

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Der suizidale Zelltod humaner Erythrozyten
– Stimulation durch Sphingosin
und Auswirkungen der biogenen Polyamine Spermin
und Spermidin**

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

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

vorgelegt von

Julia Martina Bauer

aus Tett nang

2013

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

Meinen Eltern

Inhalt

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Erythrozyten.....	1
1.1.1. Die Bildung der Erythrozyten	1
1.1.2. Die Alterung der Erythrozyten – Senescence	2
1.2. Apoptose – Suizid der Zelle.....	5
1.2.1. Die Bedeutung der Apoptose kernhaltiger Zellen.....	5
1.2.2. Mechanismen und Signalwege in der Apoptose	7
1.2.2.1. Morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen.....	7
1.2.2.2. Signalwege, Mechanismen und Regulation der Apoptose.....	8
1.2.2.3. Der Abbau der zugrunde gegangenen Zelle	13
1.2.2.4. Möglichkeiten des Sterbens – Nekrose und Apoptose	14
1.3. Eryptose – Der suizidale Zelltod der Erythrozyten	15
1.3.1. Der Begriff der Eryptose.....	15
1.3.2. Signalwege und Mechanismen der Eryptose	16
1.3.2.1. Ionenkanäle	16
1.3.2.2. Umverteilung der Phospholipide	17
1.3.2.3. Prostaglandine.....	17
1.3.2.4. Platelet Activating Factor, Sphingomyelinasen und Ceramid	18
1.3.2.5. Calpaine und Caspasen	19
1.3.2.6. weitere Mechanismen der Eryptose.....	20
1.3.3. Relevanz und Bedeutung der Eryptose.....	21
1.4. Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat und Ceramid	24
1.4.1. Eigenschaften von Sphingolipiden	24
1.4.2. Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat als bioaktive Signalmoleküle.....	25
1.4.2.1. Sphingosin als Signalmolekül	26

1.4.2.2. Sphingosin-1-Phosphat als Signalmolekül.....	27
1.4.3. Die Rolle der Sphingolipide im Erythrozyten	28
1.5. Spermin und Spermidin	30
1.5.1. Eigenschaften, Vorkommen und Metabolismus von Spermin und Spermidin.....	30
1.5.2. Wirkung der Polyamine	31
1.5.3. Spermin und Spermidin in Erythrozyten.....	33
1.6. Zielsetzung der Doktorarbeit.....	35
2. Material und Methoden	36
2.1. Erythrozyten.....	36
2.2. Verwendete Lösungen	36
2.2.1. Ringer-Lösung	36
2.2.2. Glukosefreie Lösung	37
2.2.3. Chloridfreie Lösung.....	38
2.2.4. Hyperosmolare Lösung.....	38
2.2.5. Annexin-Waschpuffer.....	39
2.2.6. Pipettenlösung	39
2.2.7. Badlösung	40
2.3. Verwendete Substanzen	41
2.3.1. Sphingosin	41
2.3.2. Sphingosin-1-Phosphat.....	41
2.3.3. K6PC-5	41
2.3.4. Spermin und Spermidin.....	41
2.4. Methoden	43
2.4.1. Durchflusszytometrie.....	43
2.4.1.1. Grundlagen.....	43
2.4.1.2. Durchführung der Versuche.....	44
2.4.1.3. Messung der Phosphatidylserin-Exposition	45
2.4.1.4. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration.....	46

2.4.2. Patch-Clamp-Technik.....	47
2.4.2.1. Grundlagen	47
2.4.2.2. Durchführung der Messung	48
2.5. Statistik	49
3. Ergebnisse.....	50
3.1. Auswirkungen von Sphingosin auf die Eryptose	50
3.1.1. Auswirkungen von Sphingosin auf die PS-Exposition.....	50
3.1.2. Auswirkungen von Sphingosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration.....	52
3.1.3. Auswirkungen von Sphingosin auf das Zellvolumen	54
3.2. Auswirkung von Sphingosin auf durch Glukose-Entzug induzierte Eryptose	55
3.3. Auswirkungen von Sphingosin-1-phosphat auf die Eryptose..	56
3.4. Einfluss des Sphingosinkinase-Aktivators K6PC-5 auf die durch Sphingosin induzierte Eryptose.....	57
3.5. Auswirkungen von Sphingosin auf die Kationenleitfähigkeit ..	58
3.6. Auswirkungen von Spermin auf die Eryptose	58
3.6.1. Auswirkungen von Spermin auf die PS-Exposition	59
3.6.2. Auswirkungen von Spermin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration.....	65
3.7. Auswirkungen von Spermidin auf die Eryptose	67
3.7.1. Auswirkungen von Spermidin auf die PS-Exposition	67
3.7.2. Auswirkungen von Spermidin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration.....	70
4. Diskussion.....	74
4.1. Methodendiskussion.....	74
4.2. Ergebnisdiskussion	75
4.2.1. Einfluss von Sphingosin auf den apoptotischen Zelltod der Erythrozyten.....	75

4.2.2. Wirkung der biogenen Amine Spermin und Spermidin auf die Eryptose	79
4.3. Relevanz der Ergebnisse und Ausblick.....	82
5. Zusammenfassung	83
6. Literatur	85
7. Anhang.....	110
7.1. Publikation	110
7.2. Danksagung.....	111

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (erworbenes Immundefektsyndrom)
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaGluc	Kalziumglukonat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARDs	Caspase Recruitment Domains
CD	Cluster of Differentiation (immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)
CO ₂	Kohlendioxid
DIABLO	Direct IAP-binding Protein with Low PI
DISC	Death Inducing Signal Complex
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGTA	Ethylene-Glycol-Tetraacetic-Acid (ein Kalzium-Chelatbildner)
Epo	Erythropoietin
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
Fluo-3-AM	Mit Acetoxymethyl verestertes Fluo-3
FSC	Forward-Scatter
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
HDL	High Density Lipoprotein
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein

IgG	Immunglobulin G
IL 1	Interleukin 1
K6PC-5	N-(1,3-dihydroxyisopropyl)-2-hexyl-3-oxo-decanamide
KCl	Kaliumchlorid
KGluc	Kaliumglukonat
Kir-Kanal	inward rectifying Kalium-Kanal (einwärts-gleichrichtender Kalium-Kanal)
MgATP	Magnesium-Adenosintriphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
NaCl	Natriumchlorid
NaGluc	Natriumglukonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBXQ	1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSC	Non Selective Cation Channels (unselektive Kationenkanäle)
PAF	Platelet Activating Factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
PTP	Permeability Transition Pore
Rel. Einh.	Relative Einheiten
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDK1	Sphingosine-dependent-kinase 1 (Sphingosin-abhängige Kinase 1)

SK	Sphingosinkinase
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SSC	Side-Scatter
TNF	Tumornekrosefaktor
UPR	Unfolded Protein Response

1. Einleitung

1.1. Erythrozyten

Die Erythrozyten sind die weitaus häufigsten Zellen im Blut. Sie machen 99 % des Hämatokrits aus. Erythrozyten sind spezialisierte Zellen für den Sauerstofftransport. Das Protein Hämoglobin, das in der Lunge Sauerstoff reversibel bindet und im Gewebe abgibt, ist in diesen Zellen enthalten. Die roten Blutkörperchen sind kleine Zellen. Ihr Durchmesser beträgt circa 7,5 µm, die mittlere Dicke 1,5 µm. Es handelt sich um kleine Scheibchen mit einer zentralen Delle. Erythrozyten weisen weder Zellkern noch Organellen auf, folglich sind sie nicht in der Lage, Proteine oder Lipide zu synthetisieren.

1.1.1. Die Bildung der Erythrozyten

Die Zahl der Erythrozyten im Blut wird innerhalb enger Grenzen konstant gehalten. Sie beträgt bei der Frau 4,0 bis $5,2 \times 10^{12}/l$ und beim Mann 4,6 bis $5,9 \times 10^{12}/l$. Etwa 0,8 % der Erythrozyten im Körper werden pro Tag neu gebildet. Dies entspricht einer Neubildung von 160×10^6 Zellen pro Minute. Die Bildung der Erythrozyten wird Erythropoese genannt und erfolgt im Knochenmark. Hier sitzen pluripotente Stammzellen. Über verschiedene Zwischenstufen erfolgt die Bildung der Erythroblasen. Der Erythroblast stößt seinen Zellkern aus, ab diesem Zeitpunkt ist eine Proteinsynthese nicht mehr möglich. Der entstandene Retikulozyt tritt in die Zirkulation über. Die Retikulozyten unterscheiden sich von den reifen Erythrozyten durch eine körnige, netzartige Struktur, die Substantia granulo-reticulo-filamentosa. Dieses Netzwerk besteht aus ribosomaler Ribonukleinsäure (RNA) und Zellorganellen. Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Anteil der Retikulozyten an den Erythrozyten 1 bis 1,5 %. Die Regulation der Erythropoese erfolgt über Zytokine und Hormone. Die Zytokine werden lokal von hämatopoietischen Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen im

Einleitung

Knochenmark produziert. Das wichtigste Hormon, das die Erythropoiese steuert, ist das Erythropoietin (Epo). Es wird hauptsächlich von peritubulären, fibroblastenähnlichen Zellen in der Niere gebildet. Im Knochenmark stimuliert Epo die Bildung von Signalmolekülen, die die Apoptose der erythrozytären Vorläuferzellen hemmen und sie zur Proliferation und Differenzierung anregen (Daugas et al. 2001).

1.1.2. Die Alterung der Erythrozyten – Senescence

Die Lebenszeit der Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage. Gegen Ende der Lebensspanne altern die Erythrozyten. Dieser Prozess wird Senescence genannt. Der Abbau der roten Blutkörperchen erfolgt durch Zellen des retikuloendothelialen Systems vor allem in der Milz, aber auch in Knochenmark und Leber. Makrophagen nehmen die Erythrozyten durch Phagozytose auf und bauen sie ab. Das beim Abbau des Hämoglobins freiwerdende Porphyringerüst wird zu Gallenfarbstoffen umgewandelt und ausgeschieden. Das Eisen und die Aminosäuren des Globinanteils werden für die Biosynthese wiederverwendet. Die Markierung der gealterten Erythrozyten erfolgt durch Immunglobuline der Klasse G (IgG), die an die Erythrozyten binden. Dies ist das Signal für die Erkennung und Beseitigung der Zellen. Der Prozess der IgG-Bindung wird durch ein erythrozytenspezifisches Antigen ausgelöst, das sich erst bei alternden Erythrozyten bildet. Dieses Antigen hat seinen Ursprung im Bande-3-Protein (Bosman et al. 2005).

Alternde Erythrozyten zeigen einen Verlust der Phospholipidasymmetrie. Es kommt zur Exposition von Phosphatidylserin (PS) (Daugas et al. 2001). Diese Verlagerung von PS auf die Außenseite der Zellmembran wird durch oxidativen Stress und die Inaktivierung des Systems, das für die Aufrechterhaltung der Phospholipidasymmetrie verantwortlich ist, verursacht (Kuypers and de Jong 2004). Die PS-Exposition dient als generalisierter Auslöser für die Phagozytose von Zellen, seien es alternde Erythrozyten oder auch apoptotische Zellen. Der Abbau der Erythrozyten wird auch durch den Verlust von Zellmembranbestandteilen wie Cluster of Differentiation (CD) 47 und

Einleitung

Sialinsäure begünstigt. Solange diese Bestandteile in normaler Anzahl und Anordnung auf der Erythrozytenoberfläche vorhanden sind, binden sie an Rezeptoren auf den phagozytierenden Zellen und verhindern die Eliminierung des gebundenen Erythrozyts (Lutz 2004).

Ein weiterer Teil des Alterungsprozesses der Erythrozyten ist die Vesikelbildung (Daugas et al. 2001). Die Erythrozyten bilden Vesikel mit denaturiertem Hämoglobin, die von den Kupffer-Zellen in der Leber beseitigt werden und somit schnell aus dem zirkulierenden Blut verschwinden (Werre et al. 2004; Willekens et al. 2005). Sie werden durch die gleichen Signale erkannt und entfernt wie die ausgedienten Erythrozyten selbst. Auch die Vesikel zeigen eine Exposition von Phosphatidylserin und alterungsspezifische Erythrozytenantigene (Bosman et al. 2005). Die Vesikelbildung erfolgt von Erythrozyten aller Altersklassen, wobei die von alternden Erythrozyten gebildeten Vesikel mehr Hämoglobin enthalten (Bosman et al. 2005). Während der Senescence der Erythrozyten nimmt ihr Volumen kontinuierlich ab. In der ersten Lebenshälfte ist eine Dichtesteigerung zu beobachten, während der zweiten Hälfte der Lebensspanne sinkt der Hämoglobingehalt (Bosman et al. 2005). Dabei verlieren die zirkulierenden Erythrozyten etwa 20 % ihres Hämoglobins. Gleichzeitig erfolgt ein Verlust von Cholesterol und Phospholipiden und eine Verminderung der Zelloberfläche um 20 % (Willekens et al. 2003; Werre et al. 2004).

Neben dem kontrollierten Abbau von Erythrozyten existiert die intravasale Hämolyse. Sie kommt sowohl als physiologisches Phänomen als auch als ernste pathologische Komplikation vor. Eine Schädigung der Integrität der Zellmembran führt zur Freisetzung von Hämoglobin, das ins Blutplasma gelangt. Das Plasma wird in der Niere gefiltert. In den sauren Lumina der Tubuli fällt das Hämoglobin aus. Die entstehenden Komplexe führen zu einem Verschluss der Tubuli und können ein Nierenversagen zur Folge haben (Lang et al. 2005a). Um dies zu verhindern, wird das freigesetzte Hämoglobin durch das Akute-Phase-Protein Haptoglobin gebunden. Haptoglobin schützt vor einem Nierenschaden und vor Eisenverlust, da es das Hämoglobin einem kontrolliertem Abbau und somit einer Wiederverwendung des Eisens zuführt (Wassell 2000). Der Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin wird von Phagozyten mittels CD 163

Einleitung

erkannt und durch Endozytose aufgenommen (Kristiansen et al. 2001). Gesteigerte Hämolyse, wie sie bei verschiedenen Autoimmun-, Infektions- und Erbkrankheiten auftritt, führt jedoch zu einem Verbrauch von Haptoglobin.

1.2. Apoptose – Suizid der Zelle

1.2.1. Die Bedeutung der Apoptose kernhaltiger Zellen

Während des Lebens eines Organismus werden ständig Zellen neu gebildet. Gleichzeitig sterben andere Zellen ab, um die Homöostase des Körpers aufrecht zu erhalten. Man unterscheidet diesen programmierten Zelltod von dem pathologischen Zelltod, der im Rahmen von Verletzungen und Schädigungen der Zellen auftritt und bei dem der Organismus geschädigt wird und mit einer Entzündungsreaktion reagiert. Durch den programmierten Tod der Zelle können Zellen entfernt werden, ohne den Organismus zu schädigen.

Dieser natürlich vorkommende Zelltod wurde schon im neunzehnten Jahrhundert beschrieben (Clarke and Clarke 1996). Die erste strukturierte Beschreibung des Prozesses wurde von Rudolph Virchow geliefert. 1972 führte Kerr den Begriff der Apoptose ein. Damit sollte der programmierte Zelltod bezeichnet werden, bei dem die Zellen Suizid begehen, indem sie sich in membranumhüllte Vesikel, die Apoptosekörperchen, auflösen (Conti et al. 2005). Kerr geht bei der Apoptose von einem aktiven, genetisch determinierten Prozess aus, der die gegensätzliche Rolle der Mitose, der kontrollierten Vermehrung der Zellen durch Zellteilung, einnimmt. Er unterscheidet zwei Phasen der Apoptose: Die erste Phase bildet die Kondensation des Nukleus und des Zytoplasmas mit dem Zerfall der Zelle in membranumhüllte Körperchen, die in der zweiten Phase der Apoptose durch andere Zellen aufgenommen und von lysosomalen Enzymen abgebaut werden (Kerr et al. 1972). Diese Form des Zelltodes gelangte immer mehr ins Interesse der Forschung und ist heute Gegenstand von etwa zwei Prozent der Publikationen in den Biowissenschaften (Melino et al. 2001; Curtin and Cotter 2003).

Die Apoptose ist für die Existenz des Organismus von enormer Bedeutung. Huettenbrenner sieht in der Apoptose gar die Voraussetzung der Multizellularität, da der Tod der Einzelzelle in Kauf genommen wird, um dem Gesamtorganismus zu dienen (Huettenbrenner et al. 2003).

Einleitung

In der embryonalen Entwicklung mehrzelliger Organismen hat der programmierte Zelltod verschiedene Funktionen. Er dient der Formung spezieller Strukturen, beispielsweise der Bildung der Fingerzwischenräume. Der programmierte Zelltod erlaubt die Kontrolle der Zellzahl. So werden im Nervensystem sehr viel mehr Neurone gebildet als schlussendlich benötigt werden. Die überflüssigen Zellen werden durch Apoptose eliminiert. Im Körper werden regelmäßig Zellen gebildet, die eine Gefahr für den Organismus darstellen können. Auch sie können durch Apoptose entfernt werden. Dies betrifft viele Zellen des Immunsystems. Lymphozyten, die auf körpereigene Antigene reagieren, werden abgebaut. Manche Zellen, beispielsweise die Keratinozyten der Haut oder Zellen der holokrinen Drüsen, sterben, um ihre biologische Funktion erfüllen zu können (Ameisen 1994; Jacobson et al. 1997). Die Apoptose ist also ein kontrollierter, aktiver Prozess.

Für die Apoptose werden sowohl RNA als auch ein Proteinsyntheseapparat benötigt. Es handelt sich um einen genetisch determinierten Prozess, der durch interzelluläre Signale, zum Beispiel veränderte Hormonkonzentrationen oder Mangel an Wachstumsfaktoren, ausgelöst wird, aber auch vorbestimmtes Schicksal der Zelle in der Entwicklung sein kann (Ellis et al. 1991; Twomey and McCarthy 2005).

Die Apoptose spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Einige Krankheiten können direkt oder indirekt auf eine fehlerhafte Regulation des suizidalen Zelltods zurückgeführt werden, was eine Zellansammlung oder den Verlust von Zellen verursacht. So spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle bei Autoimmunkrankheiten (Thompson 1995; Lorenz et al. 2000; Fadeel and Orrenius 2005), Entzündungsreaktionen (Fadeel and Orrenius 2005), neurodegenerativen Krankheiten (Thompson 1995; Fadeel and Orrenius 2005), Ischämie und Reperfusion (Fadeel and Orrenius 2005), viralen Infektionen (Thompson 1995; Rudin and Thompson 1997), dem Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (Thompson 1995; Miura and Koyanagi 2005), Tumorerkrankungen (Thompson 1995; Fadeel and Orrenius 2005), sowie der Resistenz von Tumoren gegen Chemotherapeutika (Rudin and Thompson 1997). Die weitere Erforschung der

Einleitung

Mechanismen der Apoptose bietet die Chance der Entwicklung neuartiger Therapiemethoden für diese Krankheiten (Reed 2002; Thorburn et al. 2004).

1.2.2. Mechanismen und Signalwege in der Apoptose

Die Apoptose wird durch verschiedene morphologische Charakteristika geprägt, deren Ausprägung über verschiedene Signalwege vermittelt werden können. Die Mechanismen und Signalwege, die zu den morphologischen Veränderungen führen, die die apoptotische Zelle ausmachen, sollen im Weiteren genauer betrachtet werden.

1.2.2.1. Morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen

Der Vorgang der Apoptose wird durch verschiedene morphologische Veränderungen geprägt. Im Gegensatz zur Nekrose, dem pathologischen Zelltod, der mit einem Anschwellen der Zelle verbunden ist, schrumpft die Zelle bei der Apoptose. Es kommt zu einer Kondensation des Kernchromatins, das als scharf abgegrenzte Masse an den Rand der Kernmembran gedrängt wird, und einer Schrumpfung des Zellkerns (Karyopyknose). Der Kern wird fragmentiert (Karyorrhesis). Die Zelle löst sich aus dem umgebenden Gewebe. Die Zellmembran bildet Ausschnürungen. Diese Extensionen separieren sich und bilden die Apoptosekörperchen. Die Apoptosekörperchen enthalten lose gepackte Zellorganellen und Kernfragmente. Sie werden rasch von umgebenden Zellen phagozytiert. Dabei können sowohl professionelle Phagozyten als auch Zellen des umgebenden Parenchyms die Apoptosekörperchen aufnehmen. Charakteristischerweise findet bei der Apoptose keine inflammatorische Reaktion statt (Gulbins et al. 2000; Saraste and Pulkki 2000; Fadeel and Orrenius 2005).

Zu den biochemischen Kennzeichen der Apoptose gehört die Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Durch Endonukleasen wird das Genom der Zelle in Fragmente von etwa 180 bis 200 Basenpaaren Länge gespalten. Es werden Caspasen aktiviert. Dabei handelt es sich um spezifische Proteasen. Die Caspasen spalten zahlreiche Zielproteine, darunter sowohl Proteine des

Einleitung

Zytoskeletts als auch Proteine, die an der Regulation der Struktur, Replikation und Reparatur der DNA beteiligt sind. Eine weitere Besonderheit der apoptotischen Zellen ist die Externalisierung von Phosphatidylserin. Dabei handelt es sich um ein Phospholipid, das physiologischerweise nur in der dem Zytosol zugewandten Lage der Phospholipiddoppelschicht der Membran, dem sogenannten inneren Leaflet, vorkommt. Die PS-Externalisierung dient der Erkennung der apoptotischen Zelle durch die Nachbarzellen (Fadok et al. 1992; Gulbins et al. 2000; Saraste and Pulkki 2000; Fadeel and Orrenius 2005). In der gesunden Zelle sorgt eine Aminophospholipid-Translokase (Flipase) für den aktiven Transport von PS vom äußeren zum inneren Leaflet der Membran und damit für die Aufrechterhaltung der Phospholipidasymmetrie. Bei der Apoptose kommt es zur Aktivierung einer Scramblase, die PS in das äußere Leaflet transportiert (McIntyre 2003).

1.2.2.2. Signalwege, Mechanismen und Regulation der Apoptose

Eine Schlüsselrolle in der Apoptose wird von den Caspasen eingenommen. Es handelt sich um eine Gruppe von in der Evolution hochkonservierten Proteasen. Ihre hochspezifischen proteolytischen Spaltungen führen zum apoptotischen Phänotyp (Nicholson and Thornberry 1997). Die Caspasen sind Cystein-haltige Proteasen, die ihre Zielproteine nach Aspartat schneiden. Daher leitet sich auch der Name ab: C-Asp-asen (Alnemri et al. 1996). Man kann zwei Gruppen der Caspasen unterscheiden, die Initiatorcaspasen und die Effektorcaspasen. Alle Caspasen liegen in der Zelle zunächst als inaktive Procaspasen vor. Die Procaspasen bestehen aus einer NH-terminalen Domäne sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit. Sie haben eine intrinsische proteolytische Aktivität. Dies ist essentiell für die Auslösung der katalytischen Kaskade (Stennicke and Salvesen 1999). Ist einmal eine Caspase aktiviert, kann sie ihr eigenes Vorläufermolekül spalten und dadurch aktivieren. Die Initiatorcaspasen werden durch die verschiedenen apoptose-auslösenden Stimuli aktiviert. Die Initiatorcaspasen aktivieren durch proteolytische Spaltung die Effektorcaspasen, die durch die Spaltung der Zielproteine für die Auslösung des apoptotischen Phänotyps verantwortlich sind, beispielsweise durch den Abbau von Proteinen, die das Zyto-

Einleitung

skelett und die nukleare Matrix aufbauen (Gerner et al. 2002). Die Caspasen erkennen die zu schneidenden Proteine an einem mindestens vier Aminosäuren langen NH-terminalen Polypeptid. Es gibt verschiedene Caspasen, die jeweils andere Sequenzen erkennen, so dass jede Caspase spezielle Zielproteine schneidet (Thornberry and Lazebnik 1998). Durch die kaskadenartige Aktivierung der Caspasen wird das Signal verstärkt.

Zwei unterschiedliche Signalwege können die Apoptose der Zelle auslösen: Der extrinsische Weg, bei dem Signale von außerhalb der Zelle die Apoptose auslösen, und der intrinsische Weg, mit dem die Zelle auf apoptogene Signale und Stressoren in ihrem Inneren reagiert.

