamin analysiert.

Ergebnisse

Der Grundgedanke war, dass die Dopaminantagonisten in der Lage sein sollten, den inhibitorischen Effekt wieder aufzuheben. Diese Theorie konnte nicht durch signifikante Ergebnisse erhärtet werden. Nicht einmal Tendenzen ließen sich feststellen.

6 Diskussion

6.1 Methodendiskussion

6.1.1 Lösungen

Alle bei den Versuchen eingesetzten Lösungen besaßen einen pH-Wert von 7,4. Um dies zu gewährleisten, erfolgten tägliche pH-Kontrollen, das dafür benutzte pH-Meter wurde regelmässig mit Standardlösungen geeicht.

Die Gesamtmolarität der Lösung wurde fortlaufend überprüft. Die regelmässige Eichung mit Stammlösungen gewährleistete eine möglichst hohe Messgenauigkeit des eingesetzten Osmometers. Einzig und allein eine mögliche Verunreinigung der Testsubstanzen im Herstellungsprozess war nicht auszuschliessen.

Um zu vermeiden, dass sich die Lösungen unter dem Einfluss von Licht und Temperatur frühzeitig zersetzen, bewahrte man sie im Kühl- bzw. Gefrierschrank auf, bzw. setzte sie in kurzen, regelmässigen Abständen frisch an. Die für die Lösungen verwendeten Chemikalien wurden luftdicht bei Raumtemperatur oder 4°C gelagert. Lichtempfindliche Substanzen bewahrte man in lichtgeschützten Behältnissen auf.

6.1.2 Durchflusszytometrie

Störende Einflüsse wie Vibrationen und Licht können die Fluoreszenzmessung sehr leicht beeinflussen. Um diese externen Störungen auf ein Minimum zu reduzieren, kommt ein schwingungsarmer Tisch zum Einsatz, welcher eine Verschiebung der markierten Zellen und der definierten Messareale verhindert. Störende Streulichteinflüsse lassen sich sowohl durch einen „Lichtkäfig“ als auch durch das Abdunkeln des Raumes während des Versuchs vermeiden. Zur Gewährleistung eines sauberen Durchstromes durch die Perfusionsanlage erfolgte eine regelmässige Reinigung, Kontrolle sowie Befüllung mit frischer Flüssigkeit. Bei jedem durchflusszytometrischen Ergebnis gilt es, auf direkte Einflüsse durch sogenanntes „Gating“ zu achten.

Den Begriff „Gating“ verwendet man in diesem Zusammenhang für die „willkürliche“ Abgrenzung einzelner Populationen (bei der Zellzyklusanalyse) oder zweidimensionaler Dichtepopulationen (bei epitopspezifischen Methoden) in den angezeigten Histogrammen. Das generierte Ergebnis ist folglich durch die Restriktivität der Abgrenzung bedingt. Diese Fehlerquelle ist im Folgenden für einmal festgelegte Einstellungen vernachlässigbar, hat aber einen systematischen Einfluss auf die ermittelten absoluten Werte.

6.1.3 Patch-Clamp-Messungen

Zum Schutz des untersuchten Zellmaterials vor hämolytischem Zerfall infolge potentieller umgebungsnaheer Vibrationen baute man das Patch-Clamp-Gerät ebenfalls auf einem schwingungsarmen Tisch auf.

Elektrische Störungen, die von anderen Geräten ausgehen konnten, ließen sich nahezu vollständig mit einem Faradayschen Käfig abschirmen (Ohlemeyer and Meyer, 1992). Ausserdem bestand die Möglichkeit einer Beschädigung der Elektrodenbeschichtung, welche durch regelmässiges Chlorieren korrigiert werden konnte. Die Kanalaktivität der Erythrozyten wird durch Faktoren wie Qualitätsunterschiede der einzelnen Erythrozyten (u. a. Alter, Calciumgehalt, osmotischer Stress, Energiegehalt und Spender) und Schwankungen in der Zusammensetzung des Chloridbades beeinflusst. Die für eine Serie von Experimenten verwendeten Erythrozyten stammten aus mehreren Erythrozytenkonzentraten unterschiedlicher Herkunft, woraus sich Abweichungen in der Qualität der verwendeten roten Blutkörperchen erklären lassen.

Bei der Whole-Cell-Konfiguration durchbricht man die Zellmembran mittels einer Patch-Pipette, um einen direkten Kontakt mit dem Cytosol herzustellen. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Cytoplasmas. Auf Grund der großen Volumenunterschiede zwischen Zelle und Pipette, verändert sich die Zusammensetzung der Pipettenlösung nur minimal. Eine Zelle kann bei dieser Form der Konfiguration Moleküle bis zu 20 kD Molmasse verlieren. Möglicherweise befinden sich dabei auch Substanzen, die für die Regulation der zu untersuchenden Kanäle von Bedeutung sind.

Durch das Durchbrechen der Zellmembran können Zellorganellen direkt in den Mündungsbereich der Pipette geschwemmt werden, diese verstopfen und somit eine deutliche Erhöhung des Pipettenwiderstandes verursachen. Als vorbeugende Maßnahme empfahl es sich, vor und nach jedem Experiment den Pipettenwiderstand durch Messen in der chloridhaltigen Badlösung zu überprüfen.

6.2 Ergebnisdiskussion

6.2.1 Inhibition der unselektiven Kationenkanäle durch die Catecholamine

Die Ergebnisse aus früher durchgeführten Studien liessen sich bestätigen. Die unselektive Leitfähigkeit der Erythrozyten kann sowohl über die Verringerung der Chloridkonzentration (Duranton *et al.*, 2002, Huber *et al.*, 2001, Lang *et al.*, 2003 b, d, Myssina *et al.*, 2004) als auch über die Stimulierung von PGE₂ (Lang *et al.*, 2005 b) aktiviert werden. Die dadurch hervorgerufene Exposition von Phosphatidylserin führt zu einer verstärkten Annexinbindung.

Es konnte gezeigt werden, dass Catecholamine die unselektive Leitfähigkeit hemmen. Die Inhibitionsintensität nimmt entsprechend der Reihenfolge Isoproterenol > Phenylephrin > Dopamin > Dobutamin ab. Dieser Sachverhalt lässt sich mit der unterschiedlichen Affinität einzelner Substanzen zur Zielstruktur bzw. ihrem niedrigen K_M-Wert erklären. Die Effekte der Catecholamine sind zumindest teilweise auf die direkte oder indirekte Inaktivierung der für Ca²⁺ permeablen unselektiven Kationenkanäle zurückzuführen.

Bei der Patch-Clamp-Technik zeigten die Erythrozyten gegenüber der Kontrolle in chloridfreier Lösung signifikant erhöhte Einwärtsströme. Bei einem Zusatz von Isoproterenol zu einer chloridfreien Lösung zeigten die Erythrozyten nach fünfminütiger Inkubation bei der Messung dagegen keinen signifikanten Unterschied mehr. Erst nach 12 Minuten wies auch diese Lösung einen gegenüber der Kontrolle eindeutig erhöhten Strom auf. Im Forward Scatter liess sich ebenso darstellen, dass eine chloridfreie Lösung die Schrumpfung des Zellvolumens bei Erythrozyten verhindert.

Im Rahmen dieser Inaktivierung wurde die konsekutive Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermieden. Insofern können die Ca^{2+} -abhängigen GARDOS-Kanäle durch das Phosphatidylserinscrambling und die Calpaine nicht mehr aktiviert werden.

6.2.2 Auswirkung der Catecholamine auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt

Anhand der Ergebnisse lässt sich der Schluss ziehen, dass die Catecholamine zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beitragen.

In chloridfreier Lösung konnte man in Erythrozyten durch Fluo-3-AM-Messungen hohe Gehalte an intrazellulärem Ca^{2+} messen was höchstwahrscheinlich auf eine Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle zurückzuführen ist, die infolgedessen eine erhöhte Permeabilität für Ca^{2+} aufweisen.

Durch den Zusatz von Isoproterenol zur chloridfreien Lösung konnte die Ca^{2+} -Konzentration zwar stark gesenkt, aber nicht neutralisiert werden, wie aus Abbildung 5.4.2 ersichtlich ist. In einem weiteren Versuch gelang es, diesen Sachverhalt gründlicher zu untersuchen. Nach 20-minütiger Inkubation der Erythrozyten in einer chloridfreien Lösung war sowohl mit als auch ohne Zusatz von Isoproterenol ein vergleichbarer Ca^{2+} -Gehalt messbar, während er nach 24 Stunden einen signifikant höheren Wert aufwies. Dagegen erfolgte die Positivkontrolle der Fluo-3AM-Messung mittels Inkubation der Erythrozyten mit dem Calcium Ionophor Ionomycin. Dabei erreichte die Ca^{2+} -Konzentration der Erythrozyten zwar ihren prozentualen Höchstwert, lag aber nur ca. 15 % über dem der 24 Stunden ohne Zusatz von Isoproterenol inkubierten Erythrozyten. Dies zeigt, dass alle Erythrozyten einen gewissen Prozentsatz an Ca^{2+} in ihrem Cytosol enthalten. Diese Ausgangskonzentration lässt sich jedoch unter dem Einfluss externer Stimuli deutlich erhöhen.