Über den extrinsischen Weg können Signale von außen die Zelle zum Tode verurteilen. Auf der Zelle existieren verschiedene Todesrezeptoren, eine Untergruppe der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) -Rezeptor-Familie. Dazu gehört beispielsweise der Fas-Rezeptor (CD95). Zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade werden mehrere Rezeptor-Liganden-Paare benötigt. Bei der Bindung von Liganden an die Todesrezeptoren erfolgt die Zusammenlagerung eines Proteinkomplexes auf der zytoplasmatischen Seite der Rezeptoren. Dieser Komplex wird Death Inducing Signal Complex (DISC) genannt. Durch die Bindung der Initiator-Procaspasen an den DISC werden viele Procaspasen räumlich eng zusammengeführt, was die Autokatalyse der Procaspasen fördert. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Domänen, worauf sich zwei Heterodimere aus jeweils einer kleinen und einer großen Untereinheit zu einem Tetramer zusammenlagern. Dieses Tetramer besitzt zwei katalytische Seiten (Thornberry and Lazebnik 1998). Auf diese Weise werden die Initiatorcaspasen 2, 8 und 10 aktiviert, die wiederum die Effektorcaspase 3 proteolytisch aktivieren. Die Caspase 8 aktiviert außerdem das Protein Bid aus der Bcl-2-Protein-Familie, dabei entsteht das Spaltprodukt tBid, das den mitochondrialen Weg der Apoptoseauslösung induziert und so den extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg verknüpft (Schulze-Osthoff et al. 1998; Krammer 2000; Denault and Salvesen 2002).

Einleitung

Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über den extrinsischen Signalweg der Apoptose.

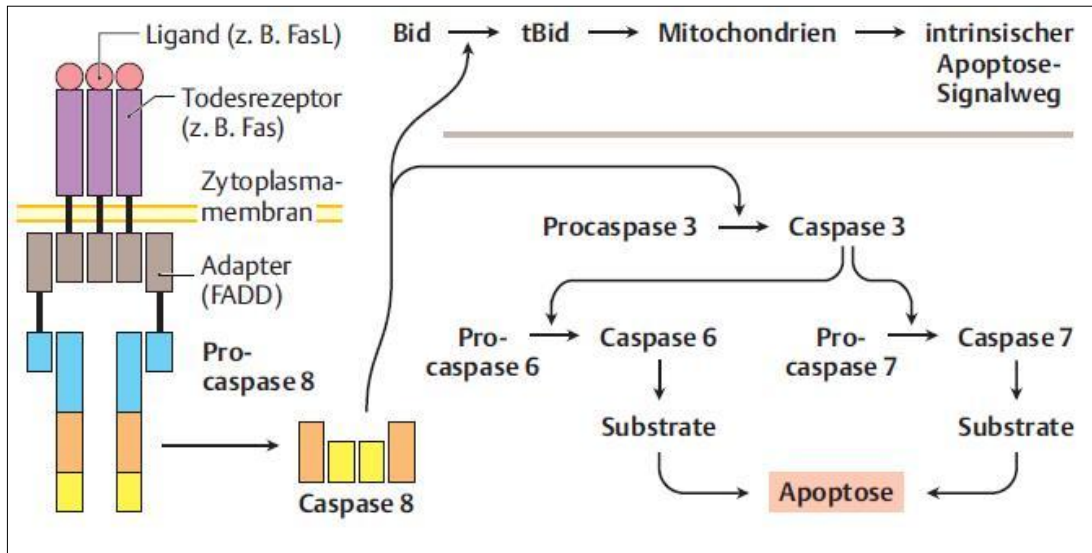


Abb. 1 : Der extrinsische Signalweg der Apoptose. Erläuterungen siehe Text.

(Roland Netzker: „Die Apoptose“, S. 517-521 in Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann, Duale Reihe Biochemie, 2006, Georg Thieme Verlag, Stuttgart)

Neben der direkten Rezeptorbindung können zahlreiche andere Stimuli Apoptose auslösen. Dazu gehören Wachstumsfaktorentzug, Strahlung, Hitzeschock, zytotoxische Substanzen, Wasserstoffperoxid, Ceramide, Bakterien, Viren und Toxine (Gulbins et al. 2000). Die dadurch ausgelöste Apoptose geht von der Zelle selbst aus. Am intrinsischen Apoptoseweg ist das Mitochondrium maßgeblich beteiligt. Neben der Änderung des Elektronentransportes, dem Verlust des transmembranären Membranpotentials der inneren Mitochondrienmembran und einem veränderten Redox-Potential der Zelle ist vor allem die Freisetzung apoptogener Substanzen aus dem Mitochondrium für den Tod der Zelle verantwortlich. Während der Apoptose kollabiert das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran. Dies induziert die Öffnung eines großen Kanals, des Permeability Transition Pore (PTP) (Halestrap et al. 2002; Zamzami et al. 1998). Das PTP wirkt als nonselektiver Kanal, der Ausgleichsströmungen der Ionen zulässt. Die Öffnung des PTP führt zu einem Kalzium-abhängigen Anstieg der Membranpermeabilität (Mitochondrial Permeability Transition (MPT))

Einleitung

(Tsujiimoto and Shimizu 2007). Es kommt zu einem Verlust des Protonengradienten und der Entkopplung der Atmungskette. Außerdem wird Volumen verschoben, da im Matrixraum des Mitochondriums eine Hyperosmolarität besteht. Durch den nun möglichen osmotischen Einstrom von Flüssigkeit in den Matrixraum weitet sich dieser aus. Die innere Mitochondrienmembran ist weit stärker gefaltet als die äußere Membran, dadurch kann die innere Membran diese Volumenänderung durch eine Entfaltung kompensieren. Die äußere Membran rupturiert. Dies führt zu einer Freisetzung von Caspase aktivierenden Faktoren, die sich im Intermembranraum befinden (Green and Reed 1998). Dazu gehören Cytochrom C und der Apoptosis-Inducing Factor (AIF). AIF ist ein mitochondriales Flavoprotein, das nach der Translokation zum Nukleus die Chromatinkondensation und die Fragmentierung der DNA bewirkt (Susin et al. 1999b; Miramar et al. 2001). Auch die Procaspasen 2 und 9 sind im Mitochondrium lokalisiert und werden jetzt ins Zytosol abgegeben (Susin et al. 1999a). Die Freisetzung dieser Substanzen aus dem Mitochondrium führt zur Bildung des Apoptosoms, einer radähnlichen Struktur aus sieben Apoptotic Protease Activating Factor 1 (APAF1) Molekülen, die durch Bindung von Cytochrom C aktiviert werden. Die Caspase Recruitment Domains (CARDs) des Apoptosoms führen zur Anlagerung von Procaspase 9, die durch Dimerisierung aktiviert wird (Denault and Salvesen 2002; Adams 2003; Hill et al. 2003; Pop et al. 2006).

Auch das endoplasmatische Retikulum (ER) ist an der Auslösung der intrinsischen Apoptose beteiligt. Das ER reguliert die Proteinsynthese, die Faltung und den Transport der Proteine. Änderungen der Kalzium-Homöostase und die Ansammlung fehlgefalteter Proteine im ER führen zu einem Prozess, der im Extremfall durch die Aktivierung von Caspase 12 Apoptose auslösen kann (Rao et al. 2004). Diese Stressantwort des ER wird Unfolded Protein Response (UPR) genannt. Die Ansammlung der nicht korrekt gefalteten Proteine im ER führt zu einem Netzwerk der Signaltransduktion, das adaptive Antworten auf diese Stressreaktionen koordiniert. Dazu zählen die Steigerung der Expression von Enzymen für die Proteinfaltung, um sie zu beschleunigen, die Induktion des Phospholipidsynthese, eine Hochregulation des ER-assoziierten Proteinabbaus,

Einleitung

um die Last der ungefalteten Proteine auf das ER zu mildern und eine antioxidative Reaktion. Bei verlängertem Stress bewirkt die UPR Apoptose, um die kranke Zelle zu eliminieren (Schroder 2006).

Die intrinsische Apoptoseauslösung wird durch Proteine der Bcl-2-Familie überwacht. Bcl-2 ist ein integrales Protein der inneren Mitochondrienmembran. (Hockenbery et al. 1990). Die Proteine der Bcl-2-Familie kontrollieren die Freisetzung von Cytochrom C und AIF. Dabei gibt es antiapoptotische und proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie. (Vaux et al. 1992; Tsujimoto and Shimizu 2000; Adams 2003; Ruiz-Vela et al. 2005; Hacker and Weber 2007). Auch andere Proteine können die Caspase-Aktivität regulieren, dazu gehören die Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) (Deveraux and Reed 1999), Hitzeschockproteine (Orrenius 2004), Das Protein Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) oder DIABLO (Direct IAP-binding Protein with Low PI) (Du et al. 2000; Shi 2002) und p53 (Lee and Bernstein 1995).

Die Apoptose ist ein sehr komplexer Prozess. Die genauere Erforschung dieses Prozesses stellt die Wissenschaft vor immer neue Herausforderungen. So wurde beispielsweise der Verlust des Zellvolumens lange als passiver Prozess verstanden. Zellvolumenregulation und Ionenbewegungen sind aber essentielle Bestandteile der Apoptose. Die apoptotischen Zellen erfahren eine dramatische Reduktion des Kalium- und Natriumspiegels (Bortner and Cidlowski 1998). Außerdem spielen Sphingomyelinasen eine Rolle in der Apoptose. Die Sphingomyelinasen spalten das in der Zellmembran vorkommende Sphingomyelin, es entsteht Phosphorylcholin und Ceramid. Ceramid induziert Apoptose, indem es Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran bildet, durch die Cytochrom C ins Zytosol gelangen kann (Ghafourifar et al. 1999). Ein bestimmter N-Typ Kaliumkanal wird durch Ceramide, aber auch durch die Aktivierung des CD95 Rezeptors gehemmt (Gulbins et al. 1997).

Einleitung

Eine Übersicht über die Prozesse des intrinsischen Signalwegs der Apoptose zeigt Abbildung 2.

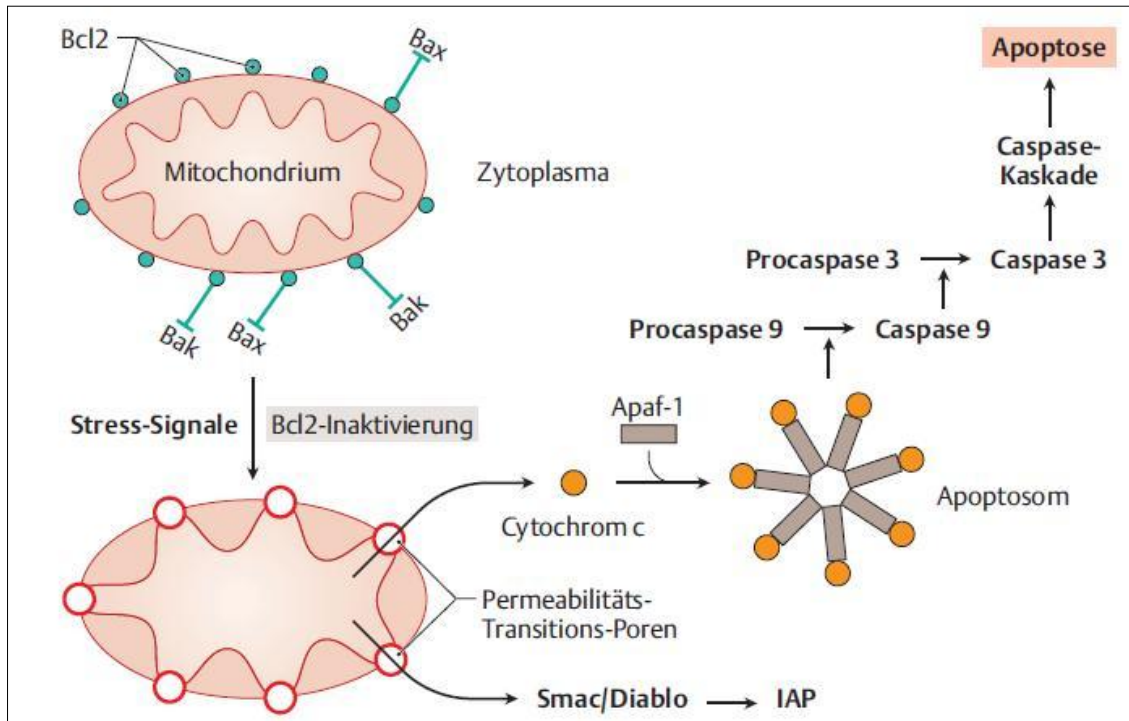


Abb. 2: Vereinfachte Übersicht über den intrinsischen Signalweg der Apoptose. Erläuterungen siehe Text.

(Roland Netzker: „Die Apoptose“, S. 517-521 in Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann, Duale Reihe Biochemie, 2006, Georg Thieme Verlag, Stuttgart)

1.2.2.3. Der Abbau der zugrunde gegangenen Zelle

Die apoptotische Zelle zerfällt in Apoptoskörperchen. Diese membranumschlossenen Vesikel werden von Nachbarzellen phagozytiert. Dafür müssen die Apoptoskörperchen von den Nachbarzellen erkannt werden. Es gibt zahlreiche Signale, die dies ermöglichen. Dazu zählen Lipide, Zucker und Proteine. Die am besten charakterisierte Membranveränderung ist die Translokation von PS. Sie geschieht vermutlich durch eine simultane Aktivierung der Kalzium-abhängigen Phospholipid-Scramblase und eine Hemmung der ATP-abhängigen Aminophospholipid-Translokase, die normalerweise für die Aufrechterhaltung der Phospholipidasymmetrie verantwortlich ist (Fadell

and Orrenius 2005). Die Rezeptoren, die die Signale der apoptotischen Zelle erkennen, sind zahlreich. Sie werden gewebe- und zelltypspezifisch gebraucht (Liu et al. 2006).

1.2.2.4. Möglichkeiten des Sterbens – Nekrose und Apoptose

Lange Zeit wurde die Apoptose als physiologische Art des Zellsterbens der pathologischen Nekrose gegenübergestellt. Die Apoptose ist ein Prozess, der eine aktive Teilnahme der sterbenden Zelle fordert. Beim programmierten Zelltod wird kein intrazelluläres Material freigesetzt. Somit wird auch keine Entzündungsreaktion ausgelöst. Im Gegensatz dazu ist die Nekrose ein passiver Prozess, der als Reaktion auf eine akute Zellschädigung erfolgt. Sie geht mit einer Desintegration der Zelle und einer unspezifischen oder spezifischen Immunantwort einher (Gulbins et al. 2000). Im Kontrast zu der mit Apoptose einhergehenden Schrumpfung der Zelle erfolgt bei der Nekrose eine Zellschwellung. Dies führt zu einer frühen Ruptur der Zellmembran mit einem Verlust von intrazellulären Komponenten. Auch die Organellen brechen auseinander und verlieren ihre Integrität. Die Phagozytose der Zellreste nekrotischer Zellen erfolgt erst wenn sich Entzündungszellen angesammelt haben. Neue Forschungen haben den starken Kontrast zwischen Nekrose und Apoptose jedoch geschwächt. Frühe Stadien der Apoptose und Nekrose weisen gemeinsame Mechanismen auf. Schlussendlich entscheidet die Aktivierung von Caspasen, ob der Zelltod phänotypisch als Apoptose oder Nekrose imponiert (Saraste and Pulkki 2000; Golstein and Kroemer 2007; Malhi et al. 2006; Papucci et al. 2004; Nieminen 2003).

1.3. Eryptose – Der suizidale Zelltod der Erythrozyten

1.3.1. Der Begriff der Eryptose

Das Leben der roten Blutkörperchen ist von verschiedenen Stresssituationen geprägt. Etwa einmal pro Minute erfahren sie in der Lunge oxidativen Stress, mehr als einmal pro Stunde werden sie im Nierenmark einem osmotischen Schock ausgesetzt und das Zwängen durch Kapillaren, deren Durchmesser kleiner ist als der der roten Blutkörperchen selbst, wirkt als weiterer Stressor. Ein Riss in der Erythrozytenmembran würde Hämoglobin freisetzen, das in den sauren Tubuli der Niere ausfällt, diese verschließt und damit zum Nierenversagen führen kann. Um diese Komplikation zu vermeiden, muss der Erythrozyt Mechanismen haben, abgebaut zu werden, ohne die intrazellulären Komponenten freizusetzen. Da die Blutkörperchen jedoch kern- und mitochondrienfreie Zellen sind, fehlen ihnen wichtige Elemente der Apoptosemaschinerie. Im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen können Erythrozyten *in vitro* ohne Serum überleben und sterben auch durch die Zugabe von Staurosporin nicht ab (Daugas et al. 2001). Deshalb nahm man lange Zeit an, dass die Blutkörperchen nicht zu einem suizidalen Zelltod, der mit der Apoptose kernhaltiger Zellen vergleichbar ist, fähig sind. Dennoch kann durch die Behandlung von Erythrozyten mit dem Kalzium-Ionophor Ionomycin ein Selbst-Zerstörungs-Prozess mit typischen Merkmalen apoptotischer Zellen ausgelöst werden, wie Zellschrumpfung, Mikrovesikulation der Plasmamembran und Exposition von Phosphatidylserin. *In vivo* wird dieser Prozess durch verschiedene Verletzungen der Erythrozyten einschließlich oxidativem Stress und osmotischer Zellschrumpfung getriggert (Lang et al. 2003b; Lang et al. 2006a). Die Zellschrumpfung erfolgt durch die Aktivierung des Kalzium-sensitiven „Gardos“ Kalium-Kanals, die Exposition von Phosphatidylserin durch eine Kalzium-sensitive Scramblase. Für die Veränderungen der Blutkörperchen nach der Behandlung mit Ionomycin werden Cystein-Proteasen benötigt, dabei handelt es sich im Gegensatz zur Apoptose kernhaltiger Zellen jedoch nicht um Caspasen, sondern um Calpaine. Da sich dieser Prozess des suizidalen Zelltods der Erythrozyten durch die fehlende Be-

teilung von Mitochondrien und fehlender Kondensation eines Nukleus grundlegend von der Apoptose kernhaltiger Zellen unterscheidet, wurde für den programmierten Zelltod der Erythrozyten der Begriff der Eryptose vorgeschlagen (Bratosin et al. 2001; Lang et al. 2005a).

1.3.2. Signalwege und Mechanismen der Eryptose

1.3.2.1. Ionenkanäle

Der suizidale Zelltod der Erythrozyten kann über verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Eine zentrale Rolle nehmen dabei Ionenkanäle ein.

Erythrozyten zeigen wenig Kanalaktivität, die höchste Permeabilität besteht für Chloridionen. Durch oxidativen Stress, eine durch hyperosmolare Umgebung ausgelöste Zellschrumpfung oder Chlorid-Entzug wird die Kationenleitfähigkeit jedoch stark gesteigert. Dies geschieht durch die Öffnung von unselektiven Kationenkanälen (Non Selectiv Cation Channels (NSC)). Die NSC sind sowohl für monovalente Kationen als auch für Kalziumionen durchlässig. Dabei dominiert die Leitfähigkeit für Kalzium (Duranton et al. 2002). Energiemangel führt im Erythrozyten zum Erliegen der Glutathionsynthese. Das Fehlen dieses wichtigen Antioxidanzes führt zu oxidativem Stress und somit ebenso zu einer Aktivierung der NSC. Das einströmende Kalzium leitet die weiteren Schritte der Eryptose ein. Es stimuliert die Scramblase und führt somit zum Zusammenbruch der PS-Asymmetrie (Lang et al. 2003a; Lang et al. 2005a). Der unselektive Kationenkanal kann durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) aktiviert werden (Kaestner and Bernhardt 2002). Sowohl intra- als auch extrazelluläres Chlorid wirkt hemmend auf die Kanäle. Auch Amilorid inhibiert den NSC (Lang et al. 2003b).

Ein weiterer wichtiger Ionenkanal der Erythrozyten ist der Gardos-Kanal. Dabei handelt es sich um einen Kalzium-abhängigen Kaliumkanal. Der Anstieg von intrazellulärem Kalzium führt zu einer Aktivierung der Gardos-Kanäle. Kalium strömt aus der Zelle. Zur Wahrung des elektrophysiologischen Gleichgewichts kommt es zu einem Ausstrom von Chloridionen durch Chlorid-Kanäle, die eben-

falls durch oxidativen Stress aktiviert werden und an der Regulation der Eryptose teilnehmen (Myssina et al. 2004; Lang et al. 2008; Foller et al. 2008b). Dieser Kaliumchloridverlust, dem osmotisch Wasser folgt, führt zu einer Schrumpfung der Zelle. Außerdem nimmt der Kaliumverlust an der Triggerung der Eryptose teil (Lang et al. 2003e; Lang et al. 2005a; Schneider et al. 2007).

1.3.2.2. Umverteilung der Phospholipide

Normalerweise unterliegen die Phospholipide der Erythrozytenmembran einer streng asymmetrischen Verteilung. PS kommt nahezu ausschließlich im inneren Leaflet der Membran vor. Dies wird durch einen ATP-abhängigen Transport gewährleistet (Seigneuret and Devaux 1984). Im Verlauf der Eryptose kommt es jedoch zu einer Verschiebung von PS in das äußere Leaflet der Membran. Die Exposition von PS resultiert aus der Inaktivierung einer ATP-abhängigen Aminophospholipid-Translokase sowie der Aktivierung einer Kalzium-sensitiven Scramblase (Lang et al. 2008; Woon et al. 1999). Die Lipid-Scramblase katalysiert die Umlagerung von Phospholipiden von einem Leaflet in der Membran in das andere Leaflet (Dekkers et al. 2002). Sie wird durch Kalzium und Ceramid aktiviert (Lang et al. 2006b).

1.3.2.3. Prostaglandine

Durch hyperosmotischen Schock oder den Entzug von Chloridionen wird im Erythrozyten eine Cyclooxygenase aktiviert. Die Cyclooxygenase bewirkt die Freisetzung von PGE_2 . PGE_2 aktiviert die unspezifischen Kationenkanäle, erhöht dadurch die zytosolische Kalziumkonzentration und stimuliert die Exposition von PS auf der Erythrozytenoberfläche. Durch Phospholipase A2-Inhibitoren und Cyclooxygenase-Inhibitoren wie beispielsweise Diclophenac wird die Bildung von Prostaglandinen gehemmt und somit die auf Chlorid-Entzug folgende PS-Exposition gemindert (Lang et al. 2005c). PGE_2 aktiviert außerdem Calpaine, Proteasen, die eine wichtige Rolle in der Eryptose spielen (Lang et al. 2005a; Lang et al. 2005c; Lang et al. 2006b). Auch der Gardos-Kanal kann durch PGE_2 aktiviert werden (Kaestner and Bernhardt 2002).

1.3.2.4. Platelet Activating Factor, Sphingomyelinasen und Ceramid

Zellschrumpfung induziert die Freisetzung von Platelet Activating Factor (PAF). Dies geschieht durch die Aktivierung der Phospholipase A₂. PAF ist ein aus Lipiden freigesetzter Mediator, der in der Regulation von Entzündung, Thrombose und der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt ist. PAF stimuliert den Zusammenbruch von Sphingomyelin durch Aktivierung von Sphingomyelinasen. Sphingomyelinasen setzen Ceramid frei, das auf der Erythrozyten-Oberfläche erscheint. Außerdem triggert PAF Zellschrumpfung und Phosphatidylserin-Exposition und wirkt auf die Gardos-Kanäle, indem es diese für den stimulierenden Effekt von Kalzium empfindlicher macht. Die durch PAF vermittelten Signalwege benötigen nicht zwingenderweise einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, sodass die Eryptose zumindest teilweise kalziumunabhängig ablaufen kann (Lang et al. 2005a; Lang et al. 2005d; Lang et al. 2006b; Föller et al. 2008).

Das durch die Sphingomyelinasen freigesetzte Ceramid spielt eine wichtige Rolle im suizidalen Zelltod. In der Apoptose kernhaltiger Zellen bilden Ceramide große Kanäle in der äußeren Mitochondrien-Membran, durch die die Inter-membranproteine freigesetzt werden können (Ghafourifar et al. 1999). Ceramid wirkt auch in der Eryptose als Mediator. Osmotischer Schock führt zum Auftreten von Ceramid auf der Erythrozyten-Oberfläche. Durch die Behandlung von Erythrozyten mit bakterieller Sphingomyelinase oder membrangängigem C6-Ceramid kann Eryptose getriggert werden. Durch genetischen oder pharmakologischen Knock-out der Sphingomyelinase wird die Eryptose signifikant vermindert (Lang et al. 2003c). Ceramid wirkt jedoch nicht über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Eryptose nach osmotischem Schock wird durch Kalziumentzug geschwächt, aber nicht gänzlich verhindert. Dies spricht dafür, dass es Mechanismen gibt, die Eryptose auslösen, ohne auf den Einstrom von Kalzium angewiesen zu sein. Der Mechanismus, über den Ceramid den suizidalen Zelltod induziert, ist bislang ungeklärt. Eventuell induziert Ceramid Lipidbewegungen im Membranbilayer (Lang et al. 2005a; Lang et al. 2006b). Die Sphingomyelinase, die Ceramid freisetzt, wird durch eine hohe Konzentration von Urea gehemmt. Durch die hohen Konzentrationen von

Chlorid und Urea im Nierenmark werden die Erythrozyten vor Eryptose geschützt und können in der hyperosmolaren Umgebung überleben. Dabei wirkt Chlorid über eine Minderung der Kationenleitfähigkeit, Urea übt seinen Effekt durch die Hemmung der Sphingomyelinase aus (Lang et al. 2004b; Lang et al. 2006b).

1.3.2.5. Calpaine und Caspasen

Ebenso wie in der Apoptose kernhaltiger Zellen spielen auch in der Eryptose Proteasen eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich jedoch weniger um Caspasen, als vielmehr um Proteasen aus der Familie der Calpaine. Die Stimulation der Calpaine führt zu einer Degradation des Zytoskeletts und initiiert die Vesikelbildung der Zellmembran. Bei den Calpainen handelt es sich um cysteininhaltige Endopeptidasen, die als inaktive Proenzyme in der Zelle existieren (Lang et al. 2008). Calpaine brauchen Kalzium, um ihre funktionell aktiven Formen zu erreichen und sind in viele Kalzium-abhängige Zellfunktionen involviert, darunter die Signaltransduktion, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Saez et al. 2006). Dabei existieren verschiedene Isoformen der Calpaine. Neben gewebespezifischen Isoformen kommen auch ubiquitäre Isoenzyme vor (Johnson and Guttman 1997). Eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt zu einer Translokation von Calpainen vom Zytosol zur Membran, wo die autokatalytische, proteolytische Aktivierung stattfindet. Die Calpaine benötigen Kalzium für ihre Aktivität. Außerdem müssen die aktiven Seiten der Calpaine im richtigen Redox-Zustand vorliegen. Somit sind Kalziumkonzentration und Redox-Status direkte Regulatoren der Calpain-vermittelten Proteolyse (Johnson and Guttman 1997). Calpaine spalten Substrate, die auch von Caspasen gespalten werden, wie beispielsweise Spektrin, Keratine, Aktin, Bax und die Proteinkinase C (PKC) (Miyoshi et al. 1996; Sorimachi et al. 1997; Suzuki et al. 2004). Außerdem sind Calpaine am Prozess der Zellschrumpfung beteiligt. Calpaine und Caspasen können interagieren, was zu einer gegenseitigen Aktivierung führt. Diese Interaktion wurde in Erythrozyten aber nicht beobachtet (Berg et al. 2001).

Einleitung

Die meisten Auslösemechanismen der Eryptose sind effektiv, ohne dass Caspasen aktiviert werden. Aber auch der Erythrozyt enthält Caspasen. Caspase 3 und 9, die aus Erythrozyten isoliert wurden, sind in vitro funktionell aktiv, im Blutkörperchen selbst werden sie durch Stimuli, die in kernhaltigen Zellen die Apoptose induzieren, jedoch nicht aktiviert. Caspase 9, APAF-1 und Cytochrom C konnten im Erythrozyt nicht nachgewiesen werden (Berg et al. 2001). Oxidativer Stress im Erythrozyten führt zur Aktivierung von Caspase 3. Die aktivierte Caspase 3 spaltet das N-terminale zytoplasmatische Ende des Bande-3-Proteins und stimulieren die PS-Exposition (Mandal et al. 2003; Föller et al. 2008). Außerdem führt sie zu einer gesteigerten Erythrophagozytose (Mandal et al. 2002).

1.3.2.6. weitere Mechanismen der Eryptose

Energiedepletion aktiviert die PKC. Durch die folgende Phosphorylierung von Membranproteinen kommt es zu einem weiteren Einstrom von Kalzium (Andrews et al. 2002; Lang et al. 2008), einer Verminderung des Zellvolumens und verstärkter Exposition von PS auf der Erythrozytenoberfläche (Klarl et al. 2006).

Die Eryptose kann, ähnlich wie die Apoptose, auch durch Signale, die von außerhalb der Zelle einwirken, ausgelöst werden. So bewirkt die Bindung von Proteinen an CD47 des Erythrozyten eine Verlagerung von PS auf das äußere Leaflet der Membran. Dabei kann es sich bei dem gebundenen Protein um Thrombospondin 1, den natürlichen Liganden, aber auch um einen Anti-CD47-Antikörper oder das CD47-Bindungs-Protein handeln (Head et al. 2005).

Eine Übersicht über die wichtigsten Mechanismen der Eryptose zeigt Abbildung 3.

Einleitung

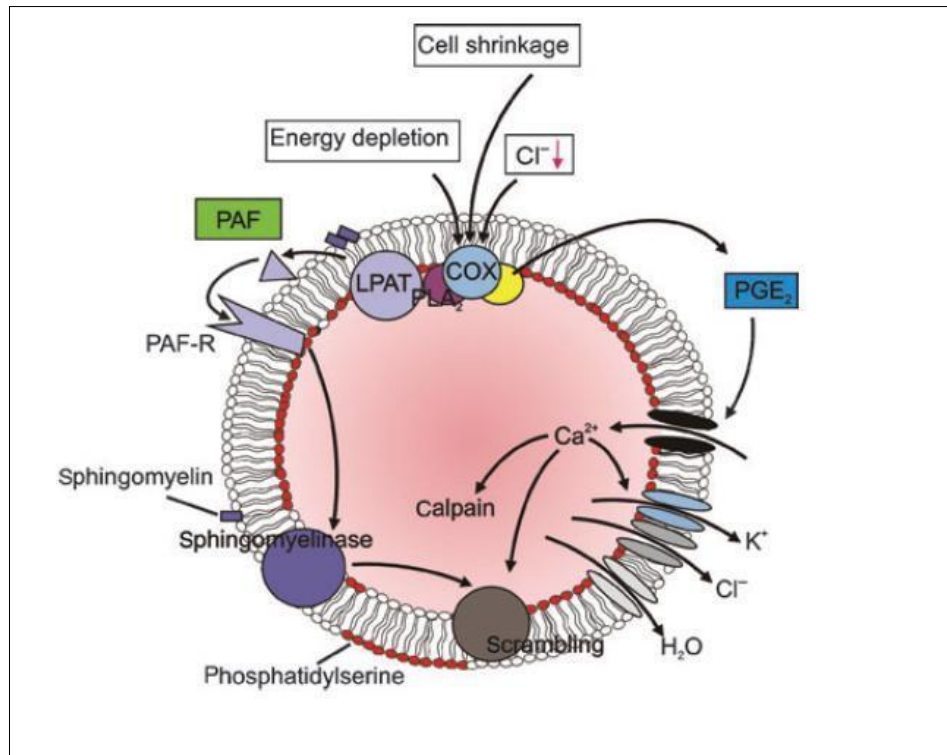


Abb. 3 : Mechanismen der Eryptose

Zellschrumpfung, Energieentzug oder der Verlust von Chlorid führen zur Bildung von PGE₂. PGE₂ aktiviert unspezifische Kationenkanäle, durch die Kalzium einströmt. Kalzium aktiviert den Gardos-Kanal, durch den Kalium die Zelle verlässt, was auch einen Verlust von Chlorid und Wasser bedeutet. Außerdem aktiviert Kalzium die Calpaine und bewirkt das Scrambling der Erythrozytenmembran. Gleichzeitig aktiviert PAF die Sphingomyelinase. Das freigesetzte Ceramid fördert das Scrambling der Membran.

COX: Cyclooxygenase; LPAT: Lyso-PAF acetyltransferase; PAF: Platelet activating factor; PAF-R: Platelet activating factor receptor; PGE₂: Prostaglandin E₂; PLA₂: Phospholipase A₂

(Lang et al. 2006b)

1.3.3. Relevanz und Bedeutung der Eryptose

Die Aktivierung des Gardos-Kanals in der Eryptose und der dadurch verursachte Volumenverlust der Zellen steht im Gegensatz zur Zellschwellung bei der Hämolyse. Eryptose dient dazu, der Hämolyse zuvorzukommen, und so die Schäden zu vermeiden, die die unkontrollierte Freisetzung der Intrazellulärsubstanzen verursachen würde (Lang et al. 2005a).

Einleitung

Der Prozess der Eryptose ist für den Mediziner durchaus relevant. Einige Erkrankungen gehen mit Veränderungen der Eryptose einher. So zeigen Erythrozyten von Patienten mit Sichelzellanämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel oder Thalassämie eine höhere Sensibilität auf oxidativen Stress und Glukose-Entzug. Dies führt auch in vivo zu einer verminderten Lebensspanne der roten Blutkörperchen und damit zu einer Anämie der Patienten (Lang et al. 2002; Lang et al. 2005a; Kempe et al. 2006). Ebenso kommt es bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie und dem myelodysplastischen Syndrom zu gesteigerter Eryptose (Basu et al. 2010). Patienten mit Eisenmangel, Sepsis, Hämolytisch-Urämischen-Syndrom (Lang et al. 2006c), Niereninsuffizienz, Malaria (Eda and Sherman 2002; Lang et al. 2004a), Phosphatmangel (Birka et al. 2004), Morbus Wilson (Lang et al. 2007) und Amyloiderkrankungen wie Morbus Alzheimer (Nicolay et al. 2007) zeigen ebenfalls eine gesteigerte Eryptose (Lang et al. 2008). Die gesteigerte Eryptose bei an Malaria erkrankten Zellen dient wohl dem Schutz des Organismus, da mit dem Tod der Zelle auch die intrazellulären Erreger absterben (Foller et al. 2009). Auch die Körpertemperatur hat einen Einfluss auf die Eryptose, sodass Hyperthermie häufig mit einer Anämie einhergeht (Foller et al. 2010). Das vom Bakterium *Listeria monocytogenes* produzierte Listeriolysin induziert Eryptose, was die Pathophysiologie der Infektion beeinflusst (Foller et al. 2007).

Erythrozyten von Neugeborenen zeigen eine erhöhte Eryptose (Hermle et al. 2006). Die erhöhte Umsatzrate der Erythrozyten erleichtert die Umstellung von fetalem auf adultes Hämoglobin.

Viele Medikamente, wie Antipsychotika (Akel et al. 2006) und Immunsuppressiva (Cyclosporin (Niemoeller et al. 2006a) und FTY 720 (Eberhard et al. 2010)) sowie Amphotericin B (Mahmud et al. 2009) führen zu einer gesteigerten Eryptose, was die Anämie als Nebenwirkung dieser Substanzen erklärt. Auch bei Vergiftungen mit Quecksilber (Eisele et al. 2006), Blei (Kempe et al. 2005), Peroxynitrit (Matarrese et al. 2005) und Aluminium (Niemoeller et al. 2006b) kann eine gesteigerte Eryptose beobachtet werden.

Bestimmte Diuretika können die Eryptose inhibieren (Lang et al. 2003d) und führen so zu einer Besserung der Anämie bei chronischen Nierenerkrankungen.

Einleitung

Auch andere Substanzen, wie Vitamin E, können gesteigerter Eryptose entgegenwirken (Corash et al. 1980). Katecholamine hemmen die Eryptose. Die Konzentrationen, die benötigt werden, um einen signifikanten Effekt zu erzielen, sind jedoch deutlich höher als die physiologisch vorkommenden Mengen der Hormone (Lang et al. 2005b; Lang et al. 2006b). Auch Stickoxide wie Stickstoffmonoxid (NO) hemmen die Eryptose (Nicolay et al. 2008).

Eryptose hat nicht nur Auswirkungen, die die Zahl der Erythrozyten betrifft, sondern ändert auch deren Eigenschaften. Die PS-Exposition führt zu einer gesteigerten Adhärenz an Endothelien. Somit zeigt sich die Rolle der Erythrozyten und deren suizidalem Tod bei der Blutgerinnung und der Entstehung von Thrombosen (Andrews and Low 1999; Clossé et al. 1999; Bonomini et al. 2002).

Die Lebenszeit der Erythrozyten wird durch Epo reguliert. Neben der Wirkung auf die Erythropoiese erhöht Epo die Lebensspanne zirkulierender Erythrozyten. Allerdings benötigen Zellen, die unter erhöhten Epo-Spiegeln gebildet werden, auch höhere Spiegel des Hormons, um zu überleben. Bei sinkenden Spiegeln werden die neu gebildeten Zellen schnell wieder eliminiert. Dieser Prozess, die sogenannte Neozytolyse, dient der raschen Normalisierung einer exzessiven Erythrozytenzahl, wie sie beispielsweise in großer Höhe oder bei einem Weltraumflug gebraucht wird (Rice and Alfrey 2005; Lang et al. 2008).

Mit der Senescence, der Eryptose und der Neozytolyse werden drei verschiedene Prozesse beschrieben, die sich jedoch in Teilen überschneiden. Die genaue Abgrenzung der Prozesse Senescence, Neozytolyse und Eryptose bleibt schwierig.

1.4. Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat und Ceramid

1.4.1. Eigenschaften von Sphingolipiden

Sphingolipide bestehen aus einem Sphingosinmolekül, das über seine Amino-
gruppe mit einer Fettsäure verbunden ist. Sphingolipide sind amphiphile Mole-
küle. Sie bilden integrale Bestandteile der Membran und zeigen wenig Bewe-
gung zwischen den Leaflets, es sei denn diese Bewegungen werden durch
spezifische Transportmechanismen vermittelt. Sphingolipide spielen eine es-
sentielle Rolle in eukaryoten Zellen. Zusammen mit Sterolen bilden Sphingolipi-
de dynamische Cluster in der Membran. Diese sogenannten Rafts (Bereiche in
der Membran, die reich an Sterolen und Phospholipiden sind) dienen der Regu-
lation der Signaltransduktion. Neben strukturellen Rollen in der Zellmembran
spielen einige Metabolite, einschließlich Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-
1-Phosphat (S1P) eine Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Differenzie-
rung, Senescence und Apoptose (Bartke and Hannun 2009).

Die chemische Struktur der bedeutendsten bioaktiven Sphingolipide zeigt
Abbildung 4.

Einleitung

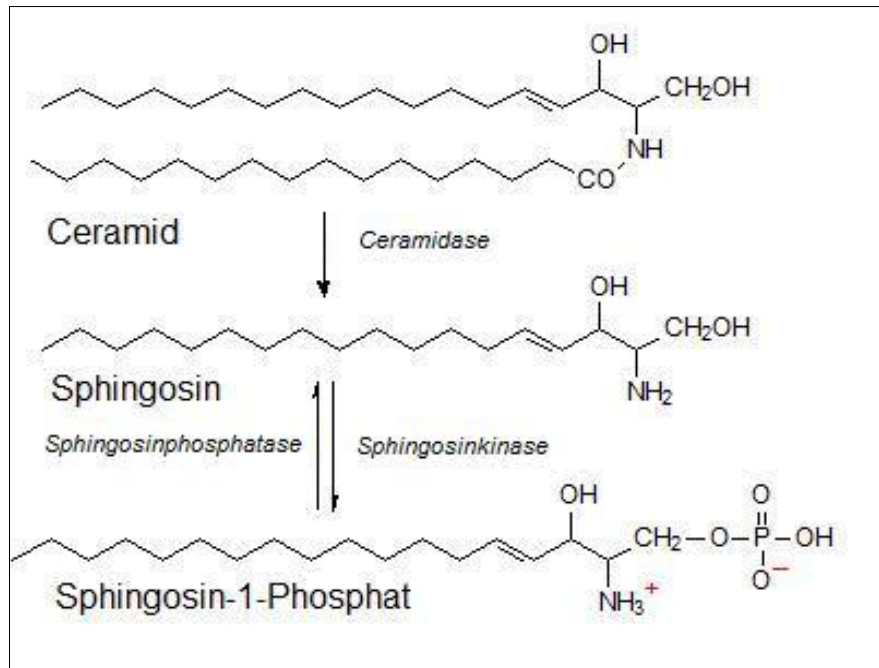


Abb. 4: Struktur wichtiger bioaktiver Sphingolipide.

Im menschlichen Körper kann die Fettsäure des Ceramids durch eine Ceramidase abgespalten werden. Es entsteht Sphingosin. Sphingosin-1-Phosphat entsteht durch Phosphorylierung aus Sphingosin. Diese Reaktion wird durch die Sphingosinkinase katalysiert. Die Sphingosinphosphatase katalysiert die Rückreaktion, in der aus Sphingosin-1-Phosphat wiederum Sphingosin entsteht.

(modifiziert nach Dr. William W. Christie: „The Lipid Library“)

URL: http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/sph_1_p/index.htm

Stand: 25.12.2011)

1.4.2. Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat als bioaktive Signalmoleküle

Neben ihrem Vorkommen in der Membran dienen Sphingolipide, vor allem Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat, auch als Signalmetabolite in der Regulation des Zellzyklus. Dabei wirken Ceramid und Sphingosin proapoptisch, Sphingosin-1-Phosphat schützt die Zelle und wirkt der Apoptose entgegen. Die Mechanismen, über die die Sphingolipide wirken, sind vielfältig und nicht im Einzelnen verstanden. Teilweise regulieren Sphingolipide die

Einleitung

Genexpression durch Modulation von Phosphorylierung und Acetylierung von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren, Transkriptionsunterdrücker oder Regulatoren des RNA-Splittings dienen (Patwardhan and Liu 2011). Als Regulator von Apoptose, Wachstum und Differenzierung von Zellen interagieren die Sphingolipide mit anderen Signalmolekülen wie NO (Perrotta et al. 2008). Bei Stress führt der Zusammenbruch von Sphingomyelin zu einer Erhöhung der Ceramid- und Sphingosin-Konzentrationen. Diese Konzentrationserhöhung führt zur Induktion der Apoptose (Woodcock 2006).

1.4.2.1. Sphingosin als Signalmolekül

Sphingosin wirkt ebenso wie Ceramid als Apoptose fördernder Mediator. Das Sphingolipid moduliert Proteinkinasen und andere Signalwege und kann damit beispielsweise Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren. Sphingosin spielt eine Rolle in der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts und der Endozytose (Bartke and Hannun 2009). Sphingosin beeinflusst die Eigenschaften von Membranen, indem es sie rigider macht und ihre Permeabilität erhöht. Es stabilisiert Gel-Domänen in der Membran und erhöht ihre Schmelztemperatur (Contreras et al. 2006). Ebenso wie Ceramid kann auch Sphingosin Kanäle in Membranen bilden. Im Gegensatz zu den Ceramidkanälen, die lange Öffnungszeiten und Durchmesser bis zu 10 nm aufweisen, haben die von Sphingosin gebildeten Kanäle jedoch kurze Öffnungszeiten. Die Größe der gebildeten Kanäle ist von der Sphingosin-Konzentration abhängig, beträgt aber maximal 2 nm. Damit sind die Sphingosinkanäle nicht groß genug, um die Passage von proapoptotischen Proteinen zu erlauben (Siskind et al. 2005). Sphingosin hat einen direkten Einfluss auf Signalkinasen. Es ist ein potenter Inhibitor der PKC (Smith et al. 2000). Sphingosin moduliert die Wirkung anderer Kinasen (McDonald et al. 1991; Bokoch et al. 1998; Cuvillier 2002) und verstärkt die Signalisierung des Epidemial-Growth-Factor-Rezeptors (Davis et al. 1988). Über die Aktivierung der Sphingosine-Dependent-Kinase 1 (SDK1) bewirkt Sphingosin die Phosphorylierung von Mitgliedern der 14-3-3-Proteinfamilie (Megidish et al. 1998; Woodcock et al. 2003). Diese Proteine sind normalerweise als Dimere vorhanden und schützen vor Apoptose, indem sie proapoptotische Mediatoren der

Bcl-2-Familie kontrollieren (Xing et al. 2000; Bridges and Moorhead 2005). Diese Funktion wird durch die Phosphorylierung aufgehoben. Außerdem aktiviert Sphingosin die Proteinkinase A (PKA). Diese Proteinkinase sitzt an der Plasmamembran und könnte der primäre Effektor der Sphingosin-induzierten Apoptose sein (Ma et al. 2005; Woodcock 2006).

1.4.2.2. Sphingosin-1-Phosphat als Signalmolekül

S1P ist ein Mediator, der das Überleben der Zelle fördert und damit im Gegensatz zum apoptogenen Ceramid steht. S1P wird aus Sphingosin durch die Sphingosinkinase (SK) 1 und SK2 synthetisiert. Die intrazelluläre S1P Konzentration wird durch die Aktivierung von SK reguliert. S1P kann entweder intrazellulär als Second Messenger fungieren, oder es wird aus der Zelle sezerniert und wirkt extrazellulär durch die Bindung an S1P-Rezeptoren. Diese Bindung kann autokrin oder parakrin erfolgen (Rosen and Goetzl 2005; Takabe et al. 2008). Dabei bindet S1P an G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Bartke and Hannun 2009; Spiegel and Milstien 2003). Das Sphingolipid ist ein wichtiger Regulator verschiedener Immunfunktionen, wie der Lymphozytenzirkulation, Antigenpräsentation und T-Zell-Entwicklung (Graler 2010). S1P und seine Rezeptoren werden für die Emigration von Thymozyten aus dem Thymus, die Wanderung von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe und die Migration von B-Zellen in Milzfollikel gebraucht (Goetzl and Rosen 2004; Goetzl et al. 2004). Außerdem ist S1P in die Regulierung von Proliferation, Zellwachstum, Zellüberleben, Zellmigration, Entzündung, Angiogenese und Vaskulogenese involviert. Die Bildung von S1P aus Sphingosin wird durch Wachstumsfaktoren wie den Epidermal-Growth-Factor, Platelet-Derived-Growth-Factor und durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α und Interleukin (IL) 1 aktiviert (Bartke and Hannun 2009). Auf autokrine Weise fördert S1P die Mastzell-Degradation und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (Rosen and Goetzl 2005; Weigert et al. 2009). Außerdem hat S1P einen Einfluss auf wichtige Neuronen-spezifische Funktionen, wie die Freisetzung von Neurotransmittern (Okada et al. 2009), ist an der

Acrosomenreaktion, die zur Befruchtung benötigt wird, beteiligt (Suhaiman et al. 2010) und im High Density Lipoprotein (HDL) enthalten (Tolle et al. 2010).

1.4.3. Die Rolle der Sphingolipide im Erythrozyten

In Erythrozyten konnte die Aktivität der alkalischen Ceramidasen nachgewiesen werden (Xu et al. 2010). Es gibt 5 verschiedene Ceramidasen (eine saure, eine neutrale und drei alkalische Ceramidasen) die Ceramid hydrolysieren und damit Sphingosin bilden. Das im Blut vorkommende S1P wird durch Erythrozyten phosphoryliert, gespeichert und transportiert. Die Freisetzung aus dem Blutkörperchen ist ein kontrollierter Prozess, der in plasma- oder serumfreien Medium nicht beobachtet werden kann. HDL und das Serumalbumin sind Trigger für die Freisetzung des S1P aus Erythrozyten (Bode et al. 2010). Erythrozyten dienen als Puffersystem von S1P im Blut und halten so den S1P-Plasmaspiegel konstant. Sie nehmen S1P auf, speichern es und schützen es vor Abbau (Hanel et al. 2007). Erythrozyten haben zwar eine geringe SK-Aktivität, aber ihnen fehlen die S1P-abbauenden Enzyme S1P-Lyase und S1P-Phosphohydrolase. Dies erlaubt es den Blutkörperchen, hohe Konzentrationen von S1P aufzubauen (Yang et al. 1999; Ito et al. 2007). Der Export von S1P erfolgt vermutlich über einen ATP-abhängigen Transporter (Kobayashi et al. 2009). Neben den Erythrozyten speichern auch Thrombozyten S1P und geben es ans Blut ab (Yang et al. 1999).

Fügt man Ceramid von außen in die Membran der Erythrozyten ein, erfolgen Membranveränderungen, die zur Mikrovesikulation führen (Allan and Michell 1977). Ceramid, das Molekül im Zentrum des Sphingolipidmetabolismus, spielt eine Rolle in der Eryptose. Der bei osmotischer Zellschrumpfung freigesetzte PAF stimuliert den Zusammenbruch von Sphingomyelin und damit die Freisetzung von Ceramid. Ceramid erhöht die Sensitivität der Erythrozyten auf den Eryptose auslösenden Effekt einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration (Lang et al. 2003c; Lang et al. 2010). Die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase und damit die Freisetzung von Ceramid im Blut ist von

Einleitung

der Funktion von Serinproteasen abhängig (Mansat et al. 1997), was auch pathophysiologische Bedeutung hat, da *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten einen veränderten Serin-Stoffwechsel zeigen (Elabbadi et al. 1997).

1.5. Spermin und Spermidin

1.5.1. Eigenschaften, Vorkommen und Metabolismus von Spermin und Spermidin

Spermin und Spermidin sind biogene Polyamine. Spermin verleiht Sperma den charakteristischen Geruch und Geschmack, sowohl Spermin als auch Spermidin kommen aber ubiquitär im Körper vor. Abbildung 5 zeigt die chemische Struktur von Spermin und Spermidin.