6.2.3 Inhibition des Phosphatidylserinscrambling durch Catecholamine

Die Funktion der Scramblase bei der Inhibition der Eryptose durch die Catecholamine ist eher als eine passive zu sehen.

Im Rahmen der Eryptosekaskade erfolgt die Aktivierung der Scramblase sowohl durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Zhou *et al.*, 2002), als auch indirekt infolge der Volumenabnahme des Erythrozyten bedingt durch den Ca^{2+} -sensiblen K^+ -Kanal.

Die Scramblase transloziert das in der „gesunden“ Zelle ausschliesslich auf der Membraninnenseite vorkommende Phosphatidylserin auf die Membranaussenseite und hebt somit die Membranasymmetrie auf. Einerseits stellt das exponierte Phosphatidylserin ein Signal für die Makrophagen dar, andererseits bietet es die Möglichkeit, die Zelloberfläche alternder, verletzter und apoptotischer Erythrozyten mit Annexin zu markieren. Zur Aufrechterhaltung der Membranasymmetrie trägt dagegen das Enzym Translokase bei. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Phosphatidylserinasymmetrie durch eine erhöhte Aktivität der Scramblase oder eine verringerte Aktivität der Translokase ausgelöst wird. Erythrozyten, die in chloridfreier Lösung inkubiert wurden, zeigten im Allgemeinen eine signifikant erhöhte Annexinbindung, die auf eine stärkere Phosphatidylserinexposition der apoptotischen Erythrozyten hinweist. Dieser Effekt liess sich durch den Zusatz von Isoproterenol zu chloridfreier Lösung supprimieren, was einen Hinweis auf eine Unterbrechung der Signalkette oberhalb der Scramblase bzw. Translokase gibt. Die veränderte Funktion anderer Enzyme, z. B. der erythrozytären Flipase (Roelofsen, 1991) konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

6.2.4 Inhibition des GARDOS-Kanals durch die Catecholamine

Bei der Induktion der Eryptose kommt es zur Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle, die zu einer gesteigerten Permeabilität von Ca^{2+} führen. Infolge der erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt es zur Aktivierung der für Ca^{2+} sensiblen K^+ -Kanäle. Der darauf folgende Ausstrom von K^+ führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran.

Zum elektrischen Konzentrationsausgleich strömt Cl^- gemäss dem elektrischen Gradienten aus der Zelle, was zu einem osmotischen Ungleichgewicht führt, das die Erythrozyten mit dem Ausstrom von Wasser zu kompensieren versuchen. Dieser Wasserausstrom verursacht eine Schrumpfung der Zellvolumina, welche mit einer Abnahme der Signalstärke im Forward Scatter dargestellt werden kann (Lang et al., 2003 c).

Dieser Effekt wurde in den Versuchen durch chloridfreie Lösung induziert, während er sich durch Zusatz von Isoproterenol signifikant senken liess. Aus den Versuchsergebnissen ist zu ersehen, dass Isoproterenol die Signalkette bereits oberhalb der GARDOS-Kanäle unterbricht.

Eine Verringerung der Chloridkonzentration führt über einen Ca^{2+} -Einstrom zur Abnahme der Signalstärke des Forward Scatter, welche durch den Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration wieder angehoben werden kann. Dieses Verfahren stellt eine indirekte Messung des Zellvolumens dar.

Die Abnahme der Signalstärke des Forward Scatter liess sich durch Hemmstoffe für die Ca^{2+} -sensiblen K^+ -Kanäle vermindern (Lang et al., 2003c). Anhand der Patch-Clamp-Technik konnte die Öffnung der GARDOS-Kanäle eindeutig nachgewiesen werden. Den dadurch bedingten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol konnte man wiederum mit Hilfe der Fluo-3-AM-Messung bestimmen.

6.2.5 Interaktionen der Catecholamine mit dem Prostaglandin E_2

Es gibt mehrere Hinweise für eine zentrale Rolle des Prostaglandins E_2 (PGE_2) in der Signalsequenz, welche zur Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle führt (Kaestner und Bernhardt, 2002).

Als Folge der Zellschrumpfung bzw. des extrazellulären Chlorid-Entzugs kommt es zur Aktivierung der erythrozytären Cyclooxygenase, PGE_2 -Bildung und somit zur Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle. Danach strömt Ca^{2+} über die offenen Kationenkanäle ein und führt zu einer erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Kaestner et al., 2004). Diese bewirkt wiederum eine Aktivierung der Scramblase, der GARDOS-Kanäle und des μ -Calpains.

Für diese Arbeit wurden die Erythrozyten über einen Zeitraum von 24 Stunden in einer Chlorid enthaltenden Lösung sowohl mit als auch ohne Zusatz von PGE₂ (50 µM) inkubiert. Aus der Abbildung 5.1.1.3 ist zu ersehen, dass die Zugabe von Isoproterenol eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes an annexinbindenden Zellen bewirkte. Dies weist darauf hin, dass Isoproterenol die durch Freisetzung von PGE₂ aktivierten unselektiven Kationenkanäle inhibiert (Lang *et al.*, 2005 b) was wiederum besagt, dass die Catecholamine die Signalkette unterhalb von PGE₂ unterbrechen. Es war möglich, die Leitfähigkeit zu charakterisieren und zu zeigen, dass sie durch Amilorid und Ethylisopropylamilorid hemmbar ist (Duranton *et al.*, 2002, Huber *et al.*, 2001, Lang *et al.*, 2003b).

6.2.6 Vergleich der unterschiedlichen Dopaminantagonisten

Diese Studie befasst sich schwerpunktmäßig mit der Untersuchung der Effekte von Isoproterenol auf den Ca²⁺-Influx und die externe Präsentation des Phosphatidylserins, die durch eine Verringerung der extrazellulären Chloridkonzentration bedingt werden.

Aus den Abbildungen 5.2.2.2, 5.2.2.4 und 5.2.2.5 wird ersichtlich, dass höhere Konzentrationen an Phenylephrin, Dopamin und Dobutamin erforderlich sind, um denselben Effekt wie Isoproterenol zu erreichen. Es war nicht möglich, die Auswirkungen von Isoproterenol, Epinephrin, Dopamin und Dobutamin auf die Aktivierung eines einzelnen Rezeptors zurückzuführen. In einzelnen Experimenten war nachweisbar, dass die von Dopamin (5 µM) induzierte Hemmung der Annexinbindung durch dessen Antagonisten Rouwolscin (5 µM), Prazosin (5 µM), Raclopride (10 µM), Clozapin (5 µM), Prazosin (5 µM), Metoclopramid (10µM), Domperidon (5µM) und Butoxamin (100 µM) nicht aufgehoben werden konnte. Während Domperidon als Antagonist für die D₁- und D₂-Rezeptoren eingesetzt wurde, zielte die Wirkung von Metoclopramid und Raclopride dagegen nur auf die D₂-Rezeptoren. Mit Hilfe von Prazosin versuchte man gezielt, die α₁-Rezeptoren, mit Rouwolscin die α₂-Rezeptoren zu inhibieren. Mit Butoxamin, Betaxolol (10 µM) und Propanolol (10 µM) zielte man auf die β-Rezeptoren. Propanolol ist ein Inhibitor sowohl für β₁- als β₂-Rezeptoren, während Butoxamin selektiv auf die β₂-Rezeptoren und Betaxolol selektiv auf die β₁-Rezeptoren einwirkt.

Der durch Dopamin induzierte Effekt liess sich jedoch nicht aufheben. Somit liegt der Schluss nahe, dass die Catecholamine direkt auf die Aktivität des Kanals oder die vorgeschalteten Signalmechanismen störend einwirken.

6.2.7 Schwächen bei der Übertragung der Ergebnisse auf ein biologisches System

Die eingesetzte, zur Inhibition der Eryptose beim In-vitro-Versuch notwendige Dosis Catecholamine ist rein rechnerisch gesehen unphysiologisch. Bei sehr schweren Schockzuständen wird Dopamin zu therapeutischen Zwecken in einer maximalen Dosis von 20-50 µg/kg/min appliziert. Wie man aus Abbildung 5.1.2.2 ersehen kann, waren für eine halbmaximale Hemmung der Eryptose bei den Versuchen ca. 0,46 g Dopamin erforderlich. In Vitro lag die Erythrozytenkonzentration bei ca. 0,3 % Hämatokrit im Vergleich zu ca. 40 % im Blut. In solch niedriger Versuchskonzentration reagieren die Zellen sehr sensibel auf externe Stimuli. Bei Ermittlung geeigneter Konzentrationen für therapeutische Zwecke, könnte sich die Möglichkeit ergeben, dass Catecholamine oder effektivere Analoga die Phosphatidylserinexposition supprimieren und so der vorzeitigen Entfernung der Erythrozyten aus dem zirkulierenden Blut entgegenwirken.

Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass die Inkubationszeit der in vitro verwendeten Erythrozyten bei maximal 48 Stunden lag. Im Blut des menschlichen Körpers zirkulierende Erythrozyten sind hingegen über einen Zeitraum von 120 Tagen einer kumulativen Dosis Dopamin exponiert. Darüberhinaus kann eine simultane Einwirkung anderer Catecholamine auftreten. Unter Stress kann die Normalkonzentration dieser Substanzen sogar um ein Vielfaches ansteigen.

6.3 Schlussfolgerung

Entsprechend der Fragestellung geben die vorhandenen Resultate Aufschluss über das Verhalten der Erythrozyten und ihres Zelltodprogramms unter dem Einfluss verschiedener Catecholamine. Dabei stellte sich heraus, dass Catecholamine die Lebensspanne der zirkulierenden Erythrozyten verlängern, indem sie die für Ca^{2+} permeable unselektive Kationenleitfähigkeit inaktivieren. Diesem Sachverhalt kann ein biologischer Sinn zugeordnet werden. Catecholamine sind vor allem in ihrer Funktion als „Stresshormone“ bekannt. In einer „Fight or Flight“-Situation wäre es physiologisch unzweckmässig, wenn es ausgerechnet bei erhöhtem Sauerstoffbedarf zu einem Absterben der Zellen käme, die das Gewebe mit Sauerstoff versorgen.

Wie K. S. Lang schon in früheren Studien dokumentierte, reagieren Erythrozyten von Patienten mit genetisch bedingten Erbleiden wie Sichelzellanämie oder Thlassämie sehr stark auf apoptotische Stimuli. In demselben Sinne anfällig sind Erythrozyten mit Erythroenzymopathien wie Glucosphosphat-hydrogenasemangel. Diese Erkrankungen sind positiv mit der bei diesen Störungen verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten korreliert (Benjamin and Manning, 1986, Corash *et al.*, 1980, Ruymann *et al.*, 1978). Zudem erhöhen sie das Haftvermögen der Erythrozyten an den Gefässwänden. Möglicherweise trägt dies zum Zusammenbruch der Mikrozirkulation des Nierenmarks während eines akuten Nierenversagens bei (Lang *et al.*, 2004b).

Es ist denkbar, dass die Catecholamine die erythrozytäre Lebensspanne verlängern können, besonders bei anämischen Störungen mit vergrößertem erythrozytären Umsatz. Daher kann die Supprimierung der Phosphatidylserinexposition die Haftfähigkeit der Erythrozyten an der Gefässwand beeinflussen und infolgedessen zu einer Verbesserung der Hämodynamik und Mikrozirkulation beitragen (Bonomini *et al.*, 2002, Closse *et al.*, 1999, Eda and Sherman, 2002, Gallagher *et al.*, 2003, Manodori *et al.*, 2000, Setty *et al.*, 2002, Wali *et al.*, 1988).

Insgesamt sind bisher viele Induktoren der Apoptose, z. B. Metallionen, Ceramide und Prostaglandine, bekannt, aber nur wenige Hemmstoffe. Trotzdem sollte die Bedeutung der Inhibitoren nicht unterschätzt werden, da die Erythrozyten im zirkulierenden Blut vielfältigen Stressoren ausgesetzt sind.

Als effektive Hemmstoffe der erythrozytären Apoptose konnten bisher nur die Substanzen Erythropoietin, Chlorid und Urea identifiziert werden.

Ob die Catecholamine analog dem Erythropoietin an die für Ca^{2+} durchlässigen Kationenkanäle binden, ist noch nicht abschliessend geklärt. Dagegen erzeugt Urea seinen inhibitorischen Effekt über die Inaktivierung der Sphingomyelinase und wirkt somit über einen ganz anderen Signalweg. Die Arbeitsgruppe von Hankins et al. konnte 2005 anhand einer Studie über die langjährige Behandlung von an Sichelzellanämie erkrankten Kindern mittels Hydroxyurea eine deutliche Verbesserung ihrer Blutwerte nachweisen. Diese Kinder zeigten nach 4-jähriger Behandlung eine signifikant angestiegene Hämoglobinkonzentration, eine Zunahme des HbF sowie des MCV der Erythrozyten (Hankins et al., 2005). Chlorid indes fungiert ebenfalls über die Inaktivierung der unselektiven Kationenleitfähigkeit.

Durch einen osmotischen Schock kann man nicht nur den programmierten Zelltod der Erythrozyten, sondern ebenso den der kernhaltigen Zellen auslösen (Gulbins et al., 2000, Maeno et al., 2000, Michea et al., 2000, Roger et al., 1999, Rosett and Karin, 1996). Eine grosse Zahl an kernhaltigen Zellen exprimiert auch Kationenkanäle, die zur Volumenregulation befähigt sind (Cabado et al., 1994, Chan et al., 1992, Gamper et al., 2000, Koch and Korbmacher, 1999, Volk et al., 1995, Wehner et al., 1995, 2000). Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Aktivität löst auf eine ähnliche Art und Weise die Apoptose der kernhaltigen Zellen aus (Berridge et al., 2000, Nicotera and Orrenius, 1998). Die für Ca^{2+} durchlässigen zellvolumenregulierenden Kanäle kernhaltiger Zellen könnten möglicherweise an dem Induktionsmechanismus der Apoptose, der nach einem osmotischen Schock aktiviert wird, beteiligt sein.

Sollte sich diese Hypothese bestätigen, bestünde die Möglichkeit, die apoptotischen Effekte mittels Inhibition der Kationenleitfähigkeit durch Catecholamine auf die kernhaltigen Zellen zu übertragen.

Der Erythrozyt stellt, aufgrund seiner relativ einfachen Struktur und da der mitochondrial- bzw. kerninduzierte Apoptosepfad wegfällt, ein sehr gutes Modellsystem für das Studium des Inhibitionsmechanismus der erythrozytären Apoptose dar. Während dieser Signalweg in dem weitaus komplexeren Signalsystem einer kernhaltigen Zelle wahrscheinlich durch andere Mechanismen zu stark überlagert würde und somit gar nicht identifiziert werden könnte.

7 Zusammenfassung

Bei den Erythrozyten als kernlosen Zellen tritt eine spezielle Variante der Apoptose auf, die Eryptose, die, entsprechend der Apoptose kernhaltiger Zellen, typische Merkmale wie Phosphatidylserin-Exposition und Zellschrumpfung aufweist, was an Hand von durchflusszytometrischen Messungen des FITC-markierten Annexins V und des Forward Scatters belegt werden kann. In vitro ist die Eryptose auslösbar, indem man die Erythrozyten in einem hyperosmolarem Medium oder in einem Medium, das weder Chlorid noch Glucose enthält, inkubiert. Osmotischer Schock, oxidativer Stress oder Chloridentfernung führen mittels PGE₂-Bildung zur Aktivierung der unselektiven Kationenleitfähigkeit, die zum Einströmen der Ca²⁺-Ionen führt. Anhand der Patch-Clamp-Technik lässt sich das genaue Verhalten der unselektiven Kationenkanäle, die die Ca²⁺-Leitfähigkeit beeinflussen, analysieren. Die Ca²⁺-Ströme lassen sich durch durchflusszytometrische Messungen an Fluo-3-AM-markierten Erythrozyten nachweisen, während man mit Hilfe der Annexinfärbung die Aktivität der Scramblase bestimmen kann, die für die Phosphatidylserinexposition verantwortlich ist.

Diese Arbeit geht die Fragestellung an, ob man die Aktivierung der unselektiven Kationenleitfähigkeit und die dadurch bedingte Phosphatidylserinexposition mit den Catecholaminen beeinflussen kann.

Infolge der Entfernung des extrazellulären Cl⁻ erhielt man als signifikante Wirkung eine Zunahme der Annexinbindung und eine Abnahme der Erythrozytengröße im Forward Scatter. Unter Einfluss des β-Agonisten Isoproterenol (1 μM) zeigten diese Effekte ein deutlich reversibles Verhalten. Durch Fluoreszenzmessungen mit Fluo-3 AM konnte nach Entfernung der Cl⁻-Ionen ein Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nachgewiesen werden. Entsprechend der Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik in chloridfreier Lösung durchgeführte Experimente lassen eine zeitabhängige Inaktivierung der unselektiven Kationenleitfähigkeit infolge der Zugabe von Isoproterenol (10 μM) erkennen. Phenylephrin (IC₅₀ < 10 μM), Dobutamin (IC_{50approx} 1 μM) und Dopamin (IC_{50approx}. 1 μM) hemmen in ähnlicher Weise die Effekte, die nach der Chlorid-Entfernung auftreten.