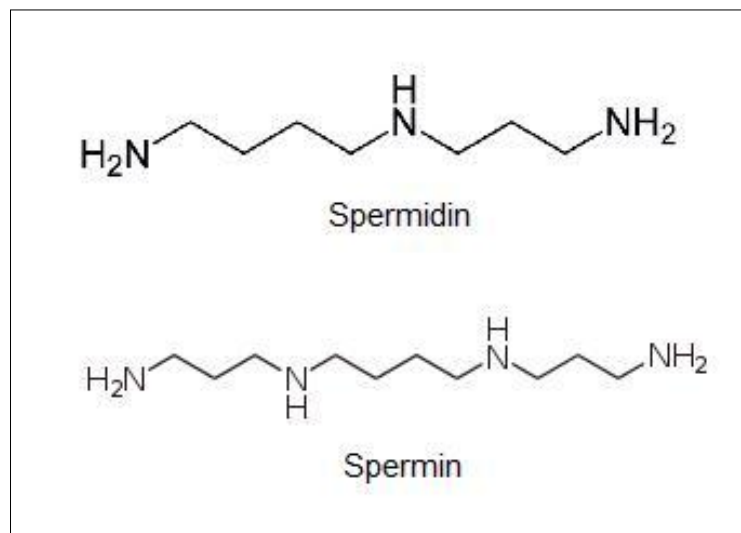


Abb. 5: chemische Struktur von Spermin und Spermidin.
(eigene Darstellung)

Unter physiologischen Bedingungen liegen die Polyamine als Kationen vor. Ein Großteil der Polyamine in der Zelle bildet einen Komplex mit RNA. Ein weiterer Anteil ist an die DNA gebunden, außerdem binden Polyamine an ATP. Der geringste Anteil von Spermin und Spermidin liegt frei in der Zelle vor (Watanabe et al. 1991; Miyamoto et al. 1993; Igarashi and Kashiwagi 2010).

1.5.2. Wirkung der Polyamine

Polyamine haben verschiedene, teils sogar gegenteilige Wirkungen auf Zellen. Die Struktur von RNA wird durch die Bindung von Polyaminen verändert. Dadurch können Polyamine Prozesse beeinflussen, an denen RNA beteiligt ist. Sie können die Proteinsynthese auf Ebene der Translation erhöhen (Igarashi and Kashiwagi 2010). Spermin stimuliert die Initiator-tRNA der Proteinsynthese dazu, an 55S Ribosomen zu binden. Dadurch wird die Bildung des Initiator-Komplexes der Proteinsynthese begünstigt (Christian et al. 2010). Auch die Zusammenlagerung der Untereinheiten der Ribosomen wird durch Polyamine ermöglicht (Tabor and Tabor 1984).

Polyamine spielen eine Rolle in der Initiierung der DNA-Synthese sowie in der Bewegung der Replikationsgabel. In vitro führen Spermin und Spermidin zur Ausfällung der DNA. Beide Moleküle sind in der Lage, die DNA vor Denaturierung, beispielsweise durch Hitze, zu schützen (Tabor and Tabor 1984).

Polyamine können die Strukturform der DNA verändern. So bewirken Polyamine eine Konversion von der B- zur Z-Form der DNA. Außerdem können Polyamine die Kondensation von Chromosomen bewirken (Igarashi and Kashiwagi 2010). Spermidin ist in der Lage, die Expression von Genen zu regulieren (Chattopadhyay et al. 2009).

Die biogenen Polyamine sind für die Zellproliferation notwendig und spielen eine Rolle in der Zelldifferenzierung (Gavin et al. 2004). Ohne Polyamine wird das Fortschreiten des Zellzyklus hinausgezögert. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine Hemmung der DNA-Synthese (Igarashi and Kashiwagi 2010). In vielen Tumorgeweben ist die Polyamin-Konzentration erhöht. Dieser veränderte Spermin-Metabolismus könnte Zielpunkt neuer Therapieoptionen werden (Marton and Pegg 1995; Wallace and Fraser 2003; Babbar et al. 2006; Casero and Marton 2007; Amendola et al. 2009; Tsujinaka et al. 2011; Yang et al. 2011).

Polyamine sind wichtige Faktoren in der Kontrolle des apoptotischen Zelltods. In der Apoptose wurde sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der Polyaminspiegel in der Zelle beobachtet. Ein Anstieg der intrazellulären Poly-

Einleitung

amine kann, zumindest in manchen Zellsystemen, Apoptose auslösen. Aus den Polyaminen können zytotoxische Produkte wie Hydrogen-Peroxid und Aldehyde gebildet werden, die zum Zelltod führen (Averill-Bates et al. 2008). Durch den Abbau von Spermin durch die Spermin-Oxidase entstehen Spermidin, Wasserstoffperoxid und Aldehyd-3-Aminopropanal. Die Spermin-Oxidase spielt eine Rolle in verschiedenen zellulären Funktionen, wie der Apoptose, dem Ansprechen auf Stressreize, Tumorentstehung und Medikamenten-Ansprechen (Casero and Marton 2007; Cervelli et al. 2012). Allerdings scheint ein Abfall der Polyaminspiegel während der Apoptose häufiger zu sein als ein Anstieg. Dies lässt annehmen, dass die Polyamine eine protektive Rolle haben und vor Apoptose schützen. Wie genau sie diese protektive Funktion ausüben, ist bisher unklar (Schipper et al. 2000). Intrazelluläre Polyamine können die Exposition von Phosphatidylserin auf der Plasmamembran während der Apoptose modulieren (Bratton et al. 1999). Ein Entzug von Polyaminen führt wahrscheinlich zur Stimulation des Mitochondrien-vermittelten Apoptose-Weges (Nitta et al. 2002; Igarashi and Kashiwagi 2010).

Spermin und Spermidin beeinflussen Ionenkanäle, dazu zählen Kaliumkanäle, der Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) –Rezeptor, der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) -Rezeptor und Kainat-Rezeptoren (Williams 1997). Intrazelluläres Spermin blockiert die Ionenkanal-Pore des einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanals (inward rectifying Kalium-Kanal - Kir-Kanal), der das Membranpotential sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen kontrolliert. Diese Kanäle ermöglichen bei negativem Membranpotential den Einstrom von Kalium in die Zelle. Übersteigt das Membranpotential das Kaliumgleichgewichtspotential, wird der Kaliumausstrom von den Kanälen behindert. Somit dienen sie der Wahrung des Membranpotentials. Ein Teil des Mechanismus dieser Einwärts-Gleichrichtung des Kanals ist der Block durch intrazelluläres Magnesium. Magnesium verursacht eine sofortige Blockierung des Kanals. Es gibt jedoch eine zusätzliche Komponente der Einwärts-Gleichrichtung, die durch eine langsame Abnahme der Leitfähigkeit bei depolarisiertem Membranpotential charakterisiert ist. Dafür sind die intrazellulären Faktoren Spermin und Spermidin verantwortlich (Ficker

et al. 1994; Lopatin et al. 1994; Williams 1997; Kurata et al. 2006). Der Kir-Kanal ist sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen essentiell für die Wahrung des Gleichgewichtspotentials. Somit spielen die biogenen Amine eine wichtige Rolle in der Elektrophysiologie der Zellen (Ficker et al. 1994; Lopatin et al. 1994; Williams 1997; Kurata et al. 2006).

AMPA-Rezeptoren sind Glutamat-Rezeptoren. Es handelt sich um heterodimere Kationenkanäle, die aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Sie kommen hauptsächlich in Neuronen vor und sind verantwortlich für synaptische Antworten. Ein Teil der AMPA-Rezeptoren fungiert als Kalzium-durchlässige Kationenkanäle. Sie lassen den Kalziumeinstrom in die Zelle zu, ein Ausstrom von Kalzium durch die Kanäle ist nicht möglich. Für diese Einwärts-Gleichrichtung der Kanäle sind Polyamine verantwortlich. Dabei agieren die Polyamine wahrscheinlich durch Blockierung der Pore bei depolarisierter Membran. Dadurch wird der Strom von Natrium und Kalzium verhindert (Donevan and Rogawski 1995; Isa et al. 1995; Koh et al. 1995; Williams 1997). Bei dieser Blockade der AMPA-Rezeptoren binden die Polyamine an zwei Stellen des Kanals (Washburn and Dingledine 1996).

1.5.3. Spermin und Spermidin in Erythrozyten

Die Konzentration der Polyamine in den Erythrozyten nimmt mit dem Alter der Zellen ab. In 10^9 Erythrozyten liegen etwa 0,605 nmol Spermin vor, von Spermidin lassen sich ca. 1,475 nmol pro 10^9 Zellen nachweisen (Cooper et al. 1976). Im Blutplasma beträgt die physiologische Spermin-Konzentration 0,14 μ M (Baylin et al. 1980), die Konzentration von Spermidin im Blutplasma liegt unter 0,12 nmol/ml (Cooper et al. 1976). Somit stehen die Erythrozyten in dauerhaftem Kontakt zu geringen Konzentrationen der Polyamine.

Polyamine haben vielfältige Auswirkungen auf den Erythrozyten. In hämatopoietischen Stammzellen induziert Spermin die Apoptose (Schiller et al. 2005). Intrazelluläre Polyamine stabilisieren das Membran-Skelett der Erythrozyten (Ballas et al. 1983). Spermin inhibiert das Kalzium-induzierte

Einleitung

Phospholipid-Scrambling der Erythrozyten-Membran, begünstigt aber die Bildung von Mikrovesikeln (Bucki et al. 1998). Die Transbilayer-Bewegung der Phospholipide in der Erythrozytenmembran wird durch Spermin und Spermidin gehemmt (Bratton 1994). Polyamine inhibieren die Adenylat-Cyclase in Erythrozyten-Membranen und beeinflussen somit die an cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) gebundene Signalkaskade (Khan et al. 1990). Bei murinen Erythroleukämie-Zellen ist eine Spermin-Aufnahme für die Hämoglobin-Synthese der Zelle notwendig (Clément et al. 1995).

Zellschwellung stimuliert in Erythrozyten den Kalium-Chlorid-Kotransport. Diesem Kaliumchlorid folgt osmotisch Wasser, so dass die Zelle schrumpft. Dieser Kalium-Chlorid-Kotransport wird durch Spermin gehemmt (Sachs 1994).

In Erythrozyten führt die Aktivierung eines Kalzium-permeablen Kationenkanals zur Eryptose. Es existieren zwei Typen von unselektiven Kationenkanälen, die zum Kalziumeinstrom führen: spannungsabhängige und nichtspannungsabhängige Kanäle. Die nichtspannungsabhängigen Kanäle werden durch Oxidation, osmotischen Schock und Energieentzug aktiviert. Dabei handelt es sich um TRPC 6-Kanäle (Foller et al. 2008a). Allerdings existieren auch AMPA-Rezeptoren in humanen Erythrozyten. Der AMPA-Rezeptor-Antagonist 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid (NBQX), wie Spermin und Spermidin ein Polyamin, hemmt in mikromolaren Konzentrationen die Kationenleitfähigkeit der Erythrozyten und die Eryptose. Die typischen durch Stressmedien wie chloridfreie oder glukosefreie Lösung ausgelösten Eryptose-Merkmale, intrazellulärer Kalziumanstieg, Abnahme der Zellgröße und Anstieg der Annexin-V-Bindung als Zeichen für die PS-Exposition werden durch NBQX signifikant geschwächt (Föllner et al. 2009).

Der Erythrozyt, der keinen Zellkern und damit keine DNA besitzt und nicht zur Proteinsynthese fähig ist, ist ein gutes System, um die von Nukleinsäuren unabhängige Wirkung der biogenen Amine zu untersuchen. Die Untersuchung des Einflusses von Spermin und Spermidin auf den suizidalen Zelltod der Erythrozyten verspricht Kenntnisse über die Wirkungen von Polyaminen, die weder von Nukleinsäuren noch von Mitochondrien abhängig sind.

1.6. Zielsetzung der Doktorarbeit

Ceramid, Sphingosin und S1P sind an der Regulation der Apoptose kernhaltiger Zellen beteiligt. Ceramid wirkt über das Mitochondrium, indem es Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran bildet, durch die Cytochrom C ins Zytosol gelangen kann. Gleichzeitig beeinflusst Ceramid aber auch die Bilayer-Eigenschaften der Zellmembran und kann somit auch einen Effekt auf Mitochondrien-freie Zellen ausüben. Im Verlauf der Eryptose schrumpft die Zelle. Diese Zellschrumpfung bewirkt die Bildung von PAF. Dieses Molekül wiederum induziert den Zusammenbruch von Sphingomyelin und die Freisetzung von Ceramid. Von außen zugegebenes oder durch Zugabe von Sphingomyelinasen erzeugtes Ceramid kann Eryptose auslösen. Da auch Sphingosin und S1P eine Rolle in der Apoptose spielen (S1P wirkt antiapoptotisch, Sphingosin fördert die Apoptose), ist es möglich, dass diese Moleküle auch Auswirkungen auf den suizidalen Zelltod der Erythrozyten haben. Diese Annahme wird von der Beobachtung unterstützt, dass andere Lipide, wie die Lipoproteine der Bakterien oder die mit S1P verwandte Lysophosphatidsäure, eine Exposition von Phosphatidylserin auf der Erythrozytenoberfläche auslösen, was ein typisches Zeichen für die Eryptose der Erythrozyten darstellt.

Auch Spermin und Spermidin haben vielfältige Wirkungen auf den Organismus. Sie beeinflussen die Apoptose kernhaltiger Zellen und modifizieren Ionenkanäle, die auch von Erythrozyten exprimiert werden. Daher ist eine Beeinflussung des suizidalen Zelltods der Erythrozyten durch die biogenen Polyamine vorstellbar.

Die Versuche, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, sollen aufdecken, ob die Sphingolipide und Ceramid-Metabolite Sphingosin und S1P sowie die biogenen Polyamine Spermin und Spermidin den suizidalen Zelltod der Erythrozyten beeinflussen. Als Indikator für die Eryptose wurde die Größe der Zellen, ihr Kalziumgehalt und die PS-Exposition gemessen.

2. **Material und Methoden**

2.1. Erythrozyten

Am Ende des Reifungsprozesses der Erythrozyten stehen Zellen, die perfekt für ihre Aufgabe, den Sauerstofftransport im Blut, geeignet sind. Die ausdifferenzierten Erythrozyten sind jedoch nicht mehr teilungsfähig. Daher ist keine Vermehrung in Kultur möglich und die in den Experimenten verwendeten Erythrozyten müssen von Spendern gewonnen werden. Für die Experimente wurden ausschließlich Erythrozytenkonzentrate von gesunden Spendern verwendet, die die Blutbank Tübingen zur Verfügung stellte. Die Ethik-Kommission der Universität Tübingen genehmigte die experimentelle Studie und den Gewinn der Erythrozyten (Projekt-Nummer: 184/2003B01).

2.2. Verwendete Lösungen

2.2.1. Ringer-Lösung

Da Erythrozyten nur über wenige Stoffwechselwege verfügen, stellen sie auch keine hohen Ansprüche an das Medium, in dem sie gelöst werden. Sie benötigen lediglich ein Milieu, das es ihnen ermöglicht, ihre Elektrolythomöostase aufrecht zu erhalten und das ihnen Glukose als Energieträger für die Glykolyse liefert. Diese Voraussetzungen werden durch eine einfache Ringerlösung erfüllt. Diese Lösung diente bei allen Experimenten als Lösungsmittel und als Kontrollsubstanz, da Erythrozyten in Ringer-Lösung nur eine geringe Rate von spontaner Eryptose zeigen. Um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen wurde die Lösung mit der benötigten Menge Natriumhydroxid versetzt und 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes) als Puffersubstanz zugesetzt. Die Osmolarität der Lösung betrug 300 mosmol/l, was mittels eines Osmometers überprüft wurde.

Die Zusammensetzung der Lösung zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Ringer-Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO₄	1,2
CaCl₂	1
Glucose	5
Hepes	32,3
NaOH	nach Bedarf

NaCl: Natriumchlorid; KCl: Kaliumchlorid; MgSO₄: Magnesiumsulfat; CaCl₂: Kalziumchlorid; Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NaOH: Natriumhydroxid

2.2.2. Glukosefreie Lösung

Um Eryptose auszulösen, können verschiedene Stressoren eingesetzt werden. Hyperosmolarität, das Fehlen von Chlorid oder Energiedepletion können als Verursacher des erythrozytären Zelltods dienen. In den Experimenten, in denen gezielt Eryptose ausgelöst werden sollte, wurde eine glukosefreie Elektrolyt lösung verwendet, die ansonsten der Zusammensetzung der Ringer-Lösung entspricht. Der pH-Wert dieser Lösung wurde ebenfalls auf 7,4 eingestellt, die Osmolarität betrug 300 mosmol/l.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten glukosefreien Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO₄	1,2
CaCl₂	1
Hepes	32,3
NaOH	nach Bedarf

NaCl: Natriumchlorid; KCl: Kaliumchlorid; MgSO₄:Magnesiumsulfat; CaCl₂: Kalziumchlorid; Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NaOH: Natriumhydroxid

2.2.3. Chloridfreie Lösung

Auch das Fehlen von Chlorid in der Lösung, in der die Erythrozyten suspendiert werden, kann Eryptose auslösen. Die Zusammensetzung ähnelt der der Ringer-Lösung, wobei das Chlorid durch Glukonat ersetzt ist. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt, die Osmolarität betrug 300mosmol/l.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten chloridfreien Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaGluc	125
KGluc	5
MgSO₄	1,2
CaGluc₂	1
Glucose	5
Hepes	32,3
NaOH	nach Bedarf

NaGluc: Natriumglukonat; KGluc: Kaliumglukonat; MgSO₄:Magnesiumsulfat; CaGluc: Kalziumglukonat; Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NaOH: Natriumhydroxid

2.2.4. Hyperosmolare Lösung

Eine hyperosmolare Umgebung bedeutet Stress für die Erythrozyten. Sie verlieren Wasser und die Zelle schrumpft. Dieser osmotische Schock kann Eryptose auslösen. Um eine hyperosmolare Lösung von 700 mosmol/l zu schaffen, wurde der Ringerlösung Saccharose in der entsprechenden Menge hinzugefügt. Die Osmolarität wurde mittels Osmometer überprüft. Die Inkubationszeit in der hyperosmolaren Lösung betrug 6 Stunden.

2.2.5. Annexin-Waschpuffer

Für die Markierung der Phosphatidylserin-Exposition mittels Annexin wird Annexin-Waschpuffer benötigt, der eine höhere Kalzium-Konzentration aufweist als Ringer-Lösung. Ansonsten entspricht die Zusammensetzung der Ringer-Lösung.

Tabelle 4: Zusammensetzung des verwendeten Annexin-Waschpuffers

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO₄	1,2
CaCl₂	5
Glucose	5
Hepes	32,3
NaOH	nach Bedarf

NaCl: Natriumchlorid; KCl: Kaliumchlorid; MgSO₄:Magnesiumsulfat; CaCl₂: Kalziumchlorid; Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NaOH: Natriumhydroxid

2.2.6. Pipettenlösung

Für Patch-Clamp-Experimente wird eine Pipettenlösung benötigt. Diese Lösung wird in die Patch-Pipette gefüllt. Die Zusammensetzung der Lösung zeigt Tabelle 5, der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Pipettenlösung

Substanz	Konzentration (mM)
Natriumgluconat	125
NaCl	10
MgATP	1
EGTA	1
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

MgATP: Magnesium-Adenosintri-phosphat; EGTA=ethylene-glycol-tetraacetic.acid (Kalzium-Chelatbildner); Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NaOH: Natriumhydroxid

2.2.7. Badlösung

Für die Patch-Clamp-Experimente wird eine Badlösung benötigt. In dieser Lösung wurden die Erythrozyten suspensiert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe von NaOH auf 7,4 eingestellt. Je nach Experiment wurde zusätzlich Sphingosin oder S1P in einer Konzentration von 10 µM zugegeben.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Badlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	145
KCl	5
D-Glukose	5
MgCl₂	2
CaCl₂	1
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

NaCl: Natriumchlorid; KCl: Kaliumchlorid; MgCl₂: Magnesiumchlorid; CaCl₂: Kalziumchlorid; Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NaOH: Natriumhydroxid

2.3. Verwendete Substanzen

2.3.1. Sphingosin

Das in den Experimenten verwendete D-Sphingosin wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, bezogen. Sphingosin wurde in Ethanol gelöst, so dass eine 10 mM Lösung entstand. Von dieser Ausgangslösung wurde den Proben die entsprechende Menge hinzugefügt, um die gewünschten Endkonzentrationen zu erhalten.

2.3.2. Sphingosin-1-Phosphat

Das eingesetzte Sphingosin-1-Phosphat stammt von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland. Es wurde 1 mg Sphingosin in 1 ml Methanol gelöst, so dass eine 2,635 mM Lösung entstand. Um die gewünschten Endkonzentrationen in den Probenansätzen zu erreichen, wurde die entsprechende Menge dieser Ausgangslösung zugesetzt.

2.3.3. K6PC-5

K6PC-5 (N-(1,3-dihydroxyisopropyl)-2-hexyl-3-oxo-decanamide) ist ein Ceramidderivat, das die Sphingosinkinase aktiviert und somit die Umwandlung von Sphingosin zu S1P fördert. Das in den Experimenten verwendete K6PC-5 stammt von der Firma NeoPharm, DaeJeon, Südkorea und wurde in Konzentrationen von 1 und 10 μ M zugesetzt.

2.3.4. Spermin und Spermidin

Spermin und Spermidin wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, bezogen. Beide Substanzen sind gut wasserlöslich und wurden in Ringerlösung, bei Bedarf in glukose- bzw. chloridfreier Lösung gelöst

Material und Methoden

und den Ansätzen zugegeben, so dass sich Endkonzentrationen von 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml ergaben.

2.4. Methoden

2.4.1. Durchflusszytometrie

2.4.1.1. Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Partikel, beispielsweise Körperzellen, in einem Flüssigkeitsstrom gezählt und analysiert werden. Die Durchflusszytometrie ist auch unter dem Begriff der FACS-Analyse bekannt. FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting. Der Begriff ist von der Firma Becton Dickinson patentrechtlich geschützt. Die Methode beruht auf der Streuung von Licht durch die Zellen. Um diese Streuung messen zu können, müssen die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Dazu wird die Probe im Zentrum einer Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) angesaugt. Ohne dass sich die beiden Flüssigkeiten vermischen, wird sowohl die Probe als auch der Hüllstrom beschleunigt. Dadurch wird die Zellsuspension so stark verjüngt, dass die Zellen ähnlich den Perlen einer Kette einzeln aufeinander folgen. Dieses Prinzip wird hydrodynamische Fokussierung genannt. Die Zellen passieren nun einzeln einen Laserstrahl. Hierdurch entsteht Streulicht, das von der Art und den Eigenschaften der Zelle abhängt. Das Licht wird in verschiedene Richtungen gestreut und im Durchflusszytometer von verschiedenen Detektoren aufgefangen. Der Detektor für das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter = FSC) steht annähernd in der Achse des einfallenden Lichtstrahls. Er fängt das an der Zelloberfläche gebeugte Licht auf, das proportional zur Größe der Zelle ist. Kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Im Gegensatz dazu wird das Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter = SSC) im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl detektiert. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe der Zelle sehr stark von ihrer Struktur und der Granularität ab.

Neben Zellgröße und Struktur kann die Durchflusszytometrie noch mehr Aufschluss über die zu untersuchenden Zellen geben. Hierfür müssen fluoreszierende Farbstoffe, sogenannte Fluorochrome, eingesetzt werden. Durch die Energie des Laserlichts werden Elektronen des Fluorochroms angeregt und auf

ein höheres Energieniveau angehoben. Diese Energie wird in Form von Licht einer bestimmten Wellenlänge wieder abgegeben. Die Intensität des Lichts in der für den jeweils eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlänge kann im Durchflusszytometer detektiert werden. Bei der Probenvorbereitung müssen die Zellen mit einem Fluorochrom markiert werden. Dies geschieht mit Hilfe industriell hergestellter Fluorochrom-gekoppelter Antikörper. Der Antikörper bindet an die zu untersuchende Struktur, beispielsweise ein bestimmtes Oberflächenmolekül. Im FACS wird ermittelt, ob die Zellen mit dem fluoreszierenden Antikörper beladen sind oder nicht. Es können also nur Merkmale der Zelle untersucht werden, gegen die ein entsprechender Antikörper verfügbar ist. Durch den Einsatz mehrerer Laser und vor allem Detektoren können mehrere Merkmale einer Zelle gleichzeitig untersucht werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACS Calibur der Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA. Dieses Durchflusszytometer arbeitet mit einem luftgekühlten Argon-Ionen-Laser von 488 nm Wellenlänge. Diese Wellenlänge entspricht der Farbe blau auf der Farbskala. Zusätzlich verfügt das FACS Calibur über einen roten Diodenlaser von 635 nm Wellenlänge. Mit diesen beiden Lasern und verschiedenen Interferenzfiltern können bis zu vier Fluoreszenzen differenziert werden. Die unterschiedlichen Emissionsspektren werden auf verschiedene Kanäle abgebildet. So zeichnet beispielsweise der Fluoreszenzkanal (FL) 1 eine Emission von 530 nm auf.