Abschliessend kann man sagen, dass mehrere Catecholamine den durch die Cl⁻-Entfernung bedingten Ca²⁺-Einstrom in die Erythrozyten hemmen. Dadurch verhindern sie einen Anstieg des cytosolischen Ca²⁺-Gehalts, die konsekutiv eintretende Zellschrumpfung und die Aktivierung der Scramblase. Demzufolge kompensieren die Catecholamine die Phosphatidylserinexposition und die anschliessende Beseitigung der Erythrozyten aus dem zirkulierenden Blut.

8 Literaturverzeichnis

Andree H.A., Reutelingsperger C.P., Hauptmann R., Hemker H.C., Hermens W.T., Willems G.M.

Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 4923-4928.

Andrews D.A., Yang L., Low P.S.

Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin -TK sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells.

Blood, 2002 Nov 1, **100** (9): 3392-9.

Antonsson B.

Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways.

Mol Cell Biochem., 2004 Jan- Feb, **256-257** (1-2): 141-55.

Arnoult D., Parone P., Martinou J.C., Antonsson B., Estaquier J., Ameisen J.C.

Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli.

J Cell Biol., 2002 Dec 23, **159** (6):923-9.

Ask J.A., Stene-Larsen G., Helle K.B., Resch F.

Functional beta 1- and beta 2- adrenoceptors in the human myocardium.

Acta Physiol Scand., 1985 Jan, **123** (1): 81-8.

Bachelot A., Binart N.

Reproductive role of prolactin.

Reproduction, 2007 Feb, **133** (2): 361-9.

Barry P.H., Lynch J.W.

Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis.

J.Membr Biol., 1991, **121**: 101-117.

Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R.I., Cohen G.M., Green D.R.

Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to Apaf-1 apoptosome.

Nat Cell Biol., 2000 Aug, **2** (8): 469-75.

Benjamin L.J., Manning J.M.

Enhanced survival of sickle erythrocytes upon treatment with glyceraldehyde.

Blood, 1986 Feb, **67** (2): 544-6.

Berg C. P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S.

Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis.

Cell Death Differ, 2001, **8**: 1197-206.

- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D.
The versatility and universality of calcium signalling.
Nat Rev Mol Cell Biol., 2000, **1**: 11-21.
- Boas F.E., Forman L., Beutler E.
Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia.
Proc Nat Acad Sci, USA, 1998, **95**: 3077-3081.
- Bonomini M., Sirolli V., Gizzi F., Di Stante S., Grilli A., Felaco M.
Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure.
Kidney Int., 2002, **62**: 1358-1363.
- Bottger A. and Alexandrova O.
Programmed cell death in Hydra.
Semin Cancer Biol., 2007 Apr, **17**(2): 134-46. Epub 2006 Dec 15. Review.
- Brand V.B., Sandu C.D., Duranton C., Tanneur V., Lang K.S., Huber S.M., Lang F.
Dependence of plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte.
Cell Physiol.Biochem., 2003, **13**(6): 347-56.
- Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C.
Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria.
Cell Death Differ., 2001, **8**: 1143-56.
- Brodde O.E.
The functional importance of beta 1 and beta 2 adrenoceptors in the human heart.
Am J Cardiol., 1988 Aug 11, **62**(5):24 C-29C.
- Brodde O.E., Zerkowski H.R.
Do human cardiac beta- 2 adrenoceptors play a (patho)physiological role in regulation of heart rate and/or contractility?
Basic Res Cardiol., 1989, **84** Suppl 1: 135-44.
- Cabado A.G., Vieytes M.R., Botana L.M.
Effect of ion composition on the changes in membrane potential induced with several stimuli in rat mast cells.
J Cell Physiol., 1994, **158**: 309-316.
- Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.
The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex.
Biochemie, 2002 Feb-Mar, **84** (2-3): 203-14.

Cain K.

Chemical induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome.
Drug Metab Rev., 2003 Nov, **35**(4): 337-63.

Cariers A., Reinehr R., Fischer R., Warskulat U., Haussinger D.
c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD 95 in rat hepatic stellate cells.

Cell Physiol Biochem., 2002, **12**(4): 179-86.

Chan H.C., Goldstein J., Nelson D.J.

Alternate pathways for chloride conductance activation in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells.

Am J Physiol., 1992, **262**: C1273-C1283.

Chang H.Y. and Yang X.

Proteases for cell suicide: functions and regulations of caspases.

Microbiol Mol Biol Rev., 2000 Dec, **64**(4): 821-46.

Cheer J.F., Wassum K.M., Sombers L.A., Heien M.L., Ariansen J.L., Aragona B.J., Phillips P.E., Wightman R.M.

Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation.

J. Neurosci., 2007 Jan 24, **27**(4): 791-5.

Chen M.H., Xie L., Liu T.W., Song F.Q., He T.

Naloxone and epinephrine are equally effective for cardiopulmonary resuscitation in a rat asphyxia model.

Acta Anaesthesiol. Scand., 2006 Oct, **50**(9): 1125-30.

Clemens J.A., Shaar C.J., Smalstig E.B.

Dopamine, PIF, and other regulators of prolactin secretion.

Fed Proc., 1980 Sep, **39**(11): 2907-11.

Closse C., Dachary-Prigent J., Boisseau M.R.

Phosphatidylserine- related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium.

Br Haematol., 1999, **107**: 300-302.

Constantini, P., Bruey, J.M., Castedo, M., Metivier, D., Loeffler, M., Susin, S.A., Ravagnan, L., Zamzami, N., Garrido, C. and Kroemer, G.

Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis.
Cell Death Differ., 2002, **9** (1): 82-8.

Corash L., Spielberg S., Bartsocas C., Boxer L., Steinherz R., Sheetz M., Egan M., Schlesselman J., Schulman J.D.

Reduced chronic hemolysis during high-dose Vitamin E administration in mediterranean-type glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.

N.Engl. J. Med., 1980, **303**: 416-420.

Cosman D.

A family of ligands for the TNF receptor superfamily.
Stem. Cells, 1994 Sep, **12**(5): 440-55. Review.

Danial N.N., Gramm C.F., Scorrano L., Zhang C.Y., Krauss S., Ranger A.M.,
Datta S.R., Greenberg M.E., Licklider L.J., Lowell B.B., Gygi S.P.,
Korsmeyer S.J.

BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates
glycolysis and apoptosis.

Nature, 2003 Aug 21, **424**(6951): 952-6.

Daugas E., Cande C., Kroemer G.

Erythrocytes: death of a mummy.

Cell Death Differ., 2001, **8**: 1131-3.

Daul A., Hermes U., Schafers R.F., Wenzel R., von Birgelen C., Brodde O.E.

The beta-adrenoceptor subtype(s) mediating adrenaline- and dobutamine-
induced blood pressure and heart rate changes in healthy volunteers.

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., 1995 Mar, **33**(3):140-8.

Decaudin D., Marzo I., Brenner C., Kroemer G.

Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of
cancer therapy (review).

1998 Jan, **12**(1): 141-52.

Denault J.B., Salvesen G.S.

Caspases: keys in the ignition of cell death.

Chem. Rev., 2002 Dec, **102** (12): 4489-500.

Deveraux Q.L., Reed J.C.

IAP family proteins-suppressors of apoptosis.

Genes. Dev., 1999 Feb 1, **13**(3): 239-52. Review.

DiChiara G., Morelli M., Acquas E., Carboni E.

Functions of dopamine in the extrapyramidal and limbic systems. Clues for the
mechanism of drug actions.

Arzneimittelforschung, 1992 Feb, **42**(2A): 231-7.

DiForti M., Lappin J.M., Murray R.M.

Riskfactors for schizophrenia – all roads lead to dopamine.

Eur. Neuropsychopharmacol., 2007 Mar, **17** Suppl 2: S101-7.

DiRocco A., Nasser S., Werner P.

Inhaled cocaine used to relieve “off” periods in patients with Parkinson disease
and unpredictable motor fluctuations: a report of 2 cases.

J. Clin. Psychopharmacol., 2006 Dec, **26**(6): 689-90.

- Donepudi M., Grutter M.G.
Structure and zymogen activation of caspases.
Biophys. Chem., 2002 Dec 10, **101-102**: 145-53.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.
Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.
Cell, 2000 Jul 7, **102**(1): 33-42.
- Durantón C., Huber S.M., Lang F.
Oxidation induces a Cl⁻-dependent cation conductance in human red blood cells.
J. Physiol., 2002, **539**: 847-855.
- Durantón C., Huber S., Tanneur V., Lang K., Brand V., Sandu C., Lang F.
Electrophysiological properties of the plasmodium falciparum-induced cation conductance of human erythrocytes.
Cell Physiol. Biochem., 2003, **13**: 189-198.
- Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H.
Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.
Annu. Rev. Biochem., 1999, **68**: 383-424.
- Eda S., Sherman I.W.
Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine.
Cell Physiol. Biochem., 2002, **12**: 373-384.
- Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A., Henson P.M.
A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.
Nature, 2000, **405**: 85-90.
- Franc N.C.
Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster: molecular mechanisms and physiological consequences.
Front Biosci., 2002 May 1, **7**: d1298-313.
- Formigli L., Conti A., Lippi D.
"Falling Leaves": a survey of the history of apoptosis.
Minerva Med., 2004, **95**(2): 159-64.
- Freitas M.
New inotropic agents in the treatment of congestive heart failure.
Rev. Port. Cardiol., 1993 Nov, **12** Suppl 4: 19-28, 7-8.

Furukawa S., Nagashima Y., Hoshi K., Hirao H., Tanaka R., Maruo K., Yamane Y.
Effects of dopamine infusion on cardiac and renal blood flows in dogs.
J. Vet. Med. Sci., 2002 Jan, **64**(1): 41-4.

Gallagher P.G., Chang S.H., Rettig M.P., Neely J.E., Hillery C.A., Smith B.D., Low P.S.
Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis.
Blood, 2003, **101**: 4625-4627.

Gamper N., Huber S.M., Badawi K., Lang F.
Cell volumesensitive sodium channels upregulated by glucocorticoids in U937 macrophages.
Pflügers Archiv Eur. J. Physiol., 2000, **441**: 281-286.

Gao G., Dou Q.P.
N- terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death.
J. Cell Biochem., 2000 sep 18, **80**(1): 53-72.

Goldberg L.I.
Dopamine receptors and hypertension. Physiologic and pharmacologic implications.
Am. J. Med., 1984 Oct 5, **77**(4A): 37-44.

Golstein P., Kroemer G.
Cell death by necrosis: towards a molecular definition.
Trends Biochem. Sci., 2007 Jan, **32**(1): 37-43. Epub 2006 Dec 1.

Gulbins E., Jekle A., Ferlinz K., Grassme H., Lang F.
Physiology of apoptosis.
Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 2000, **279**: F605-F615.

Guroff G.
A neutral, calcium activated proteinase from the soluble fraction of rat brain.
J. Biol. Chem., 1964 Jan, **239**: 149-55.

Gustafsson A.B., Gottlieb R. A.
Bcl-2 family members and apoptosis taken to heart.
Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2006, **292**: C45-C51, 2007.

Hacker G., Weber A.
BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?
Arch. Biochem. Biophys., 2007 Jan 9, [Epub ahead of print].

Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J.
The permeability transition pore complex: another view.
Biochemie, 2002 Feb-Mar, **84**(2-3): 153-66.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J.
Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflügers Arch., 1981, **391**: 85-100.

Hanania N.A., Moore R.H., Zimmermann J.L., Miller C.T., Bag R., Sharafkhaneh A., Dickey B.F.
The role of intrinsic efficacy in determining response to a beta (2) – agonist in acute severe asthma.
Respir. Med., 2006 Oct 16, epub ahead of print.

Hankins J.S., Ware R.E., Rogers Z.R., Wynn L.W., Lane P.A., Scott J.P., Wang W.C.
Long- term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study.
Blood, 2005 Oct 1, **106**(7): 2269-75.

Harrison T., Samuel B.U., Akompong T., Hamm H., Mohadas N., Lomasney J.W., Haldar K.
Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection.
Science, 2003 Sep 19, **301**(5640): 1734-6.

Hayes J.S., Bowling N., Pollock G.D.
Effects of beta adrenoceptor down-regulation on the cardiovascular responses to the stereoisomers of dobutamine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1985 Oct, **235**(1): 58-65.

Hill M.M., Adrain C., Martin S.J.
Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows.
Mol. Interv., 2003 Feb, **3**(1): 19-26.

Hines P.C., Zen Q., Burney S.N., Shea D.A., Ataga K.I., Orringer E.P., Telen M.J., Parise L.V.
Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion.
Blood, 2003 Apr 15, **101**(8):3281-7.

Hobson D.E.
Clinical manifestations of Parkinson's disease and Parkinsonism
Can. J. Neurol. Sci., 2003 Mar, **30** Suppl.1: S2-9.

Hoffmann J.F., 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.
ProcNatlAcadSciUSA. 2003 Jun 10; **100**(12): 7366-71.

Huang R.Y., Lam A.K.
The effect of mydriasis from phenylephrine on corneal shape.
Clin. Exp. Optom., 2007 Jan, **90**(1): 44-8.

Huber S.M., Gamper N., Lang F.
Chloride conductance and volume regulatory nonselective cation conductance in human red cell ghosts.
Pflügers Archiv Eur. J. Physiol., 2001, **441**: 551-558.

Huchet A.M., Chelly J., Schmitt H.
Role of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in the modulation of the baroreflex vagal bradycardia.
Eur. J. Pharmacol., 1981 May 22, **71**(4): 455-61.

Imanaga I., Kaneda T., Miyakawa N.
Comparison of the effects of dobutamine with dopamine and isoproterenol on inotropism and chronotropism in the mammalian heart. (author's transl)
Nippon Yakurigaku Zasshi, 1979 Mar, **75**(2): 147-57.

Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C.
Programmed cell death in animal development.
Cell, 1997, Feb 7, **88**(3): 347-54. Review.

Jelkmann W.
Erythropoietin: structure control of production and function.
Physiol. Rev., 1992, **72**: 449-489.

Johnson G.V., Guttman R.P.
Calpains: intact and active?
Bioessays., 1997 Nov, **19**(11): 1011-8.

Jovanovic-Micic D., Samardzic R., Beleslin D.B.
The role of Alpha-adrenergic mechanisms within the area postrema in dopamine-induced emesis.
Eur. J. Pharmacol., 1995 Jan 5, **272**(1): 21-30.

Jensen B.S., Strobaek D., Olesen S.P., Christophersen P.
The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments.
Curr. Drug Targets, 2001, **2**(4): 401-22.

Kataoka S. and Tsuruo T.
Physician Education: Apoptosis.
Oncologist., 1996, **1**(6): 399-401.

Kienast J., Schmitz G.
Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders.
Blood, 1990, **75**: 116-121.

Koch J., Korbmacher C.
Osmotic shrinkage activates Nonselective Cation (NSC) channels in various cell types.
J. Membr. Biol., 1999, **168**: 131-139.

Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D.
The release of cytochrom c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.
Science, 1997, Feb 21, **275**(5303): 1081-2.

Korsmeyer S.J.
Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.
Blood, 1992 Aug 15, **80**(4): 879-86.

Korsmeyer S.J.
Regulators of cell death.
Trends Genet., 1995 Mar, **11**(3): 101-5.

Korsmeyer S.J.
Programmed cell death and the regulation of homeostasis.
Harvey Lect., 1999-2000, **95**: 21-41.

Krebs J.F., Srinivasan A., Wong A.M., Tomaselli K.J., Fritz L.C., Wu J.C.
Heavy membrane – associated caspase 3: identification, isolation and characterization.
Biochemistry, 2000, **39**(51): 16056-63.

Krysko D.V., Denecker G., Festjens N., Gabriels S., Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P.
Macrophages use different internalization mechanism to clear apoptotic and necrotic cells.
Cell Death Differ., 2006 Dec, **13**(12): 2011-22. Epub 2006 Apr. 21.

Kübler W., Männl H.F.K.
Die Permeation von Isoproterenol durch die Erythrozytenmembran des Menschen.
Klinische Wochenschrift, 1970, S.944 - 46.

Kuwana T., Bouchier-Haves L., Chipuk J.E., Bonzon C., Sullivan B.A., Green D.R., Newmeyer D.D.
BH 3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly.
Mol. Cell., 2005 Feb 18, **17**(4): 525-35.

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

Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M.
Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis.
Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2003 Dec, **285**(6): C1553-60.

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

Lang K. S., Myssina S., Tanneur V., Wieder T., Huber S.M., Lang F.,
Duranton C.
Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by
ethylisopropylamiloride.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 2003(b), **367**: 391-396.

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

Lang P.A., Warskulat U., Heller-Stilb B., Huang D.Y., Grenz A., Myssina S.,
Duszenko M., Lang F., Haussinger D., Vallon V., Wieder T.
Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice.
Cell Physiol. Biochem., 2003(d), **13**: 337-346 Arch-Eur J Physiol (2004) **448**:
319-324.