2.4.1.2. Durchführung der Versuche

Die Versuche wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zunächst wurden 1000 µl der Ringerlösung (bzw. glukosefreie oder chloridfreie Lösung) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Dieser Lösung wurde die für die gewünschte Konzentration benötigte Menge der Testsubstanz zugesetzt. Hierfür wurde zunächst eine Ausgangslösung höherer Konzentration hergestellt. Als Lösungsvermittler diente dabei Ethanol (für Sphingosin) bzw. Methanol (für S1P). Für die gut löslichen Polyamine Spermin und Spermidin war kein Lösungsvermittler notwendig. Die Lösungsvermittler erreichten Konzentrationen bis zu 0,38 % (Methanol) bzw. 0,1 % (Ethanol). Um einen Einfluss des

Lösungsvermittlers auf die Versuchsergebnisse auszuschließen wurde den Kontrollansätzen die entsprechende Menge Methanol bzw. Ethanol zugesetzt. Dem Ansatz wurden 4 µl Erythrozytenkonzentrat zugegeben, sodass sich in den Proben ein Hämatokrit von 0,4 % ergab. Dabei wurden für jedes Experiment n=3 unterschiedliche Erythrozytenkonzentrate von verschiedenen Spendern mit unterschiedlichen Blutgruppen verwendet. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei den Versuchen in hyperosmolarer Lösung wurde der Ringer-Lösung die entsprechende Menge Saccharose zugesetzt, um eine Lösung mit 700 mosmol/l zu erhalten, nach Zugabe von 4 µl Erythrozytenkonzentrat wurden die Proben für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Für das Anfärben der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen wurden zunächst jeweils 50 µl des jeweiligen Ansatzes entnommen und bei 20 °C für 3 Minuten mit 1600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Zellpellet in 200 µl einer Lösung aus dem fluoreszierenden Farbstoff (Annexin-V bzw. Fluo-3) und Annexin-Waschpuffer im Verhältnis 1:500 resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 20 Minuten, bevor die Zellen im Durchflusszytometer analysiert wurden.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der CellQuest-Software der Firma Becton Dickinson.

2.4.1.3. Messung der Phosphatidylserin-Exposition

Charakteristisch für die Apoptose kernhaltiger Zellen ist unter anderem die Exposition von PS. PS ist ein Phospholipid, das in der Zellmembran vorkommt. Bei intakten Zellen findet es sich jedoch nur in der inneren Phospholipidschicht der Doppelmembran. In der Apoptose wird PS in die äußere Phospholipidschicht transportiert (Fadok et al. 1992). Die zugrunde gehende Zelle zeigt ihren suizidalen Tod an und ermöglicht es Makrophagen, die Apoptose zu erkennen und die Zelle zu phagozytieren. Auch die Erythrozyten nutzen diesen Mechanismus der PS-Exposition, um auf ihren suizidalen Tod aufmerksam zu machen (Lang et al. 2005a). Die PS-Exposition kann also genutzt werden, um apoptotische Zellen zu detektieren. Hierfür wird das Protein

Annexin-V benutzt. Annexin ist ein Protein von 32 kDa, das gerinnungshemmende Eigenschaften aufweist (Reutelingsperger et al. 1985). Bei der Familie der Annexine handelt es sich um kalziumabhängige phospholipidbindende Proteine (Andree et al. 1990), wobei Annexin-V eine besonders hohe Affinität zu PS aufweist. Da PS bereits in einer frühen Phase der Apoptose exponiert wird, ist die Markierung mittels Annexin ein gut geeignetes Mittel, um zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen zu unterscheiden (Vermees et al. 1995). Um die Bindung des Annexins sichtbar zu machen, wird ein fluoreszierender Farbstoff an Annexin gekoppelt. In den Experimenten wurde Annexin-V-Fluos der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland eingesetzt. Hier ist Annexin an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt. Das Maximum der Anregung des FITC liegt bei 495 nm, die Hauptemission erfolgt mit 521 nm. Im Durchflusszytometer wurde FITC mit 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm (FL1) gemessen. Die für die Bindung des Annexins erforderliche Kalziumkonzentration wurde durch die Verwendung von Annexin-Waschpuffer gewährleistet. Bei Nichtgebrauch wurde Annexin unter Lichtabschluss gelagert.

2.4.1.4. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Für den Ablauf der Eryptose ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration von herausragender Bedeutung. Durch den Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytoplasma kommt es zur Stimulation der Scramblase, dem für die Exposition von Phosphatidylserin verantwortlichen Enzym. Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung eines kalziumabhängigen Kaliumkanals. Der Ausstrom von Kalium führt zu einer Hyperpolarisation mit nachfolgendem Chloridausstrom. Diesem Verlust von Kaliumchlorid folgt osmotisch Wasser, was zu einer Schrumpfung des Erythrozyts führt (Lang et al. 2005a). Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration während der Eryptose geschieht durch unselektive Kationenkanäle. Diese Kanäle werden durch Zellschrumpfung im Rahmen osmotischen Stresses (Huber et al. 2001) oder durch oxidativen Stress (Duranton et al. 2002) aktiviert. Auch PGE₂ kann den unspezifischen Kationenkanal akti-

vieren und somit zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führen (Lang et al. 2005c).

Das intrazelluläre Kalzium kann mithilfe des Substanz Fluo-3-AM markiert werden und wird somit einer durchflusszytometrischen Bestimmung zugänglich (Andrews et al. 2002). In Fluo-3-AM ist das Molekül Fluo-3 mit Acetoxymethyl verestert. Fluo-3-AM bindet selbst kein Kalzium. Fluo-3-AM kann die Zellmembran durchdringen und wird durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das entstehende Fluo-3 ist nicht membrangängig und somit in der Zelle eingeschlossen. Fluo-3 bildet mit Kalzium einen Chelatkomplex. Diese Komplexbildung verstärkt die Fluoreszenz von Fluo-3 um das 35 bis 40-fache (Minta et al. 1989). Somit ist Fluo-3-AM ein gut geeignetes Molekül, um intrazelluläres Kalzium nachzuweisen. In den Versuchen wurde Fluo-3-AM der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland verwendet. Nach Hydrolyse liegt das Maximum der Anregung bei 506 nm, die Hauptemission erfolgt mit 526 nm. Im FACS wurde Fluo-3 mit 488 nm angeregt und die Emission im FL-1 Kanal (530 nm) gemessen. Bei Nichtgebrauch wurde Fluo-3-AM unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

2.4.2. Patch-Clamp-Technik

2.4.2.1. Grundlagen

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Neher und Sakmann entwickelt, die dafür den Nobelpreis erhielten. Die Methode wurde 1981 von Hamill verbessert (Hamill et al. 1981). Das Verfahren erlaubt die Messung von Ionenströmen an einzelnen Ionenkanälen. Dazu wird eine Messelektrode aus einer Glaskapillare angefertigt. Die Kapillare aus Borosilikatglas wird unter Hitzeeinwirkung dünn ausgezogen, so dass eine Pipette entsteht, deren Öffnungsdurchmesser etwa 1 µm beträgt. Die Pipette wird mit einer leitfähigen Pipettierlösung gefüllt. In die Lösung taucht ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht. Zur Messung wird die Patch-Elektrode an einen Verstärker angeschlossen, der notwendig ist, um die Überlagerung der kleinen Messströme durch äußere Störsignale zu verrin-

gern. Die Patch-Pipette wird auf einen Mikromanipulator gespannt und unter optischer Kontrolle auf die zu messende Zelle, die sich in einer Badlösung befindet, gedrückt. In der Badlösung befindet sich eine weitere Elektrode, die die Lösung elektrisch erdet. Nun wird ein Unterdruck an die Patch-Pipette angelegt, der zur Ausbildung eines hohen Widerstandes zwischen der Pipette und der Badlösung führt. Dieser Widerstand beträgt mehrere Gigaohm und wird Gigaseal genannt (engl. to seal = etwas versiegeln). Mit Patch wird der Anteil der Membran, der sich in der Öffnung der Pipette befindet, bezeichnet (engl. patch = Flicker). Das Gigaseal schafft eine mechanisch und elektrisch sehr dichte Verbindung zwischen der Pipette und dem Membran-Patch. Laterale Stromflüsse werden verhindert und kleinste Ströme, die über die Zellmembran durch die Elektrodenöffnung fließen, können gemessen werden. Je nachdem, ob nach dem Aufsetzen der Pipette der angesaugte Membranbereich aus der Zelle herausgelöst, an der intakten Zelle gemessen oder das Membranstück eröffnet wird, werden verschiedene Konfigurationen unterschieden. Bei der Ganzzell-Konfiguration wird nochmals ein Unterdruck an die Pipette angelegt. Dadurch öffnet sich der Teil der Zellmembran, der unter der Pipettenöffnung liegt. Das Innere der Pipette hat nun Zugang zum Zytosol, das weiterhin durch das Gigaseal gegenüber der Außenlösung isoliert ist. In dieser Ganzzell-Konfiguration können die Ströme, die über die gesamte Zellmembran fließen, abgeleitet werden.

2.4.2.2. Durchführung der Messung

Die Arbeitsgruppe führte die Messungen bei Raumtemperatur durch. Die Patch-Pipetten aus Borosilikatglass wurden mit einem DMZ-Puller (Zeitz, Martinsried, Deutschland) gezogen. Die Pipetten hatten einen Spitzenwiderstand von 15 bis 18 M Ω . Sie wurden mittels eines Silber/Silberchlorid-Drahtes an einen EPC-9 Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) gekoppelt. Die Aufzeichnung und Analyse der Daten erfolgte an einem Computer mit ITC 16 Schnittstelle (Instrutech, Port Washington, N.Y., USA) und der Pulse Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland). Für die Messungen wurden die Erythrozyten bei einem Haltepotential von -10 mV gehalten. Es wurden 200 ms lange Pulse von

Material und Methoden

-100 mV bis 100 mV in 20 mV Stufen gegeben. Die Ganzzell-Messungen wurden ohne Filterung mit einer Frequenz von 3 kHz aufgezeichnet. Die Analyse der Ströme erfolgte durch die Bildung des Durchschnittswertes der Werte, die zwischen 90 und 190 ms jeden Rechteckpulses gemessen wurden (I-V Verhältnis). Die gemessenen Spannungen beziehen sich auf die zytoplasmatische Seite der Membran in Bezug auf den Extrazellarraum. Bei den Messungen wurden die Erythrozyten kontinuierlich superfundiert und die Badlösung über eine NaCl-Ringerbrücke geerdet. Die Offset-Potentiale der Elektroden wurden vor der Messung auf null gesetzt. Das Liquid-junction-Potential, das zwischen Badlösung und Pipettenlösung sowie zwischen Badlösung und der NaCl-Ringerbrücke auftritt, wurde nach Barry und Lynch berechnet (Barry and Lynch 1991) und die Daten entsprechend korrigiert. Sphingosin und S1P wurden in einer Konzentration von 10 μ M der Badlösung zugesetzt. Die Ganzzell-Messungen wurden nach Perfusion von ein bis zwei Minuten durchgeführt. Die Kationenleitfähigkeit wurde für die Einwärts-Ströme durch lineare Regression berechnet.

2.5. Statistik

Die Messungen erfolgten an verschiedenen voneinander unabhängigen Probenansätzen (n). Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel mit der Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel. Ergebnisse wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Auswirkungen von Sphingosin auf die Eryptose

3.1.1. Auswirkungen von Sphingosin auf die PS-Exposition

Um den Einfluss von Sphingosin auf die Exposition von PS zu erkennen, wurden verschiedene Konzentrationen von Sphingosin zu den Erythrozyten hinzugegeben. Nach 48-stündiger Inkubation zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Prozentsatz der Annexin-bindenden Zellen, was auf die erythrozytäre PS-Exposition hinweist. In der statistischen Auswertung wurden Ansätze nicht berücksichtigt, bei denen die Kontrollwerte der Annexinbindung ohne Sphingosinzugabe über 6 % lagen, da dies am ehesten auf eine Verunreinigung zurückzuführen ist. Abzüglich dieser ausgenommenen Ergebnisse betrug die Stichprobenanzahl $n=9$. Der Mittelwert des Prozentsatzes der Annexin bindenden und damit PS-exponierenden Zellen betrug bei den Kontrollen ohne Sphingosinzugabe $2,86 \pm 0,99$ %, bei einer Konzentration des Sphingosins von $0,1 \mu\text{M}$ $3,25 \pm 1,04$ % bei einer Sphingosinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ $5,88 \pm 2,61$ % und bei einer Sphingosinkonzentration von $10 \mu\text{M}$ $35,08 \pm 16,15$ %. Diese Steigerung der Annexin-Bindung ist deutlich signifikant ($p < 0,001$).

Abbildung 6 zeigt ein typisches Histogramm eines Kontrollansatzes und eines Ansatzes, der Sphingosin in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ enthält.

Ergebnisse

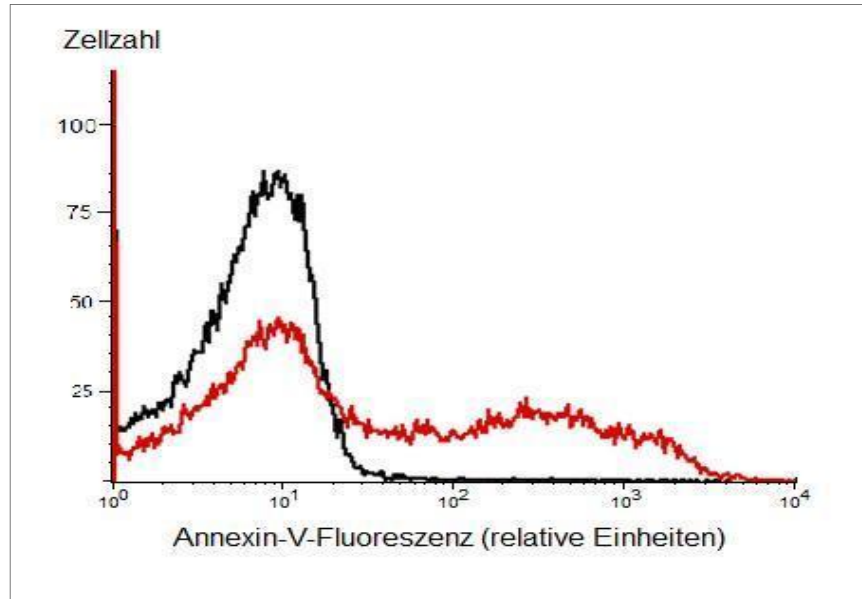


Abb. 6: Histogramm eines repräsentativen Messergebnisses:
schwarze Kurve: Kontrollansatz, rote Kurve: Ansatz mit $10 \mu\text{M}$ Sphingosin

Das folgende Diagramm stellt die Mittelwerte des Prozentsatzes der PS-exponierenden Zellen in Abhängigkeit von der Sphingosinkonzentration und ihre Standardabweichung dar.

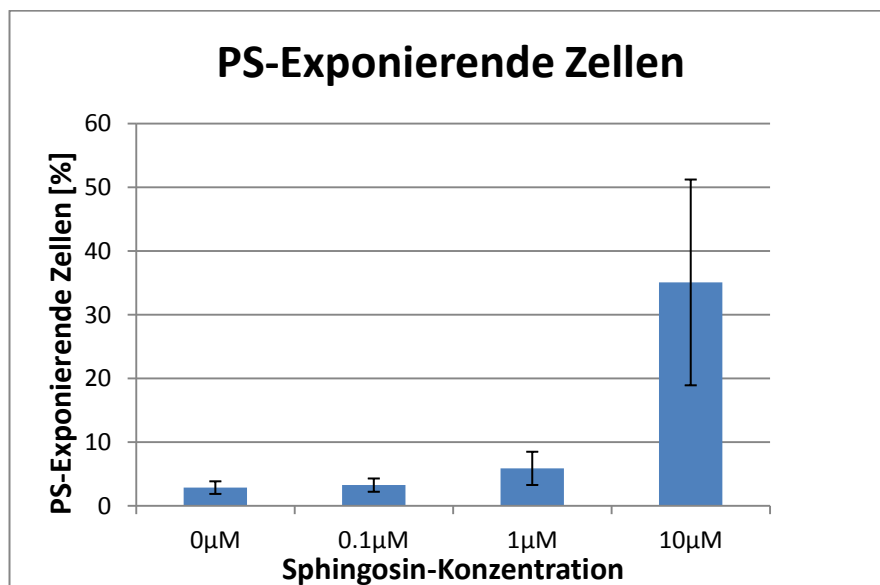


Abb. 7: Prozentsatz der PS-exponierenden Zellen in Abhängigkeit von der Sphingosinkonzentration. Das Ergebnis bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ist deutlich signifikant ($p < 0,001$).

3.1.2. Auswirkungen von Sphingosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration stellt einen wichtigen Faktor der Eryptose dar, da durch Kalzium die Kalzium-sensiblen Kaliumkanäle stimuliert werden, was zu Kaliumverlust und Zellschrumpfung führt. Auch die Calpaine und die Scramblase sind kalziumabhängig. Um den Einfluss von Sphingosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu erkennen, wurden die Zellen nach 48-stündiger Inkubation in Lösungen verschiedener Sphingosinkonzentrationen mit Fluo-3 versetzt. Die Fluoreszenz von Fluo-3, die mit der intrazellulären Kalziumkonzentration korreliert, wurde im Durchflusszytometer gemessen. Die Stichprobenanzahl betrug $n=9$. Der Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz (in relativen Einheiten, da eine Kalibrierung nicht möglich ist) betrug bei den Kontrollansätzen $18,51 \pm 4,93$, bei einer Sphingosinkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ $18,23 \pm 4,07$, bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Sphingosin $17,92 \pm 3,75$ und bei der Konzentration des Sphingosins von $10 \mu\text{M}$ $36,56 \pm 20,72$. Dieses Ergebnis ist signifikant ($p < 0,05$).

Abbildung 8 zeigt das Histogramm einer repräsentativen Messung eines Kontrollansatzes und eines Ansatzes mit $10 \mu\text{M}$ Sphingosin.

Ergebnisse

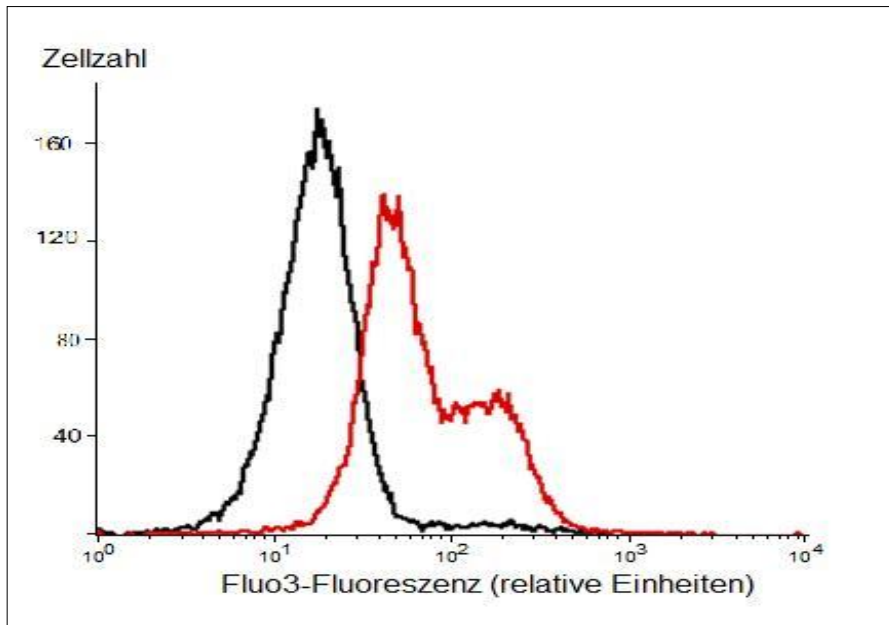


Abb. 8: Histogramm einer repräsentativen Messung der Fluo3-Fluoreszenz eines Kontrollansatzes (schwarze Kurve) und einer Probe mit $10 \mu\text{M}$ Spingosin (rote Kurve).

Im folgenden Diagramm sind die Mittelwerte der Messergebnisse unter den jeweiligen Spingosinkonzentrationen mit den Standardabweichungen noch einmal grafisch zusammengefasst.

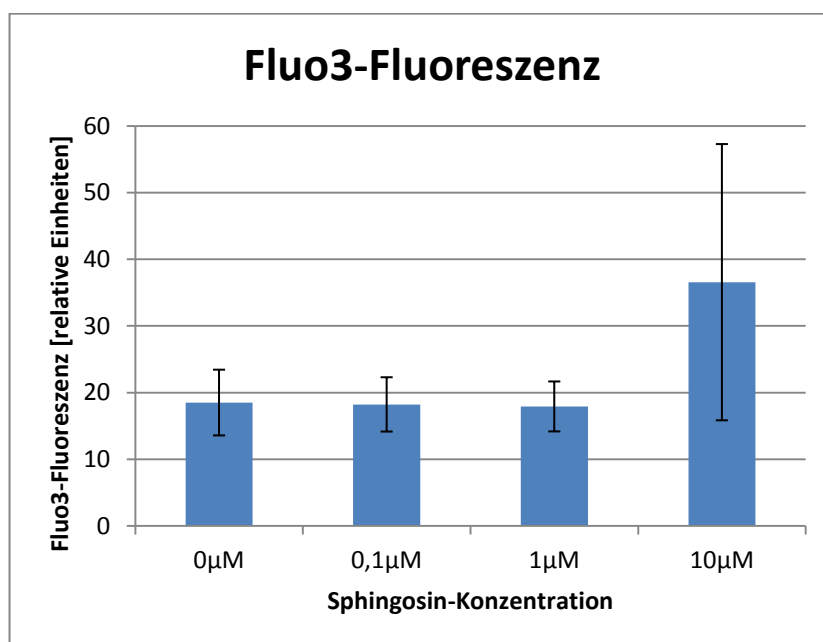


Abb. 9: Effekt des Spingosins in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluo3-Fluoreszenz.

3.1.3. Auswirkungen von Sphingosin auf das Zellvolumen

Im Verlauf der Eryptose erfolgt die Öffnung von Kaliumkanälen. Dem ausströmenden Kalium folgt Chlorid und Wasser, die Zelle schrumpft. Um die Veränderungen des Zellvolumens durch Sphingosin sichtbar zu machen, wurde das FSC-Signal in der FACS-Analyse nach 48-stündiger Inkubation gemessen. Das FSC-Signal ist ein Maß für die Zellgröße. Die ermittelten Mittelwerte der Proben (n=9), in relativen Einheiten angegeben, betragen bei den Kontrollproben $648,53 \pm 22,73$, bei einer Sphingosinkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ $656,47 \pm 20,04$, einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ $620,85 \pm 30,5$ und für $10 \mu\text{M}$ Sphingosin $404,36 \pm 59,96$. Damit zeigt sich eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme des Zellvolumens durch Sphingosin.

Das repräsentative Histogramm der Messung des FSC-Signals eines Kontrollansatzes ohne Sphingosin und einer Probe, die $10 \mu\text{M}$ Sphingosin ausgesetzt war, zeigt Abbildung 10.

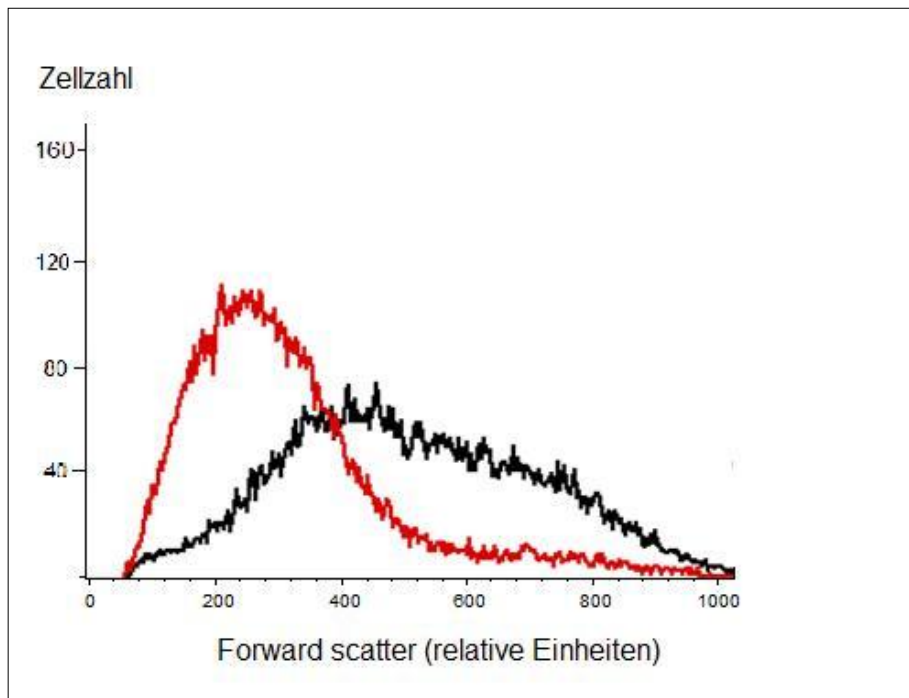


Abb. 12.: Das Histogramm einer Messung des Forward Scatter eines Kontrollansatzes (schwarze Kurve) und eines Ansatzes unter Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Sphingosin (rote Kurve).