Lang F., Lang P.A., Lang K.S., Brand V., Tanneur V., Duranton C.,
Wieder T., Huber S.M.
Channel-induced apoptosis of infected host cells – the case of malaria
Pflugers Arch., 2004 Jun, **448**(3): 319-24.

Lang K.S., Myssina S., Brand V., Sandu C., Lang P.A., Berchtold S.,
Huber S.M., Lang F., Wieder T.
Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes.
Cell Death Differ., 2004(a), **11**: 231-243.

Lang K.S., Myssina S., Lang P.A., Tanneur V., Kempe D.S., Mack A.F.,
Huber S.M., Wieder T., Lang F., Duranton C.
Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by Urea and Cl⁻.
Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 2004(b), **286**: F1046-F1053.

Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M., Lang F.
Mechanisms of suicidal erythrocyte death.
Cell Physiol. Biochem., 2005(a), **15**: 195-202.

Lang P.A., Kempe D.S., Myssina S., Tanneur V., Birka C., Laufer S., Lang F.,
Wieder T., Huber S.M.
PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death.
Cell Death Differ., 2005(b), **12**: 415-428.

Lang P.A., Kempe D.S., Tanneur V., Eisele K., Klarl B.A., Myssina S., Jendrossek V., Ishii S., Shimizu T., Waidmann M., Hessler G., Huber S.M., Lang F., Wieder T.
Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet –activating factor.
J. Cell Sci., 2005 Mar 15, **118**(Pt6): 1233-43.Epub 2005 Mar 1.

Lang F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T.
Osmotic shock induced suicidal death of erythrocytes.
Acta Physiol. (Oxf), 2006 May –Jun, **187**(1-2): 191-8.

Lang F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T.
Mechanisms and significance of eryptosis.
Antioxid Redox Signal, 2006 Jul-Aug, **8**(7-8): 1183-92.

Leier C.V.
General overview and update of positive inotropic therapy.
Am. J. Med., 1986 Oct 31, **81**(4C): 40-5.

Liu S.S.
Cooperation of a “reactive oxygen cycle” with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain—superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria.
J. Bioenerg. Biomembr., 1999 Aug, **31**(4): 367-76.

Lorenz H.M., Herrmann M., Winkler T., Gaipf U., Kalden J.R.
Role of apoptosis in autoimmunity.
Apoptosis., 2000 Nov, **5**(5): 443-9.

Los M., Stroh C., Janicke R.U., Engels I.H., & Schulze-Osthoff K.
Caspases: more than just Killers?
Trends Immunol., 2001, **22**, 31-34.

MacGregor D.A., Prielipp R.C., Butterworth J.F. 4th, James R.L., Royster R.L.
Relative efficacy and potency of beta – adrenoceptor agonists for generating cAMP in human lymphocytes.
Chest., 1996 Jan, **109**(1): 194-200.

Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A. et al.
Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**: 9487-9492.

Maher A.D., Kuchel P.W.
The Gardos channel: a review of the Ca²⁺- activated channel in human erythrocytes.
Int.J.BiochemCellBiol.2003Aug; **35**(8): 1182-97.

Malhi H., Gores G.J., Lemasters J.J.
Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?
Hepatology, 2006 Feb, **43**(2 Suppl 1): S31-44.

Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson E.P., Casciola-Rosen L.A., Rosen A.

The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling.

J. Cell Biol., 1998, **140**(6): 1485-95.

Mandal D., Moitra P.K., Saha S., Basu J.

Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes.

FEBS Lett., 2002 Feb 27, **513**(2-3): 184-8.

Manodori A.B., Barabino G.A., Lubin B.H., Kuypers F.A.

Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin.

Blood, 2000, **95**: 1293-1300.

McIntyre J.A.

Antiphospholipid antibodies in implantation failures.

Am. J. Reprod. Immunol., 2003 Apr, **49**(4): 221-9.

Melloni E., Aversa M., Stifanese R., De Tullio R., Defranchi E., Salamino F., Pontremoli S.

Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease?

J. Biol. Chem., 2006 Aug 25, **281**(34): 24945-54. Epub 2006 Jun 27.

Michea L., Ferguson D.R., Peters E.M., Andrews P.M. et al.

Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells.

Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 2000, **278**: F209-F218.

Miramar M.D., Constantini P., Ravagnan L., Saraiva L.M., Haouzi D., Brothers G., Penninger J.M., Peleato M.L., Kroemer G., Susin S.A.

NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis – inducing factor.

J. Biol. Chem., 2001 May 11, **276**(19): 16391-98.

Mische S.M., Mooseker M.S., Morrow J.S.

Erythrocyte adducin: a calmodulin-regulated actin-bundling protein that stimulates spectrin-actin binding.

J. Cell Biol., 1987 Dec, **105**(6 Pt 1): 2837-45.

Miura Y., Koyanagi Y.

Death ligand mediated apoptosis in HIV infection.

Rev. Med. Virol., 2005 May-Jun, **15**(3): 169-78.

Motomura S., Reinhard - Zerkowski H., Daul A., Brodde O.E.

On the physiologic role of beta-2 adrenoceptors in the human heart: in vitro and in vivo studies.

Am. Heart J., 1990 Mar, **119**(3 Pt 1): 608-19.

Myssina S., Huber S.M., Birka C., Lang P.A., Lang K.S., Friedrich B., Risler T., Wieder T., Lang F.

Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin.
J. Am. Soc. Nephrol., 2003, **14**: 2750-2757.

Myssina S., Lang P.A., Kempe D.S., Kaiser S., Huber S.M., Wieder T., Lang F.
Cl-channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca^{2+} -induced erythrocyte „apoptosis“.

Cell Physiol. Biochem., 2004, **14**(4-6): 241-8.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J.

Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloidbeta.

Nature, 2000, **403**, 98-103.

Neve K.A., Seamans J.K., Trantham-Davidson H.

Dopamine receptor signaling.

J. Recept Signal Transduct Res., 2004 Aug, **24**(3): 165-205.

Nicotera P., Orrenius S.

The role of calcium in apoptosis.

Cell Calcium, 1998, **23**: 173-180.

Nicholson D.W., Thornberry N.A.

Caspases: killer proteases.

Trends Biochem. Sci., 1997, **22**: 299-306.

Nieminen A.L.

Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria.

Int.Rev. Cytol., 2003, **224**: 29-55.

Nunomura W., Takakuwa Y., Tokimitsu R., Krauss S.W., Kawashima M., Mohandas N.

Regulation of CD 44-protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for modulation of CD 44- ankyrin interaction.

J. Biol. Chem., 1997 Nov 28, **272**(48): 30322-8.

Oakes S.A., Scorrano L., Opferman J.T., Bassik M.C., Nishino M., Pozzan T., Korsmeyer S.J.

Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol triphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2005 Jan 4, **102**(1): 105-110 epub 2004 Dec.

Obadiah J., Avidor-Reiss T., Fishburn C.S., Carmon S., Bavewitch M., Vogel Z., Fuchs S., Levavi-Sivan B.

Adenylyl cyclase interaction with the D2 dopamine receptor family, differential coupling to G_i , G_z , and G_s .

Cell Mol. Neurobiol., 1999 Oct, **19**(5): 653-64.

Ohlemeyer C., Meyer J.W.

The Faraday Cage and Grounding Arrangements. 3-5

In: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.) Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology.

1st ed., New York. 1992.

Oonishi T., Sakshita K., Uyesaka N.

Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP- mediated signaling pathways.

Am. J. Physiol., 1997 Dec, **273**(6pt 1): C1828-34.

Park S.E., Sohn J.T., Kim C., Chang K.C., Shin I.W., Park K.E., Lee H.K., Chung Y.K.

Diazepam attenuates phenylephrine-induced contractions in rat aorta.

Anesth. Anag., 2006 Mar, **102**(3): 682-9.

Park M.Y., Ryu S.W., Kim K.D., Lim J.S., Lee Z.W., Kim E.

Fas-associated factor-1 mediates chemotherapeutic- induced apoptosis via death effector filament formation.

Int. J. Cancer., 2005 Jun, **115**(3): 412-18.

Pascoe P.J., Ilkiw J.E., Pypendop B.H.

Effects of increasing infusion rates of dopamine, dobutamine, epinephrine, and phenylephrine in healthy anesthetized cat. s.

Am. J. Vet. Res., 2006 Sep, **67**(9): 1491-99

Pavoni V., Verri M., Ferraro L., Volta C.A., Paparella L., Capuzzo M.,

Pavanelli L., Buccoliero C., Beani L., Alvisi R., Gritti G.

Plasma dopamine concentration and effects of low dopamine doses on urinary output after major vascular surgery.

Kidney Int. Suppl., 1988, **66**: S75-S80.

Peter M.E., Krammer P.H.

The CD 95 (APO-1/Fas) DISC and beyond.

Cell Death Differ., 2003 Jan, **10**(1): 26-35.

Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W.

Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.

Biochem. Biophys. Acta., 2004 Mar 1, **1644**(2-3): 83-94.

Polenakovic M., Sikole A.

Is erythropoietin a survival factor for red blood cells?

J. Am. Soc. Nephrol., 1996, **7**: 1178-1182.

Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen G.S.

The apoptosome activates caspase-9 by dimerization.

Mol. Cell., 2006 Apr 21, **22**(2): 269-75.

- Proskuryakov SY, Gabai VL., Konoplyannikov AG.
Nekrosis is an active ad controlled form of programmed cell death.
Chemistry (Mosc), 2002 Apr, **67**(4): 387-408.
- Qin Z.H., Wang Y., Kikly K.K., Sapp E., Kegel K.B., Aronin N., DiFiglia M.
Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation.
J. Biol. Chem., 2001, **276**(11): 8079-86.
- Ranganath R.M., Nagashree N.R.
Role of programmed cell death in development.
Int. Rev. Cytol., 2001, **202**: 159-242.
- Rano T.A., Timkey T., Peterson E.P., Rotonda J., Nicholson D.W., Becker J.W., Chapman K.T., Thornberry N.A.
A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1 beta converting enzyme (ICE).
Chem Biol, 1997, **4**: 149-55.
- Rao R.V., Ellerby H.M., Bredesen D.E.
Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program.
Cell Death Differ., 2004 Apr, **11**(4): 372-80.
- Reed J.C., Zha H., Aime –Sempe C., Takavama S., Wang H.G.
Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **406**: 99-112.
- Roelofsen B.
Molecular architecture and dynamics of the plasma membrane lipid bilayer: the red blood cell as a model.
Infection, 1991, **19** (Suppl 4): 206-09.
- Roger F., Martin P.Y., Rousselot M., Fave H. et al.
Cell shrinkage triggers the activation of mitogen activated protein kinases by hypertonicity in the rat kidney medullary thick ascending limb of the henle's loop. Requirement of P38 kinase for the regulatory volume increase response.
J. Biol. Chem., 1999, **274**: 34103-34110.
- Romero P.J., Romero E.A.
Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells.
Cell Calcium, 1999, **26**: 131-137.
- Rosette C., Karin M.
Ultraviolet light and osmotic stress activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors.
Science, 1996, **274**: 1194-1197.

Rudin C.M., Thompson C.B.
Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death.
Annu. Rev. Med., 1997, **48**: 267-81.

Ruffolo R.R.Jr. and Morgan E.L.
Interaction of the novel inotropic agent, ASL-7022, with alpha and beta adrenoceptors in the cardiovascular system of the pithed rat: comparison with dobutamine and dopamine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1984 May, **229**(2): 364-71.

Ruffolo R.R. Jr., Spradlin T.A., Pollock G.D., Waddell J.E., Murphy P.J.
Alpha and beta adrenergic effects of the stereoisomers of dobutamine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1981 Nov, **219**(2): 447-52.

Ruiz-Vela A., Opferman J.T., Cheng E.H., Korsmeyer S.J.
Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases.
EMBO Rep., 2005 Apr, **6**(4): 379-85.

Ruymann F.B., Popejoy L.A., Brouillard R.B.
Splenic sequestration and ineffective erythropoiesis in hemoglobin E-beta-Thalassemia disease.
Pediatr. Res., 1978, **12**: 1020-1023.

Saez M.E., Ramirez-Lorca R., Moron F.J., Ruiz A.
The therapeutic potential of the calpain family: new aspects.
Drug Discov. Today, 2006 Oct, **11**(19-20): 917-23. Epub 2006 Sep 7.

Sager G.
Receptor binding sites for beta-adrenergic ligands on human erythrocytes.
Biochem. Pharmacol., 1982, **31**: 99-104.

Salvesen G.S.
Caspases and apoptosis.
Essays Biochem., 2002, **38**: 9-19.

Salvesen G.S., Duckett C.S.
IAP proteins: blocking the road to death's door.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2002 Jun, **3**(6): 401-10.

Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D.P. and Orrenius, S.
Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues.
FEBS Lett., 1998, **431**(2): 167-9.

Sarasin A.
The molecular pathways of ultraviolet- induced carcinogenesis.
Mutat. Res., 1999 Jul 16, **428**(1-2): 5-10.

Schindler C., Dobrev D., Grossmann M., Francke K., Pittrow D., Kirch W.
Mechanisms of beta-adrenergic receptor-mediated vasodilatation in humans.
Clin. Pharmacol. Ther., 2004 Jan, **75**(1): 49-59.

Schroder M.
The unfolded protein response.
Mol. Biotechnol., 2006 Oct, **34**(2): 279-90.

Schulze- Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E.
Apoptosis signaling by the death receptors.
Eur. J. Biochem., 1998 Jun 15, **254**(3): 439-59.

Sedlak T.W., Oltvai Z.N., Yang E., Wang K., Boise L.H., Thompson C.B.,
Korsmeyer S.J.
Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995 Aug 15, **92**(17): 7834-8.

Sen, S.
Programmed cell death: concept, mechanism and control.
Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., 1992 Aug, **67**(3): 287-319.

Seri I.
Dopamine and natriuresis. Mechanism of action and developmental aspects.
Am. J. Hypertens, 1990 Jun, **3** (6 Pt 2): 82-86.

Setty B.N., Kulkarni S., Stuart M.J.
Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell- endothelial adhesion.
Blood, 2002, **99**: 1564-1571.

Shi, Y.
Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view.
Protein Sci., 2004 Aug, **13** (8): 1979-1987.

Shi, Y.
Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.
Mol. Cell., 2002 Mar, **9**(3): 459-70.

Shi Y.
A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding.
Cell Death Differ., 2002 Feb, **9**(2): 93-5.

Shiozaki E.N., Chai J., Shi Y.
Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002 Apr 2, **99**(7): 4197-202.

Sidhu A., Kumar U., Uh M., Patel S.
Diminished expression of renal dopamine D1A receptors in the kidney inner
medulla of the spontaneously hypertensive rat.
J. Hypertens, 1998 May, **16**(5): 601-8.

Sink J.D., Hill R.C., Chitwood W.R.Jr., Abriss R., Wechsler A.S.
Effects of phenylephrine on transmural distribution of myocardial blood flow in regions supplied by normal and collateral arteries during cardiopulmonary bypass.

J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1979 Aug, **78**(2): 236-43.

Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Keller C., Lonigro A.J. (2001)
Impaired release of ATP from red blood cells of humans with primary pulmonary hypertension.

Exp. Biol. Med. (Maywood), 2001 May, **226**(5): 434-9.

Sprick M.R., Rieser E., Stahl H., Grosse-Wilde A., Weigand M.A., Walczak H.
Caspase – 10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD 95 death – inducing signalling complexes in a FADD –dependent manner but can not functionally substitute caspase – 8.

EMBO J., 2002 Sep 2, **21**(17): 4520-30.

Stennicke H.R. & Salvesen G.S.

Catalytic properties of the caspases.

Cell Death Differ., 1999, **6**,1054-1059.

Stennicke H.R. and Salvesen G.S.

Properties of the caspases.

Biochim Biophys Acta., 1998 Sep 8, **1387** (1-2): 17-31.

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M.C., Alzari P.M., Kroemer G.

Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process.

J. Exp. Med., 1999 Jan 18, **189**(2): 381-94.

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Constantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G.

Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.

Nature, 1999 Feb 4, **397**(6718): 441-6.

Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H.

Structure, activation and biology of calpain.

Diabetes, 2004 Feb, Suppl **1**: S12-8.

Tanaka T., Kadowaki K., Lazarides E., Sobue K.

Ca²⁺ dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1.

J. Biol. Chem., 1991 Jan 15, **266**(2): 1134-40.

Tarditi D.J., Hollenberg S.M.

Cardiac arrhythmias in the intensive care unit.

Semin. Respir. Crit. Care Med., 2006 Jun, **27**(3): 221-9.

Tattersfield A.E.

Current issues with beta 2 - adrenoceptor agonists: historical background.
Clin Rev. Allergy Immunol., 2006 Oct-Dec, **31**(2-3): 107-18.

Thompson C.B.

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science, 1995 Mar 10, **267**(5203): 1456-62.

Thorburn A., Thorburn J., Franke A.E.

Induction of apoptosis by tumor cell – targeted toxins.
Apoptosis, 2004 Jan, **9**(1): 19-25. Review.

Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J., et al.

A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin- 1 beta processing in monocytes.
Nature, 1992 Apr 30, **356**(6372): 768-74.

Tsujimoto Y.

Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?
Genes Cells, 1998 Nov, **3**(11): 697-707.

Tsujimoto Y., Shimizu S.