Ergebnisse

Eine grafische Zusammenfassung der Messergebnisse zeigt Abbildung 11. Hierbei sind die Mittelwerte der Messergebnisse ($n=9$) und die Standardabweichungen angegeben. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des Zellvolumens für eine Sphingosinkonzentration von $10\ \mu\text{M}$.

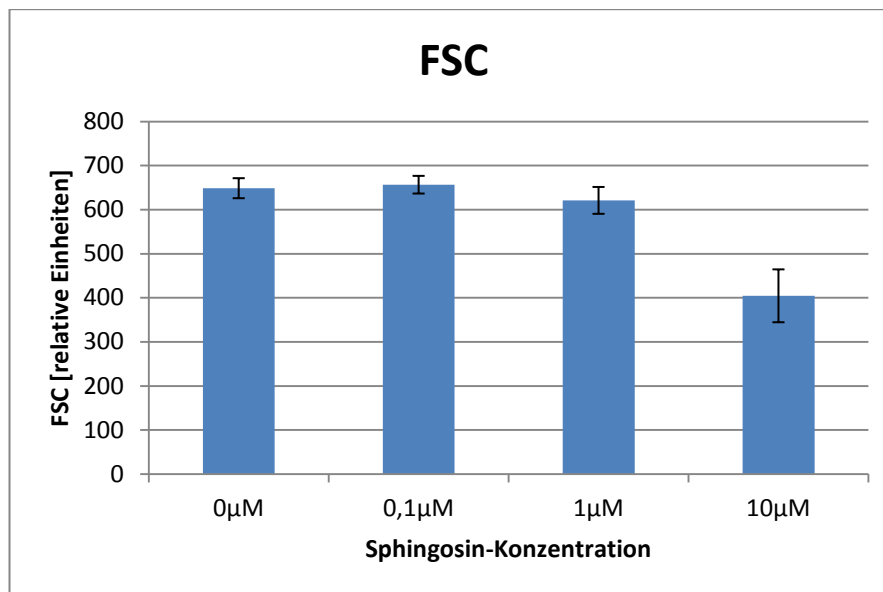


Abb. 11: Mittelwerte der Messungen des Forward Scatters (FSC), eines Markers für die Zellgröße, unter den verschiedenen Sphingosinkonzentrationen.

3.2. Auswirkung von Sphingosin auf durch Glukose-Entzug induzierte Eryptose

Erythrozyten sind auf Glukose angewiesen. Der Entzug von Glukose führt zum suizidalen Zelltod mit Anstieg des intrazellulären Kalziums, Volumenverlust und PS-Exposition. Um den möglichen Einfluss von Sphingosin auf die durch Glukose-Entzug ausgelöste Eryptose aufzudecken, wurden Erythrozyten 48 Stunden in glukosefreiem Medium inkubiert. Dem Medium waren verschiedene Konzentrationen Sphingosin zugegeben worden. Bei einer Sphingosinkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ zeigte sich eine Zunahme der PS-Exposition, was durch einen Anstieg der Annexinbindung von $36,10 \pm 7,23\ \%$

Ergebnisse

der Zellen bei glukosefreier Lösung zu $56,26 \pm 11,31$ % der Zellen bei glukosefreier Lösung mit $10 \mu\text{M}$ Sphingosin deutlich wurde ($n=6$; $p<0,05$). Auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration stieg signifikant ($p<0,001$) von $52,57 \pm 12,74$ relativen Einheiten im glukosefreien Medium zu $92,78 \pm 12,45$ bei Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Sphingosin ($n=6$). Sphingosin ist also in der Lage, den durch Glukose-Entzug ausgelösten Suizid der Erythrozyten zu verstärken.

3.3. Auswirkungen von Sphingosin-1-phosphat auf die Eryptose

Weitere Experimente wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Effekte des Sphingosins auf die PS-Exposition, das Zellvolumen und die Kalziumkonzentration auch durch Sphingosin-1-phosphat ausgelöst werden. Es konnte jedoch keine signifikante Modifikation der Eryptose-Parameter festgestellt werden. Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse der Messungen zusammen ($n=9$).

Tabelle 7: Einfluss von S1P auf die Annexin-Bindung, die Fluo-3-Fluoreszenz und das FSC-Signal von Erythrozyten.

S1P-Konzentration	0 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM
Anx-Bindung [%]	3,53 $\pm 1,06$	3,43 $\pm 1,14$	4,13 $\pm 1,30$	4,43 $\pm 1,43$
Fluo3-Fluoreszenz [rel. Einh.]	17,43 $\pm 3,02$	16,69 $\pm 3,26$	17,01 $\pm 3,39$	17,08 $\pm 3,41$
FSC [rel. Einh.]	615,90 $\pm 52,65$	626,77 $\pm 60,10$	627,41 $\pm 53,73$	602,98 $\pm 52,84$

Bei Zugabe von S1P konnte nach 48-stündiger Inkubation kein signifikanter Unterschied in der Annexin-Bindung, der Fluo-3-Fluoreszenz oder dem FSC-Signal festgestellt werden.

Anx: Annexin, rel. Einh.: relative Einheiten, FSC: Forward Scatter

Ergebnisse

Das folgende Histogramm zeigt eine repräsentative Messung der Annexin-Bindung nach 48 stündiger Inkubation der Erythrozyten in reiner Ringerlösung sowie unter Zugabe von 10 μM S1P.

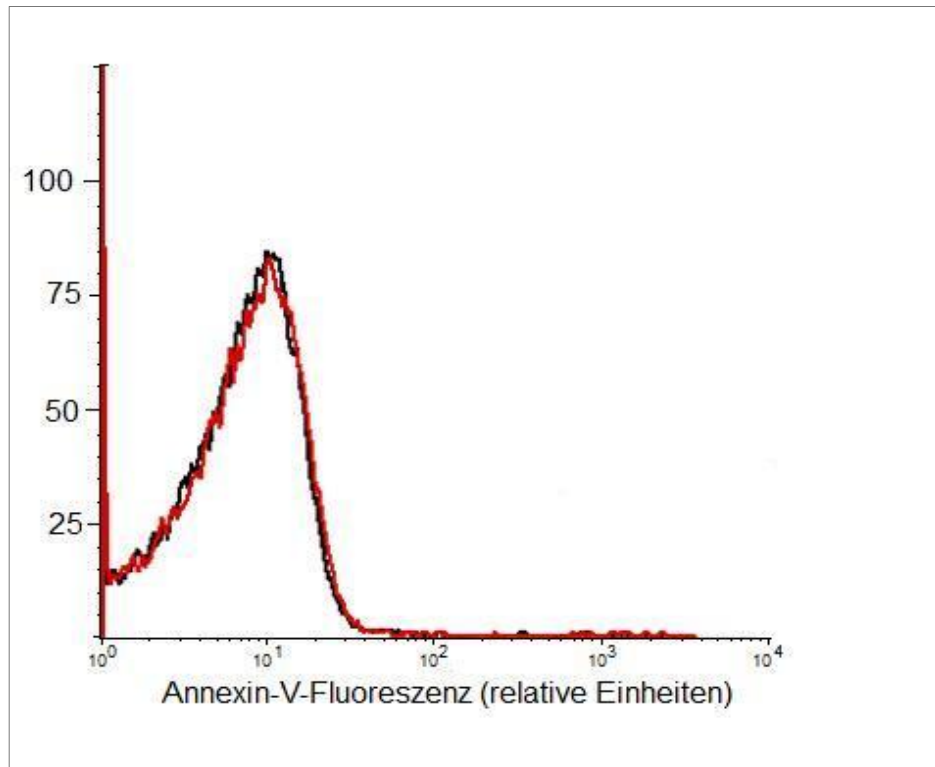


Abb. 12: Histogramm einer repräsentativen Messung der Annexinbindung eines Kontrollansatzes (schwarze Kurve) und eines Ansatzes mit Zugabe von 10 μM S1P (rote Kurve). Die Kurven verlaufen annähernd gleich, was gegen eine Beeinflussung der Annexinbindung durch S1P spricht.

3.4. Einfluss des Sphingosinkinase-Aktivators K6PC-5 auf die durch Sphingosin induzierte Eryptose

Die Arbeitsgruppe führte weitere Experimente durch, um zu untersuchen, ob K6PC-5, ein Sphingosinkinase-Aktivator, die Eryptose, die durch Sphingosin induziert wurde, beeinflusst. Dazu wurde die Annexin-Bindung untersucht. Die Kontrollen der unbehandelten Erythrozyten zeigten eine Prozentzahl von $0,8 \pm 0,3$ ($n=4$) Annexin-bindender Zellen. Erythrozyten, die mit K6PC-5

Ergebnisse

behandelt wurden, zeigten bei einer Konzentration von 1 μM $0,7 \pm 0,2$ ($n=4$) und bei 10 μM $0,8 \pm 0,21$ ($n=4$) prozentige Annexinbindung. Bei Zugabe von 10 μM Sphingosin und K6PC-5 zeigten sich Prozentsätze der Annexin-Bindung von $21,8 \pm 2,8$ ($n=4$) bei einer K6PC-5-Konzentration von 1 μM und $30,2 \pm 6$ ($n=4$) bei einer K6PC-5-Konzentration von 10 μM . Die Zugabe des Sphingosinkinase-Aktivators K6PC-5 beeinflusste die durch Sphingosin ausgelöste Eryptose nicht signifikant.

3.5. Auswirkungen von Sphingosin auf die Kationenleitfähigkeit

Patch-Clamp-Experimente wurden durchgeführt, um einen Einfluss von Sphingosin auf die Kationenleitfähigkeit aufzudecken. Dabei zeigte sich ein geringer Anstieg der Kationenleitfähigkeit der Erythrozyten nach einer Perfusion mit 10 μM Sphingosin. Die Leitfähigkeit stieg von 75 ± 10 pS auf 86 ± 23 pS ($n=6$). S1P konnte keinen Anstieg der Kationenleitfähigkeit bewirken. Sie betrug 64 ± 22 pS in Abwesenheit von S1P und 64 ± 22 pS bei Zugabe von S1P ($n=4$).

3.6. Auswirkungen von Spermin auf die Eryptose

Der Einfluss des biogenen Polyamins Spermin auf die Eryptose sollte getestet werden. Dazu wurde Spermin zu Erythrozyten gegeben, die in Ringer-Lösung, aber auch in Eryptose auslösender glukosefreier Lösung und chloridfreier Lösung suspensiert waren. Die physiologische Konzentration von Spermin im Blutplasma beträgt unter 0,16 μM . In den Erythrozyten lassen sich 0,605 nm pro 10^9 Zellen nachweisen (Cooper et al. 1976). Geht man von einem durchschnittlichen Volumen der Erythrozyten von 90 fl aus, ergibt das eine Konzentration von 6,7 μM Spermin in den Zellen. In den Ansätzen wurde Spermin in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Dies entspricht molaren Konzentrationen von 4,9 μM , 14,8 μM und 49 μM .

3.6.1. Auswirkungen von Spermin auf die PS-Exposition

Zunächst wurde der Einfluss von Spermin auf die spontane Eryptose getestet. Hierzu wurden Erythrozyten in Ringerlösung gelöst und den Ansätzen Spermin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Exposition von PS gemessen, mit der die Zelle ihren suizidalen Tod anzeigt. Die Stichprobenanzahl betrug $n=6$.

Der Anteil annexinbindender Zellen betrug im Kontrollansatz ohne Spermin $3,32 \pm 1,95 \%$, bei Zugabe von Spermin in der Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ $3,36 \pm 1,99 \%$, unter Einfluss von $3 \mu\text{g/ml}$ Spermin $3,56 \pm 1,91 \%$ und im Ansatz mit einer Sperminkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ $3,40 \pm 2,04\%$. Spermin beeinflusste die spontane Eryptose nicht signifikant.

Eine grafische Zusammenfassung der Messergebnisse zeigt Abbildung 13. Hierbei sind die Mittelwerte der Messergebnisse ($n=6$) und die Standardabweichungen angegeben.

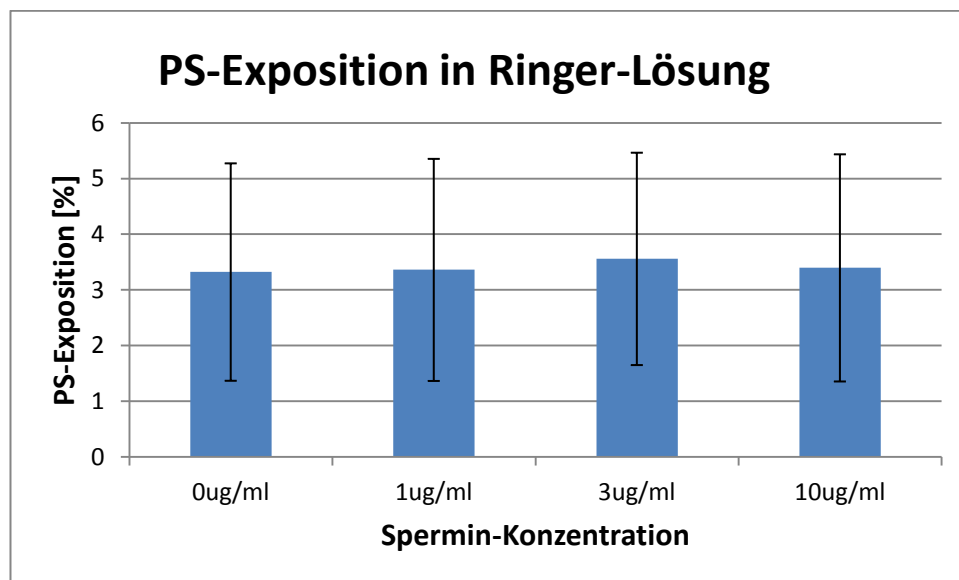


Abb. 13: PS-Exposition der Erythrozyten unter Einfluss verschiedener Spermin-Konzentrationen

Ergebnisse

Die folgende Grafik zeigt ein repräsentatives Histogramm einer Kontrollmessung und der Messung eines Ansatzes mit 3 µg/ml Spermin.

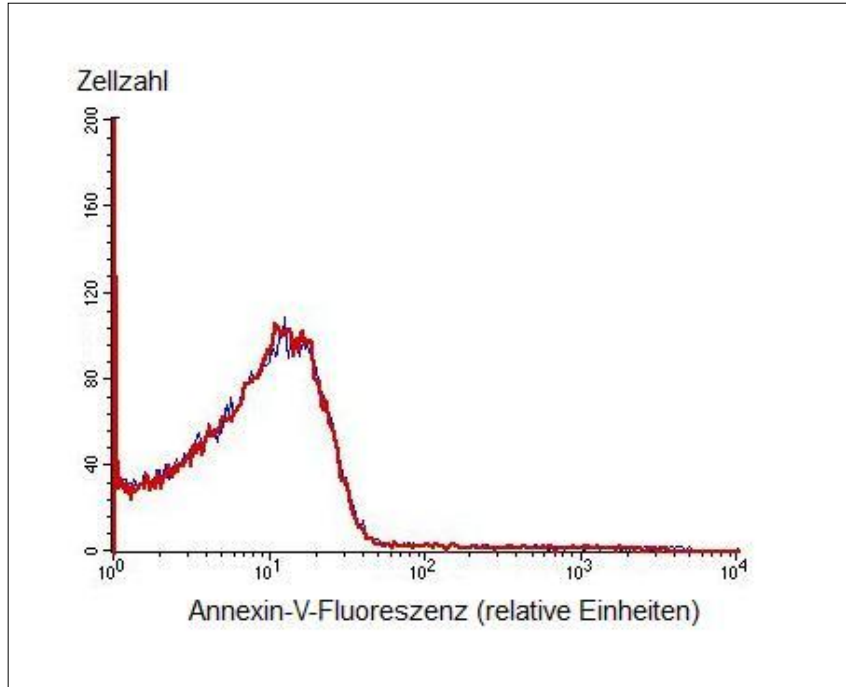


Abb. 14: Histogramm einer beispielhaften Messung der Annexin-Bindung eines Kontrollansatzes (blaue Kurve) und eines Ansatzes mit Spermin in der Konzentration 3 µg/ml (rote Kurve).

Um zu testen, ob Spermin die Zellen vor Eryptose schützt, wurden sie verschiedenen stressauslösenden Stimuli ausgesetzt. Rote Blutkörperchen sind auf Energie in Form von Glukose angewiesen. Der Entzug von Glukose stellt einen Stressor dar, der Eryptose und somit die Exposition von PS auslöst. Nach 48-stündiger Inkubation in glukosefreier Lösung betrug der Anteil Annexin-bindender Zellen $26,56 \pm 8,80$ % (n=6). Unter Zugabe von 1 µg/ml Spermin betrug der Anteil PS-exponierender Zellen $25,71 \pm 8,60$ %, bei einer Konzentration von Spermin von 3 µg/ml $23,83 \pm 8,23$ % und bei einer Spermin-Konzentration von 10 µg/ml $23,04 \pm 7,01$ %. Diese Abnahme der PS-Exposition bei Zugabe von Spermin zu den Ansätzen war für 3 µg/ml und 10 µg/ml signifikant ($p < 0,05$).

Abbildung 15 fasst die Messergebnisse grafisch zusammen. Es sind die Mittelwerte (n=6) und die Standardabweichungen angegeben.

Ergebnisse

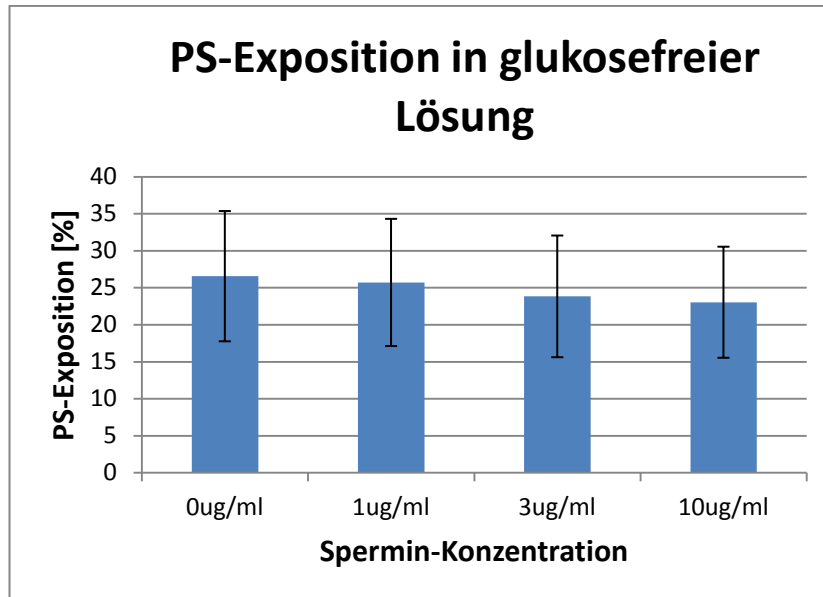


Abb. 15: PS-Exposition der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in glukosefreier Lösung unter Zugabe von Spermin in verschiedenen Konzentrationen.

Das folgende Histogramm zeigt eine repräsentative Messung eines Kontrollansatzes und eines Ansatzes mit Spermin 10 µg/ml.

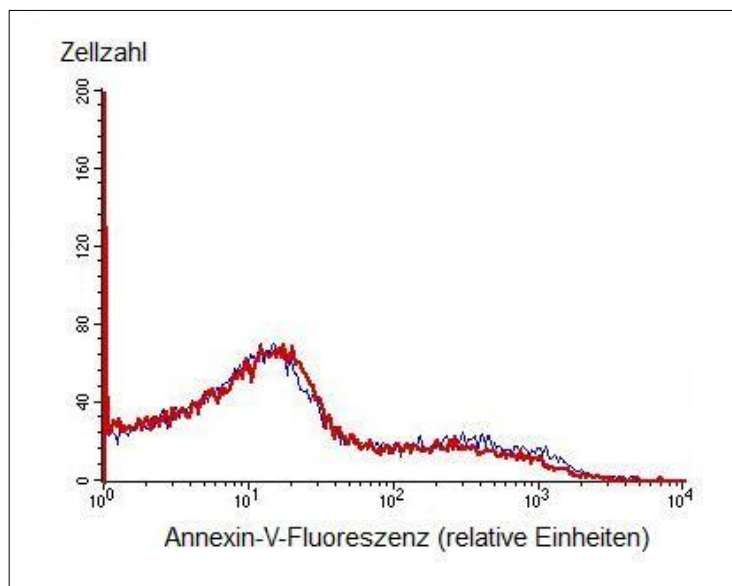


Abb. 16: Beispielhaftes Histogramm einer Messung der Annexinbindung nach 48-stündiger Inkubation in glukosefreiem Medium (blaue Kurve) und in glukosefreier Lösung, die Spermin (10 µg/ml) enthielt (rote Kurve)

Ergebnisse

Eine andere Art, Eryptose auszulösen, ist der Entzug von Chlorid. Um festzustellen, ob Spermin auch die durch Chloridentzug ausgelöste Eryptose beeinflusst, wurden die Erythrozyten in chloridfreier Lösung unter Zugabe von Spermin in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert. Nach 48-stündiger Inkubation zeigte sich im Kontrollansatz ein Anteil PS-exponierender Zellen von $11,56 \pm 8,84 \%$ ($n=6$). Zugabe von Spermin $1 \mu\text{g/ml}$ ergab einen Anteil Annexin-bindender Zellen von $12,23 \pm 6,19 \%$, eine Spermin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ $10,09 \pm 4,05 \%$ und bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ im Ansatz zeigten $7,39 \pm 3,99 \%$ der Zellen eine PS-Exposition. Dieser Abfall der Annexin-bindenden Zellen bei Zugabe von $3 \mu\text{g/ml}$ bzw. $10 \mu\text{g/ml}$ war jedoch nicht signifikant ($p=0,17$ für $10\mu\text{g/ml}$). Die folgende Abbildung fasst die Ergebnisse grafisch zusammen.

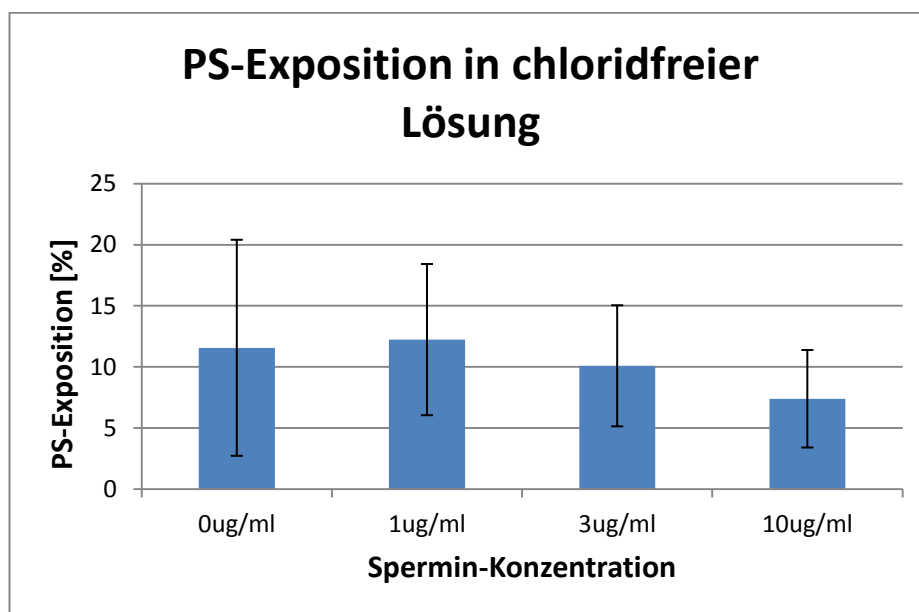


Abb. 17: Anteil der PS-exponierenden Zellen nach 48-stündiger Inkubation in chloridfreier Lösung unter Zugabe von Spermin in den entsprechenden Konzentrationen

Ein repräsentatives Histogramm zeigt Abb.18

Ergebnisse

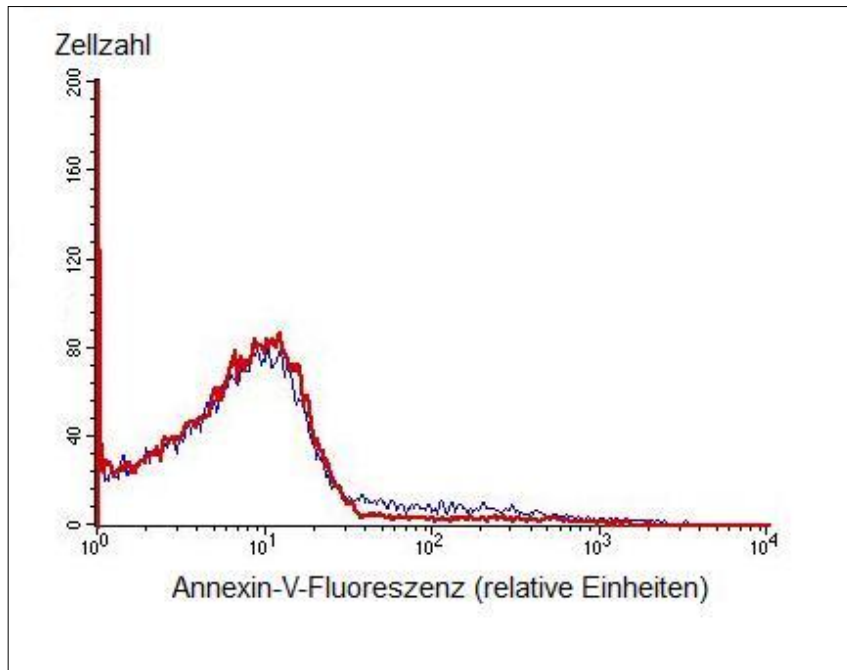


Abb. 18: Histogramm einer repräsentativen Messung der Annexin-Bindung nach 48-stündiger Inkubation in chloridfreier Lösung (blaue Kurve) und in chloridfreier Lösung, die Spermin (3 µg/ml) enthielt (rote Kurve).

Zuletzt wurde die PS-Exposition nach hyperosmolarem Schock untersucht. Dazu wurde dem Ansatz Saccharose zugegeben, so dass sich eine Osmolarität von 700 mosmol/l ergab. Diese Hyperosmolarität ist ein großer Stressor für die Erythrozyten und löst Eryptose aus. Die Erythrozyten wurden 6 Stunden in der hyperosmolaren Lösung, der Spermin in den entsprechenden Konzentrationen beigesetzt war, inkubiert. Dabei zeigten im Kontrollansatz ohne Spermin-Zugabe $33,13 \pm 6,68$ % (n=6) der Zellen eine Annexinbindung. Unter Zugabe von 1 µg/ml Spermin banden $24,75 \pm 5,42$ % der Erythrozyten Annexin. Unter Einfluss von Spermin in einer Konzentration von 3 µg/ml war eine PS-Exposition bei $22,58 \pm 6,67$ % festzustellen, bei einer Spermin-Konzentration von 10 µg/ml bei $19,35 \pm 4,56$ %. Diese beobachtete verminderte Annexinbindung unter Einfluss von Spermin war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,09$ bei einer Spermin-Konzentration von 10 µg/ml).

Im Folgenden sind die Messwerte grafisch zusammengefasst.

Ergebnisse

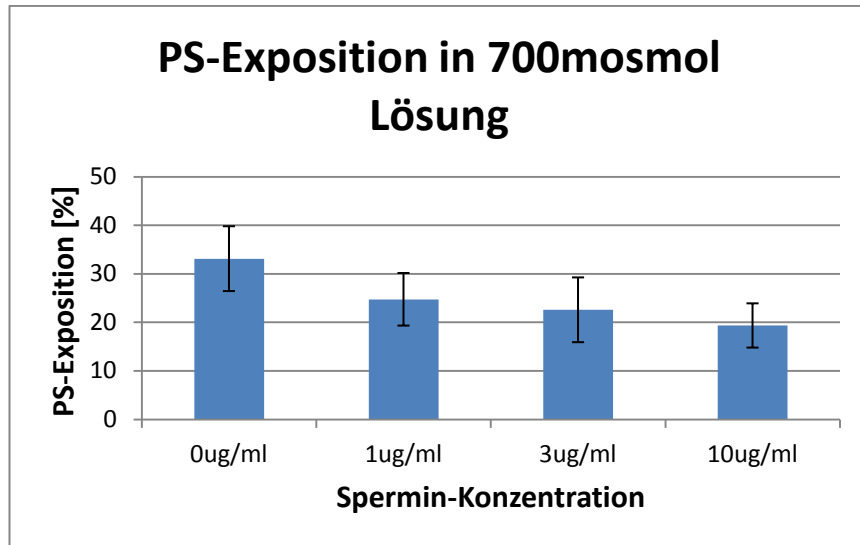


Abb. 19: Anteil der PS-exponierenden Zellen nach 6-stündiger Inkubation in einer hyperosmolaren Lösung (700mosmol/l) unter Zugabe von Spermin in den entsprechenden Konzentrationen.

Die folgende Abbildung zeigt das Histogramm einer repräsentativen Kontrollmessung und der Messung eines Ansatzes mit 10 µg/ml Spermin.

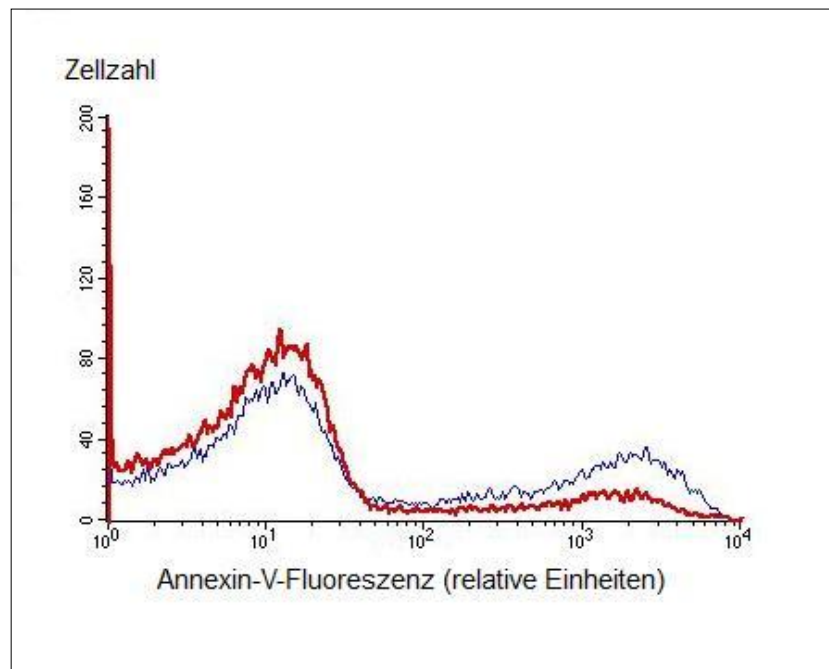


Abb. 20: Histogramm einer beispielhaften Messung der Annexin-V-Fluoreszenz nach 6-stündiger Inkubation der Zellen in hyperosmolaren Lösung (700 mosmol/l). Die blaue Kurve zeigt den Kontrollansatz, die rote Kurve einen Ansatz mit Spermin in der Konzentration 10 µg/ml.

3.6.2. Auswirkungen von Spermin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Im Laufe der Eryptose steigt der intrazelluläre Kalziumgehalt der Erythrozyten an. Um den Kalziumgehalt in den Zellen messbar zu machen, erfolgte die Färbung mit Fluo-3. Zunächst wurde der Kalziumgehalt der Zellen gemessen, die 48 Stunden in Ringerlösung inkubiert worden waren. Dabei war der Ringerlösung Spermin in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Die Fluo-3-Fluoreszenz betrug im Kontrollansatz $17,20 \pm 4,97$ (n=6), im Ansatz mit $1 \mu\text{g/ml}$ Spermin $17,42 \pm 5,42$, Bei einer Spermin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ $17,68 \pm 6,07$ und im Ansatz mit $10 \mu\text{g/ml}$ Spermin $18,01 \pm 6,25$. Spermin beeinflusste die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht signifikant.

Ein repräsentatives Histogramm zeigt Abb. 21

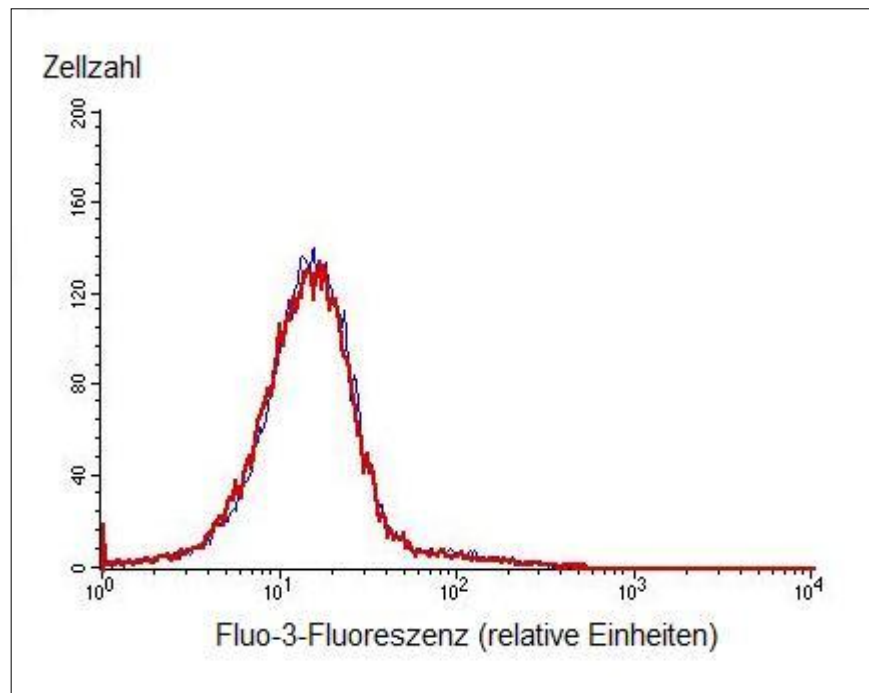


Abb. 21: repräsentatives Histogramm der Messung der Fluo-3-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation der Erythrozyten in reiner Ringerlösung (blaue Kurve) und unter Zugabe von Spermin (10 µg/ml, rote Kurve).

Ergebnisse

Inkubation in glukosefreier Lösung löst in Erythrozyten einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aus. Die Erythrozyten wurden in glukosefreier Lösung, der Spermin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt war, für 48 Stunden inkubiert. Dabei ergab sich für den Kontrollansatz eine Fluo-3-Fluoreszenz von $41,14 \pm 12,72$ ($n=6$), bei Zusatz von $1 \mu\text{g/ml}$ Spermin $41,53 \pm 14,03$, bei einer Spermin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ $40,77 \pm 14,12$ und bei $10 \mu\text{g/ml}$ Spermin $40,99 \pm 13,10$. Bei Inkubation in glukosefreier Lösung wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch Spermin nicht signifikant beeinflusst.

Als weiterer Stressor diente chloridfreie Lösung, in welcher die Erythrozyten 48 Stunden inkubiert wurden. Auch der durch Chloridentzug induzierte intrazelluläre Kalziumanstieg und damit die Fluo-3-Fluoreszenz wurde durch Spermin nicht signifikant beeinflusst. Im Kontrollansatz betrug die Fluo-3-Fluoreszenz $22,95 \pm 11,02$, im Ansatz mit $1 \mu\text{g/ml}$ Spermin $19,49 \pm 7,26$, bei $3 \mu\text{g/ml}$ Spermin $18,76 \pm 5,93$ und bei $10 \mu\text{g/ml}$ Spermin $18,02 \pm 5,85$.

Die Erythrozyten wurden einer hyperosmolaren Lösung ausgesetzt, die ebenfalls einen Eryptose auslösenden Stressor darstellt. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden in einer Lösung, deren Osmolarität 700 mosmol/l betrug. Der hyperosmolaren Lösung war Spermin in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Im Kontrollansatz betrug die Fluo-3-Fluoreszenz $20,80 \pm 3,85$, im Ansatz mit einer Spermin-Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ $21,35 \pm 2,77$, bei Zusatz von $3 \mu\text{g/ml}$ Spermin $21,03 \pm 3,13$ und bei einer Spermin-Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ $20,98 \pm 1,00$. Bei Inkubation in hyperosmolarer Lösung beeinflusste Spermin die Fluo-3-Fluoreszenz als Marker für die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht signifikant.

3.7. Auswirkungen von Spermidin auf die Eryptose

Spermidin ist wie Spermin ein biogenes Amin, das ubiquitär im Körper vorkommt und unter anderem Zellzyklus und Apoptose beeinflusst. In den Experimenten wurde Spermidin in den Konzentrationen 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt.

3.7.1. Auswirkungen von Spermidin auf die PS-Exposition

Die Erythrozyten wurden für 48 Stunden in Ringerlösung inkubiert. Dabei waren sie Spermidin in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Die Stichprobengröße betrug $n=6$. Der Prozentsatz Annexin-bindender Zellen betrug im Kontrollansatz $3,13 \pm 1,79$ %, im Ansatz mit einer Spermidin-Konzentration von 1 µg/ml $2,98 \pm 1,84$ %, bei 3 µg/ml $2,96 \pm 1,8$ % und bei 10 µg/ml Spermidin $2,93 \pm 1,8$ %. Diese geringe Abnahme des Anteils Annexin-bindender Zellen war statistisch nicht signifikant.

Folgende Grafik fasst die Ergebnisse zusammen. Dabei sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

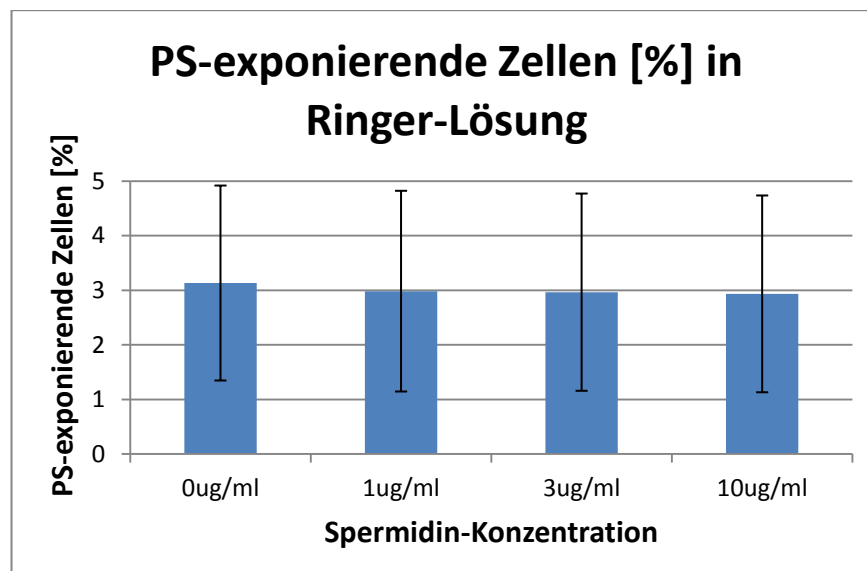


Abb. 22: Anteil der PS-exponierenden Zellen nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung, die Spermidin in den entsprechenden Konzentrationen enthält.

Ergebnisse

Das folgende Histogramm zeigt eine repräsentative Messung eines Kontrollansatzes und eines Ansatzes mit Zugabe von Spermidin 10 µg/ml

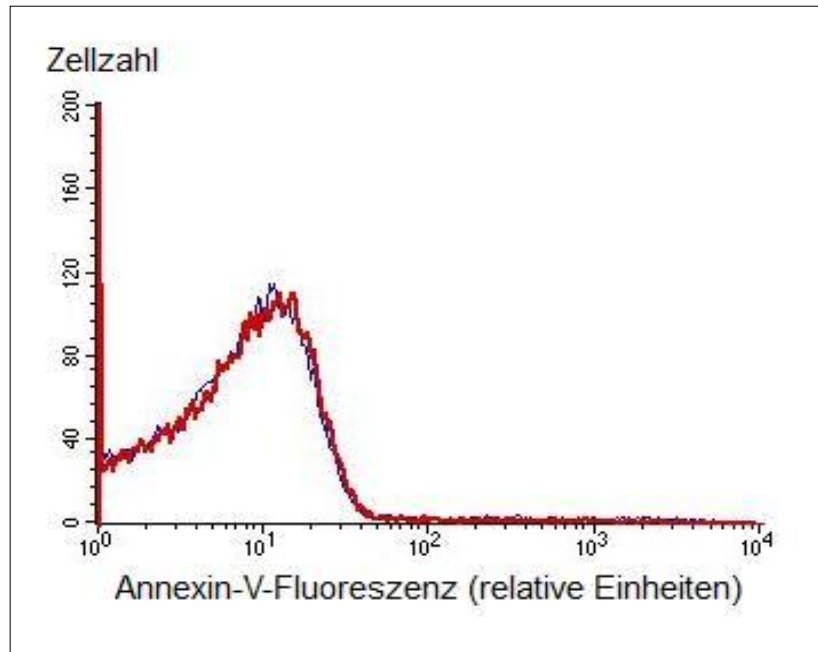


Abb. 23: Histogramm einer repräsentativen Messung der Annexin-V-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation der Erythrozyten in Ringer-Lösung (blaue Kurve) sowie unter Zugabe von Spermidin (10 µg/ml, rote Kurve).

Der Einfluss von Spermidin auf die durch verschiedene Stressoren verursachte gesteigerte PS-Exposition der Erythrozyten wurde getestet.

Als Stressor diente glukosefreie Lösung. Der Energieentzug löst verstärkte Eryptose mit der Exposition von PS auf dem äußeren Leaflet der Membran aus. Dieses exponierte PS wird von Annexin-V gebunden und kann somit in der Durchflusszytometrie erfasst werden. Die Zellen wurden für 48 Stunden in glukosefreier Lösung, der Spermidin in den verschiedenen Konzentrationen zugesetzt war, inkubiert. Dabei ergab sich im Kontrollansatz ohne Spermidin eine Annexin-Bindungsrate von $25,29 \pm 6,73 \%$ ($n=6$), bei einer Spermidin-Konzentration von 1 µg/ml $24,59 \pm 6,95\%$, im Ansatz mit 3 µg/ml Spermidin $23,29 \pm 6,79 \%$ und bei Zusatz von 10 µg/ml Spermidin $22,80 \pm 6,7\%$. Diese Abnahme der PS-Exposition ist statistisch signifikant ($p < 0,05$ bei Spermidin-Konzentrationen von 3 µg/ml und 10 µg/ml).

Ergebnisse

Im Folgenden sind die Messwerte grafisch zusammengefasst.

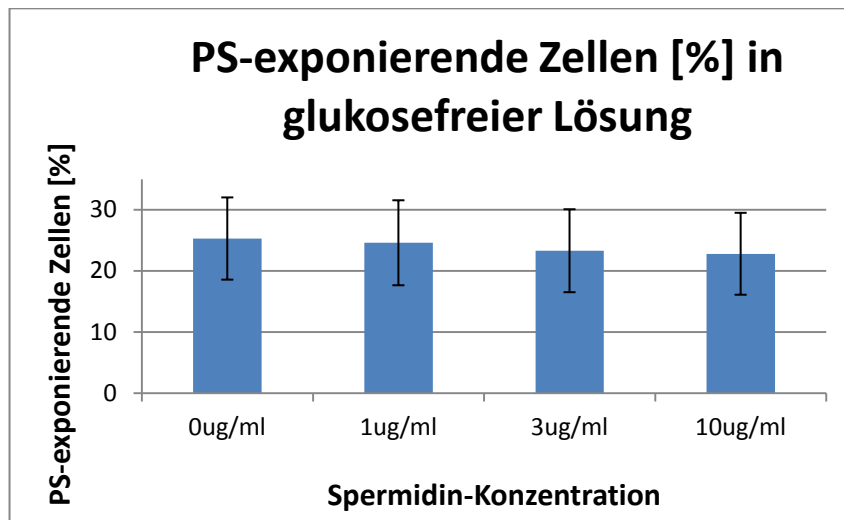


Abb. 24: Anteil der PS-exponierenden Zellen nach 48-stündiger Inkubation in glukosefreier Lösung, der Spermidin in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt war.

Das folgende Histogramm zeigt eine repräsentative Messung eines Kontrollansatzes und eines Ansatzes mit 10 µg/ml Spermidin.

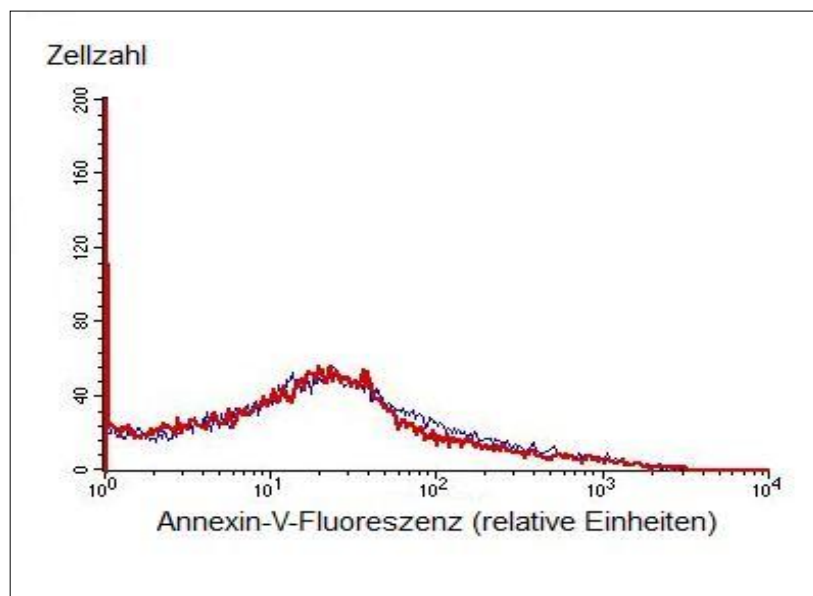


Abb. 25: repräsentatives Histogramm einer Messung der Annexin-V-Fluoreszenz nach 48 stündiger Inkubation in glukosefreiem Medium (blaue Kurve) und in glukosefreiem Medium, das zusätzlich Spermidin (10 µg/ml) enthielt (rote Kurve)

Ergebnisse

Des Weiteren wurde untersucht, ob Spermidin auch die PS-Exposition, die durch Chloridentzug ausgelöst wird, beeinflusst. Dazu wurde die Annexinbindung der Zellen nach 48-stündiger Inkubation in chloridfreier Lösung, die Spermidin in den entsprechenden Konzentrationen enthielt, gemessen. Im Kontrollansatz zeigte sich eine Annexinbindung von $13,15 \pm 7,09$ % ($n=6$), im Ansatz mit $1 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $11,61 \pm 4,45$ %, bei einer Spermidin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ exponierten $11,64 \pm 3,84$ % der Erythrozyten Phosphatidylserin, unter Einfluss von $10 \mu\text{g/ml}$ Spermidin zeigten $9,85 \pm 4,31$ % der Zellen Annexinbindung. Die geringe Abnahme der Annexinbindung bei steigenden Spermidin-Konzentrationen ist statistisch nicht signifikant.

Um die durch hyperosmolaren Schock ausgelöste Eryptose zu beurteilen, wurden die Erythrozyten für 6 Stunden in einer 700 mosomol/l Lösung inkubiert. Dieser Lösung war Spermidin in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Es zeigte sich im Kontrollansatz eine Annexinbindungsrate von $26,53 \pm 8,06$ % ($n=3$). Im Ansatz mit Spermidin in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ banden $22,87 \pm 3,46$ % der Zellen Annexin. Die PS-Exposition bei einer Spermidin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ betrug $20,04 \pm 6,94$ % und bei einer Spermidin-Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ $25,97 \pm 7,46$ %. Spermidin beeinflusste die PS-Exposition nach 6-stündiger Inkubation in hyperosmolarer Lösung nicht signifikant.

3.7.2. Auswirkungen von Spermidin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Um die Auswirkungen von Spermidin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration sichtbar zu machen, wurden die Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Fluo-3 angefärbt.

Ergebnisse

Nach Inkubation in Ringerlösung zeigte sich im Kontrollansatz eine Fluo-3-Fluoreszenz von $17,33 \pm 5,61$ ($n=6$). Im Ansatz mit $1 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $18,69 \pm 3,93$, bei einer Spermidin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ $18,92 \pm 3,53$ und bei $10 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $18,71 \pm 4,26$. Spermidin beeinflusste die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Erythrozyten nach Inkubation in Ringerlösung nicht.

Ebenso wie die Annexin-Bindung wurde auch die Fluo-3-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in glukosefreier Lösung gemessen. Dabei zeigte sich im Kontrollansatz ohne Spermidin eine Fluo-3-Fluoreszenz von $48,30 \pm 12,10$, bei $1 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $46,02 \pm 12,20$, im Ansatz mit einer Spermidin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ $46,20 \pm 12,55$ und bei $10 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $46,62 \pm 12,98$. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in glukosefreier Lösung durch Spermidin.