Bcl-2 family: life or death switch.
FEBS Lett., 2000 Jan 21, **466**(1): 6-10.

Tsujimoto Y., Shimizu S.

Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death.
Apoptosis, 2006 Nov 21.

Tuttle R.R., Mills J.

Dobutamine: development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility.
Circ. Res., 1975 Jan, **36**(1): 185-96.

Van de Water B., Wang Y., Asmellash S., Liu H., Zhan Y., Miller E., Stevens J.L.

Distinct endoplasmic reticulum signalling pathways regulate apoptotic and necrotic cell death following iodoacetamide treatment.
Chem. Res. Toxicol., 1999 Oct, **12**(10): 943-51.

Vaux D.L. and Korsmeyer S.J.

Cell death in development.
Cell., 1999 Jan 22, **96**(2): 245-54.

Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L.

Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.
Cell., 2000 Jul 7, **102**(1): 43-53.

Volk T., Fromter E., Korbmacher C.
Hypertonicity activates nonselective cation channels in mouse cortical collecting duct cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, **92**: 8478-8482.

Von Bohlen und Halbach O.
Modeling neurodegenerative diseases in vivo review.
Neurodegener Dis., 2005, **2**(6): 313-20.

Wajant H.
Death receptors.
Essays Biochem., 2003, **39**: 53-71.

Wali R.K., Jaffe S., Kumar D., Kalra V.K.
Alterations in organization of phospholipids in erythrocytes as factor in adherence to endothelial cells in diabetes mellitus.
Diabetes., 1988 Jan, **37**(1): 104-11.

Wehner F., Sauer H., Kinne R.K.
Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture.
J. Gen. Physiol., 1995, **105**: 507-535.

Wehner F., Böhmer C., Heinzinger H., van den BF et al.
The hypertonicity induced Na⁽⁺⁾ conductance of rat hepatocytes physiological significance and molecular correlate.
Cell Physiol. Biochem., 2000, **10**: 335-340.

Wie M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., MacGregor G.R., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.
Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.
Science, 2001 Apr 27, **292**(5517): 727-30.

Wieder T., Prokop A., Bagci B., Essmann F., Bernicke D., Schulze-Osthoff K., Dorken B., Schmalz H.G., Daniel P.T., Henze G.
Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts.
Leukemia, 2001 Nov, **15**(11): 1735-42.

White M., Fourney A., Mikes E., Leenen F.H.
Effects of age and hypertension on cardiac responses to the alpha1-agonist phenylephrine in humans.
Am J Hypertens., 1999 Feb, **12**(2Pt1): 151-8.

Worthley L.I., Tyler P., Moran J.L.
A comparison of dopamine, dobutamine and isoproterenol in the treatment of shock.
Intensive Care Med., 1985, **11**(1): 13-9.

- Yang X.Y., Qu Q., Yang T.Y., Chan W.C.
Treatment of the Thalassemia syndrome with splenectomy.
Hemoglobin, 1988, **12**: 601-608.
- Yang H.T., Endoh M.
Dissociation of the positive inotropic effect of methoxamine from the hydrolysis of phosphoinositide in rabbit ventricular myocardium: a comparison with the effects of phenylephrine and the subtype of the alpha-1 adrenoceptor involved.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1994 May, **269**(2): 732-42.
- Yin X.M., Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J.
BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax.
Nature, 1994 May 26, **369**(6478): 321-3.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H. R.
The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin- 1 beta converting enzyme.
Cell, 1993 Nov 19, **75**(4): 641-52.
- Yui K., Ikemoto S., Ishiguro T., Goto K.
Studies of amphetamine or metamphetamine psychosis in Japan: relation of metamphetamine psychosis to schizophrenia.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 2000 Sep, **914**: 1-12.
- Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A., Kroemer G.
Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2 like oncoproteins.
Oncogene., 1998 Apr 30, **16**(17): 2265-82.
- Zerkowski H.R., Ikezono K., Rohm N., Reidemeister J.C., Brodde O.E.
Human myocardial beta-adrenoceptors: demonstration of both beta 1- and beta 2- adrenoceptors mediating contractile responses to beta-agonists on the isolated right atrium.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol., 1986 Feb, **332**(2): 142-7.
- Zhao L., Ackerman S.L.
Endoplasmic reticulum stress in health and disease.
Curr. Opin Cell Biol., 2006 Aug, **18**(4): 444-52.
- Zhou Q., Zhao J., Wiedmer T., Sims P.J.
Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase1.
Blood, 2002, **99**: 4030-4038.

9 Abbildungsverzeichnis

Blom, W.M. (2000): Cell death in rat hepatocytes: Apoptosis- inducing and protective mechanisms, Cytologie, cellbiologie en elfysiologie, Division of Toxicology, Leiden-Amsterdam Center for Drug-Research (LACDR): Universiteit Leiden Leiden, Niederlande.

Hengartner, Michael. (2000)
Biochemistry of apoptosis.
Nature **407**, 770, 2000

Lang F., Lang P.A., Lang K.S., Brand V., Tanneur V., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. (2004)
Channel-induced apoptosis of infected host cells – the case of malaria
Pflugers Arch., 2004 Jun, **448** (3):319-324.

Opferman J.T., Korsmeyer S.J. (2003)
Apoptosis in the development and maintenance of the immune system.
Nature Immunology 2003 May; **4**(5): 410-415

Parks D.R., Herzenberg L.A. (1982)
Fetal cells from maternal blood: their selection and prospects for use in prenatal diagnosis.
Methods Cell Biol. 1982; **26**:277-95.

Neher E., Sakmann B. (1992)
The patch clamp technique.
Sci Am. 1992 Mar; **266**(3):44-51.

Sakmann B. (1992)
Elementary Steps in Synaptic Transmission Revealed by Currents through Single Ion Channels (Nobel Lecture)
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992; **31**:830-841.

10 Publikationsverzeichnis

Lang P.A., Kempe D.S., Akel A., Klarl B.A., Eisele K., **Podolski M.**, Hermle T., Niemöller O., Attanasio P., Huber S.M., Wieder T., Lang F., Duranton C.
Inhibition of erythrocyte apoptosis by catecholamines.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol., 2005 Nov; **372**(3):228-35. Epub 2005 Oct

Akel A., Hermle T., Niemoeller O.M., Kempe D.S., Lang P.A., Attanasio P., **Podolski M.**, Wieder T., Lang F.
Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine.
Eur J Pharmacol., 2006 Feb 17; **532**(1-2):11-7.

Klarl B.A., Lang P.A., Kempe D.S., Niemöller O., Akel A., Sobiesiak M., Eisele K., **Podolski M.**, Huber S.M., Wieder T., Lang, F.
Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion.
Am J Physiol Cell Physiol., 2006 Jan; **290**(1):C244-53.

Hermle T., Shumilina E., Attanasio P., Akel A., Kempe D.S., Lang P.A., **Podolski M.**, Gatz S., Bachmann R., Bachmann C., Abele H., Huber S., Wieder T., Lang F.
Decreased cation channel activity and blunted channel- dependent eryptosis in neonatal erythrocytes.
Am J Physiol Cell Physiol., 2006 Oct; **291**(4):C710-7.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an:

Meinen Doktorvater Professor Florian Lang für die Möglichkeit zur Promotion und für die Überlassung des Themas.

Meinen Laborleiter Privat Dozent Dr. rer. nat. Thomas Wieder für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Dr. Philipp A. Lang, der unsere Laborgruppe stets geduldig betreut und unterstützt hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Arbeitskollegen, die alle zu einer lustigen Arbeitsatmosphäre im Labor beitragen und stets hilfsbereit waren. Ich danke Barbara A. Klarl, Kerstin Eisele, Daniela S. Kempe, Ahmad Akel, Verena Brand und Stephan Huber.

Es hat Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten.

Pablo Georgiadis, Nanne Häussermann und Nadja Reinhardt danke ich, dass sie mir bei der Korrektur und Formatierung des schriftlichen Teils mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein kann.

12 Lebenslauf

Marlis Maria Podolski

- | | |
|------------------------|---|
| 29.10.1978 | Geboren als Tochter der Zahnärztin Margot Podolski in Stuttgart, Deutschland. |
| 1985-1989 | Besuch der Franz-Schubert Schule in Stuttgart |
| 1989-1998 | Besuch des Dillmann-Gymnasiums in Stuttgart |
| Juni 1998 | Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife |
| 1999-2001 | Besuch der Chemischen Hochschule Flad |
| Juli 2001 | Erwerb des Staatsexamens für Chemisch-technische Assistenten |
| Oktober 2001 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen |
| September 2003 | Physikum |
| August 2006- Juli 2007 | Praktisches Jahr im Paracelsus Krankenhaus Ruit und in der Augenklinik Tübingen |
| 27.05.2008 | Ärztliche Prüfung |