Inkubation in chloridfreier Lösung wirkt als weiterer Stressor und lässt die intrazelluläre Kalziumkonzentration ansteigen. Im Kontrollansatz zeigten die Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in chloridfreier Lösung eine Fluo-3-Fluoreszenz von $28,15 \pm 6,21$ ($n=6$). Bei einer Spermidin-Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ betrug die Fluo-3-Fluoreszenz $20,73 \pm 3,39$, im Ansatz mit $3 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $20,52 \pm 3,89$ und im Ansatz mit $10 \mu\text{g/ml}$ Spermidin $19,61 \pm 3,98$. Diese Minderung der Fluo-3-Fluoreszenz ist statistisch signifikant ($p < 0,05$ für alle getesteten Spermidin-Konzentrationen).

Die folgende Abbildung stellt die Messergebnisse grafisch dar.

Ergebnisse

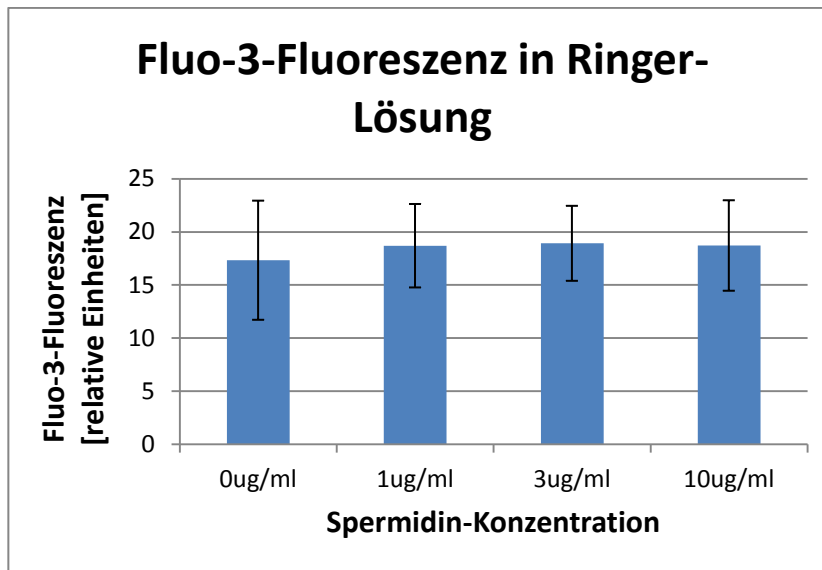


Abb 26: Beeinflussung der Fluo-3-Fluoreszenz (in relativen Einheiten angegeben, da nicht kalibriert werden kann) der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in chloridfreier Lösung, die Spermidin in den entsprechenden Konzentrationen enthält.

Das folgende Histogramm zeigt eine repräsentative Messung eines Kontrollansatzes und eines Ansatzes mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Spermidin.

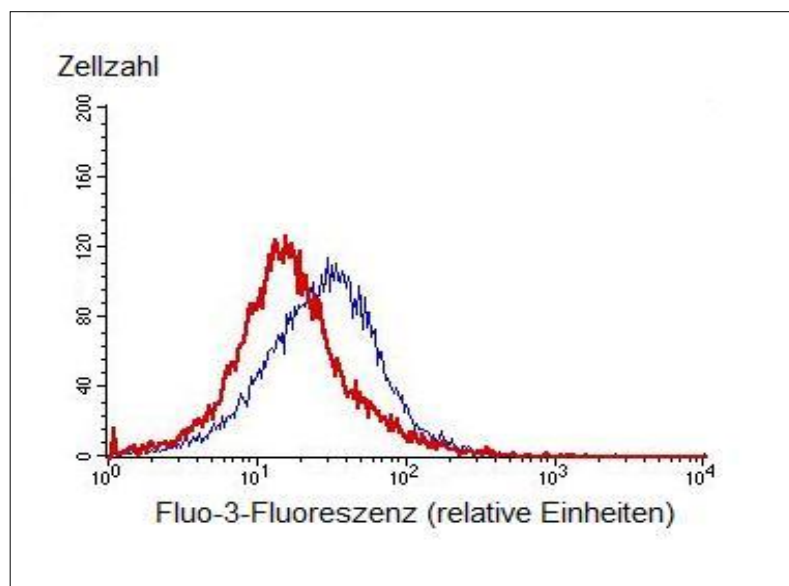


Abb. 26: repräsentatives Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Zellen in chloridfreiem Medium (blaue Kurve) und in chloridfreiem Medium mit Spermidin (10 $\mu\text{g/ml}$, rote Kurve).

Ergebnisse

Inkubation in hyperosmolarer Lösung dient als weiterer Stressor für die Erythrozyten, deren intrazelluläre Kalziumkonzentration dadurch ansteigt. Die Erythrozyten wurden für 6 Stunden in einer Lösung mit 700 mosmol/l inkubiert, die die entsprechenden Spermidin-Konzentrationen enthielt. Im Kontrollansatz zeigte sich eine Fluo-3-Fluoreszenz von $21,22 \pm 2,11$ (n=3). Im Ansatz mit einer Spermidin-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ betrug die Fluo-3-Fluoreszenz $20,14 \pm 1,42$, bei 3 $\mu\text{g/ml}$ Spermidin $21,21 \pm 2,25$ und bei einer Spermidin-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ $20,98 \pm 1,52$. Spermidin beeinflusste die Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten nach 6-stündiger Inkubation in einer Lösung mit 700 mosmol/l nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1. Methodendiskussion

Sowohl die Durchflusszytometrie als auch die Patch-Clamp-Technik sind valide und etablierte Verfahren, die schon seit längerem in der Erforschung der erythrozytären Apoptose eingesetzt werden. Die in den Experimenten eingesetzten Lösungen wurden unter möglichst sterilen Bedingungen hergestellt und verarbeitet. Um Verunreinigungen zu vermeiden wurden die Lösungen in regelmäßigen Abständen erneuert. Die eingesetzten Lösungen und Substanzen wurden bei Nichtgebrauch verschlossen in Kühl- bzw. Gefrierschrank gelagert. Dieselbe Charge von Lösungen und Substanzen diente der zeitgleichen Erstellung von n=3 Ansätzen, denen Erythrozyten verschiedener Blutgruppen zugegeben wurde. Das Durchflusszytometer wurde regelmäßig gereinigt und mit frischer Trägerflüssigkeit gefüllt, um eine möglichst exakte Messung zu gewährleisten.

Nach Inkubation der Erythrozyten in reiner Ringerlösung zeigten sich Eryptoseraten von etwa 3 %. Dabei handelt es sich wohl um die Summe von physiologisch vorkommender Eryptose und Eryptose, die durch die unphysiologischen Versuchsbedingungen wie etwa das Fehlen der Plasmaumgebung erklärt werden kann. Trotz sorgfältigen Arbeitens traten vereinzelt Eryptoseraten in den Kontrollansätzen von über 6 % auf. Dies könnte durch Verunreinigungen der Lösungen verursacht worden sein. Bei Vorliegen solcher Ergebnisse in den Kontrollen wurden die Werte dieser Messung aus der Auswertung genommen. Das Verhältnis der Erythrozyten zu den Lösungen in den Experimenten ergab einen Hämatokrit von 0,4 %. Dieser Wert liegt deutlich unter dem in vivo vorkommenden physiologischen Wert von ca. 40 %, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken könnte. Der geringere Hämatokrit hat jedoch technische Vorteile. Die Konzentration der eingesetzten Stoffe im Versuchsansatz bleibt konstant und wird nicht durch eine eventuelle Aufnahme des Stoffes in die Zelle verfälscht. Außerdem gewährleistet der geringe Hämatokrit bessere Fließeigenschaften in der Durchflusszytometrie. Die geringere Zellzahl im Versuchsansatz

kann auch einen intensiveren Kontakt der Substanz mit den Zellen ermöglichen. Dieser intensive Kontakt könnte die mangelnde Inkubationszeit in gewisser Weise ausgleichen. In den Experimenten wurden die Proben für 48 Stunden inkubiert. In vivo sind die Erythrozyten den im Blut vorkommenden Stoffen jedoch deutlich länger ausgesetzt, meist über die ganze Lebensspanne des roten Blutkörperchens, die etwa 120 Tage beträgt.

4.2. Ergebnisdiskussion

4.2.1. Einfluss von Sphingosin auf den apoptotischen Zelltod der Erythrozyten

Sphingosin und S1P spielen eine wichtige Rolle als Regulatoren des Überlebens und Sterbens von Zellen. Dabei wirkt Sphingosin proapoptotisch, während S1P eher der Apoptose entgegen wirkt und das Zellüberleben fördert. Über die Auswirkungen dieser beider Sphingolipide auf den Zellzyklus der Erythrozyten war bisher wenig bekannt. Ceramid, das im Zentrum des Sphingolipidmetabolismus steht und aus dem Sphingosin und S1P synthetisiert werden, stimuliert den suizidalen Zelltod der Erythrozyten (Lang et al. 2003c; Lang et al. 2010). Dies wirft die Frage auf, ob auch Sphingosin und S1P die Erythrozyten beeinflussen. Die Experimente zeigen die Stimulation der Eryptose durch Sphingosin, eine bisher unbekannt Funktion des Sphingolipids. Inkubation mit Sphingosin führt zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels der Erythrozyten. Kalzium bewirkt die Öffnung von Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen sowie von Chloridkanälen. Der folgende osmotisch bedingte Wasserverlust führt zur Schrumpfung der Zelle. Dies konnte durch die Abnahme der Werte im FSC gezeigt werden.

Zusätzlich zeigten die Patch-Clamp-Experimente eine erhöhte Kationenleitfähigkeit. Das intrazelluläre Kalzium aktiviert die Scramblase. Dadurch wird PS auf dem äußeren Leaflet der Membran der Erythrozyten präsentiert, was die Annexin-Messungen bestätigten. Keiner dieser Effekte konnte durch S1P ausgelöst werden. Erythrozyten speichern S1P. Sie zeigen zwar nur eine geringe

Aktivität der Sphingosinkinase, die Sphingosin zu S1P phosphoryliert, S1P-abbauende Enzyme fehlen jedoch völlig, was das Anhäufen von S1P im Erythrozyten ermöglicht (Yang et al. 1999; Ito et al. 2007). Dies lässt mutmaßen, dass die Sphingosinkinase die Zellen durch die Umwandlung von Sphingosin in S1P vor dem durch Sphingosin induzierten suizidalen Zelltod schützt.

Sphingolipide beeinflussen die Zellfunktionen auf verschiedene Wege. Sie beeinflussen Kinasen, verändern die Genexpression, wirken durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren und über Stickoxid, ein Molekül, das als potenter Inhibitor der Eryptose das Erythrozytenüberleben beeinflusst (Nicolay et al. 2008). Die Aktivität der SK, die Sphingosin zu S1P phosphoryliert und damit einen proapoptotischen Mediator in ein das Zellüberleben förderndes Molekül umwandelt, kann über das Schicksal der Zelle entscheiden. So wirkt die SK1 in Mesangiumzellen der Niere (Hofmann et al. 2008) und in glatten Muskelzellen der Gefäße (You et al. 2007) antiapoptotisch. S1P ist ein wichtiger Regulator von Proliferation, Wachstum und Überleben der Zelle sowie Inflammation, Angiogenese und Vaskulogenese. Auch in vielen pathophysiologischen Prozessen spielen Sphingolipide eine wichtige Rolle. Viele Krebserkrankungen zeigen einen veränderten Sphingolipid-Metabolismus (Ogretmen and Hannun 2004; Saddoughi et al. 2008; Ponnusamy et al. 2010), unter anderem maligne hämatologische Erkrankungen (Ekiz and Baran 2010). Durch eine geringere Anhäufung von Ceramid wird die Apoptose umgangen (Beckham et al. 2010). Dies birgt auch Potentiale für die Entwicklung neuer Therapeutika (Billich and Baumruker 2008; Oskouian and Saba 2010). Die SK, die S1P aus Sphingosin bildet, ist in vielen Krebserkrankungen überexprimiert und schützt die Zellen vor Apoptose (Vadas et al. 2008; Cuvillier et al. 2010). Damit ist sie ein potentiell Zielprotein für die Krebstherapie (Cuvillier 2008; Shida et al. 2008; Gangoiti et al. 2010; Leong and Saba 2010; Ren et al. 2010). In vielen Tumorgeweben ist die saure Ceramidase hochreguliert. Dadurch entsteht ein dysfunktionaler Ceramid-Signalweg, der für die Tumorprogression und die Resistenz gegenüber Chemotherapie und Radiatio verantwortlich ist (Liu et al. 2009).

Sphingolipide spielen eine Rolle bei Entzündungen. Dies bietet neue Therapieziele für die Behandlung pathologischer inflammatorischer Reaktionen (Nixon

2009). Sphingolipide sind an der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt (Morris et al. 2009; Kuebler et al. 2010; Li et al. 2010). S1P wirkt kardioprotektiv (Karliner 2004). Auch Sphingosin ist in physiologischen Konzentrationen ein Kardioprotektor (Vessey et al. 2008). S1P wirkt auf Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen, reguliert den Tonus, die Gefäßpermeabilität und die Gewebepерfusion (McVerry and Garcia 2005; Lucke and Levkau 2010). Ceramid und andere Sphingolipide spielen eine Rolle in der Entstehung von Insulinresistenz, Kardiomyopathie, vaskulärer Dysfunktion und Adipositas (Holland and Summers 2008). Eine Inhibition der SK1 schützt endotheliale Zellen vor dem Schaden, den erhöhte Glukosespiegel im Blut hervorrufen. S1P ist demnach an der Entstehung vaskulärer Schäden durch Hyperglykämie beim Diabetes mellitus beteiligt (Wang et al. 2005; You et al. 2007). Sphingolipide spielen eine Rolle in der Pathogenese von cystischer Fibrose (Teichgraber et al. 2008; Becker et al. 2010), Lungenfibrose (Dhami et al. 2010) und Asthma (Lai et al. 2011). Ceramid ist am Alterungsprozess des Gehirns beteiligt (Costantini et al. 2006). Ceramid wird als Antwort auf Stimuli, die mit Neurodegeneration assoziiert sind, gebildet und induziert Apoptose (Arboleda et al. 2007). Auch in der Entstehung des Morbus Alzheimer spielen Lipidmediatoren eine Rolle (Li et al. 2009; Farooqui et al. 2010). S1P ist an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie der Multiplen Sklerose (Jana and Pahan 2010) und rheumatoider Arthritis (Graler 2010) beteiligt. Sphingolipide im Darm spielen eine Rolle bei Entzündungen, der Reaktion auf Pathogene und die Tumorentstehung (Duan and Nilsson 2009).

Die Rolle der Sphingolipide in den verschiedensten Pathologien eröffnet neue Möglichkeiten für die Behandlung. Die Sphingomyelinasen stellen potentielle Ziele pharmakologischer Beeinflussung dar (Claus et al. 2009; Kornhuber et al. 2010).

Das Immunsuppressivum FTY720 wird im Körper durch die SK2 phosphoryliert und wirkt dann als S1P-Rezeptor Agonist. Im Gegensatz zu der antiapoptotischen Aktivität von S1P induziert FTY720 jedoch die Apoptose von verschiedenen kernhaltigen Zellen (Potteck et al. 2010) und von Erythrozyten (Eberhard et al. 2010).

Als Folge der Sphingosin-induzierten Eryptose ist mit dem Auftreten einer Anämie zu rechnen. PS-exponierende Erythrozyten werden, ebenso wie kernhaltige Zellen, die Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche präsentieren, von speziellen Rezeptoren auf Makrophagen erkannt und phagozytiert (Boas et al. 1998; Fadok et al. 2000). Auf diese Weise werden die eryptotischen Zellen schnell aus der Zirkulation entfernt. Diese Beseitigung defekter Erythrozyten ist wichtig, um der Hämolyse zuvorzukommen. Außerdem wird durch das schnelle Entfernen der eryptotischen Erythrozyten das Wachstum intraerythrozytärer Parasiten, wie *Plasmodium falciparum*, begrenzt. Der Organismus schützt sich somit durch gesteigerte Eryptose infizierter Blutkörperchen vor der Ausbreitung der Infektion (Foller et al. 2009).

Zusätzlich zu dem Einfluss auf das Überleben der Erythrozyten könnte die durch Sphingosin induzierte Eryptose auch die Mikrozirkulation beeinflussen. PS-exponierende Zellen können an die Gefäßwand binden (Wood et al. 1996; Andrews and Low 1999; Clossé et al. 1999). Dabei interagiert PS mit Matrix-Thrombospondin (Manodori et al. 2000). Außerdem wird eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen induziert (Pandolfi et al. 2007). Darüber hinaus stimulieren PS-exponierende Erythrozyten die Bildung von Prothrombinase und Tenase, was den Aufbau von Thrombin und die Gerinnung begünstigt (Zwaal et al. 2005; Chung et al. 2007). Dies erklärt die verstärkte Thromboseneigung bei Patienten mit Erkrankungen, die mit erhöhter Eryptose einhergehen, beispielsweise bei Sichelzellanämie (Stuart and Setty 2001), Thalassämie (Cappellini et al. 2012) oder unter Behandlung mit Chemotherapeutika (Lü et al. 2008).

Manche Bakterien können Eryptose induzieren, was bei einer Sepsis klinisch relevant wird. Diese bakteriell induzierte Eryptose resultiert zumindest teilweise aus der Interaktion von bakteriellen Zellwandkomponenten wie Lipoproteinen mit der erythrozytären Zellwand (Wang et al. 2008). Neben einer Anämie durch den gesteigerten Suizid der roten Blutkörperchen ist die PS-Exposition, die durch bakterielle Lipoproteine verursacht wird, durch die gesteigerte Gefäßadhärenz auch für thromboembolische Komplikationen in der Sepsis verantwortlich (Zwaal et al. 2005). Lysophosphatidsäure, ebenso wie S1P ein

Lysophospholipid, bewirkt in Erythrozyten eine PS-Exposition und prokoagulante Mikrovesikulation und induziert so thrombotische Aktivität. Die PS-Exposition, die durch Lysophosphatidsäure ausgelöst wird, kann durch PKC-Inhibitoren gehemmt werden, was für eine Beteiligung des PKC an dem Signalmechanismus spricht (Chung et al. 2007).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Sphingosin, im Gegensatz zu S1P, den Kalzium-Einstrom in Erythrozyten stimuliert. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumaktivität führt zur Zellschrumpfung und zum Zellmembran-Scrambling mit folgender Exposition von Phosphatidylserin an der Erythrozytenoberfläche. Dies sind Schlüsselereignisse im suizidalen Zelltod der Erythrozyten.

4.2.2. Wirkung der biogenen Amine Spermin und Spermidin auf die Eryptose

Die physiologische Spermin-Konzentration im Blutplasma beträgt $0,14 \mu\text{M}$ (Baylin et al. 1980). Die Spermin-Konzentration in Erythrozyten nimmt mit dem Alter der Zelle ab. Sie beträgt $14 \mu\text{M}$ in jungen Zellen und $3 \mu\text{M}$ in alten Zellen (Cooper et al. 1976).

Die Wirkungen von Spermin sind konzentrationsabhängig. In der Durchflusszytometrie führen hohe Spermin-Konzentrationen (2 mM), denen die Erythrozyten ausgesetzt sind, zu einer Steigerung der Annexin-V-Bindung und der Fluo-3-Fluoreszenz sowie zur Abnahme der Zellgröße (Kucherenko and Lang 2010). Diese typischen Merkmale der Eryptose deuten auf die Toxizität von millimolaren Konzentrationen von Spermin hin. Spermin-Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis zu 10 mM führen bei Inside-Out-Vesikeln aus der Membran von Ratten-Erythrozyten zu einer gesteigerten Kalzium-Aufnahme. Dabei lagert sich Spermin an der Außenseite der Vesikel an. Dies spricht für einen Effekt an der inneren Erythrozyten-Membran-Oberfläche, über den Spermin die Aufnahme von Kalzium in Erythrozyten bewirkt (Kohno et al. 1997).

Eine Spermin-Konzentration von $200 \mu\text{M}$ in humanen Erythrozyten hat einen gegenteiligen Effekt. Es führt zu einer Abschwächung der Annexin-Bindung,

Diskussion

einer verminderten Zellschrumpfung und einer Hemmung des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Effekte konnten bei einer Spermin-Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ nicht beobachtet werden (Kucherenko and Lang 2010).

Die in den Experimenten eingesetzten Sperminkonzentrationen betragen $1 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$ und $10 \mu\text{g/ml}$. Daraus ergeben sich molare Konzentrationen von $4,9 \mu\text{M}$, $14,8 \mu\text{M}$ und $49 \mu\text{M}$. Damit liegen die eingesetzten Konzentrationen über der physiologisch im Blutplasma vorkommenden Konzentration von $0,14 \mu\text{M}$ (Baylin et al. 1980). Bestimmte klinische Bedingungen führen allerdings zu einer Erhöhung des Spermin-Spiegels, dazu gehören cystische Fibrose (Cohen et al. 1976), Psoriasis (Proctor et al. 1975) und maligne Erkrankungen (Russell 1971; Rennert et al. 1976).

In den durchgeführten Experimenten wurden die Polyamine in das Inkubationsmedium gegeben und nicht in die Zelle eingebracht. Der Erythrozyt ist jedoch der Lage ist, Spermin und Spermidin aufzunehmen. Dabei wird Spermidin deutlich schneller aufgenommen als Spermin (Moulinoux et al. 1984). Die Aufnahme erfolgt über einen spezifischen Transporter, der temperaturabhängig ist (Moulinoux et al. 1984). Die Spermidin-Aufnahme ist sättigbar und nicht pH-abhängig (Fukumoto and Byus 1996). Sie erfolgt über verschiedene Polyamin-Transport-Systeme in den verschiedenen Zelltypen (Seiler and Dezeure 1990). In Erythrozyten existiert ein energieabhängiger Transporter (Khan et al. 1989). In glukosefreiem Medium konnte eine geringe Verminderung der PS-Exposition beobachtet werden ($25,71 \%$ ohne Sperminzugabe, $23,04 \%$ bei einer Spermin-Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$). Bei Inkubation in chloridfreiem Medium sowie unter osmotischem Schock konnte keine signifikante Veränderung der PS-Exposition durch Spermin beobachtet werden. Die Kalziumkonzentration der Erythrozyten wurde durch Spermin in keinem der getesteten Stressmedien signifikant beeinflusst.

Dennoch sprechen Patch-Clamp-Experimente für einen Einfluss von Spermin auf die Kationenleitfähigkeit der Erythrozyten. Bei intrazellulärer Zugabe von Spermin in subphysiologischer Konzentration ($0,2 \mu\text{M}$) zeigt sich eine signifikante Verminderung der Leitfähigkeit für monovalente Ionen und für

Kalzium (Kucherenko and Lang 2010). Auch extrazelluläres Spermin (0,2 μM und 200 μM) vermindert die Kationenleitfähigkeit. Spermin (0,2 μM) schwächt die durch Chlorid-Entzug getriggerte Stimulation von spannungs-unabhängigen Kalziumkanälen und hemmt die Steigerung der Kationenleitfähigkeit (Kucherenko and Lang 2010).

Spermidin bildet einen Zwischenschritt in der Spermin-Synthese und hat ebenso wie Spermin multiple Wirkungen, es kann Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beeinflussen und moduliert Ionenkanäle. Die Experimente zeigen, dass auch Spermidin in der Lage ist, die Exposition von PS nach Inkubation in glukosefreiem Medium signifikant zu vermindern. Für Spermidin konnte eine signifikante Verminderung der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation in chloridfreier Lösung gezeigt werden. Die Fluo-3-Fluoreszenz dient als Maß für die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Diese steigt bei der Eryptose an, da unselektive Kationenkanäle stimuliert werden. Das einströmende Kalzium ist für die weiteren charakteristischen Schritte der Eryptose, wie die Umverteilung der Phospholipide, essentiell.

Der Mechanismus, über den die Polyamine der Eryptose entgegenwirken, bleibt unklar. Eine potentielle Möglichkeit wäre die Wirkung der Polyamine über AMPA-Rezeptoren. Polyamine sind in der Lage, AMPA-Rezeptoren zu blockieren (Koh et al. 1995; Washburn and Dingledine 1996; Williams 1997). Diese AMPA-Rezeptoren kommen auch in Erythrozyten vor. NBQX, ein AMPA-Rezeptor-Antagonist und wie Spermin und Spermidin ein Polyamin, führt zu einer Schwächung der Eryptose-spezifischen Prozesse. Die Exposition von PS wird geschwächt, die Zellgröße nimmt weniger ab und der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration fällt unter Einfluss von NBQX geringer aus (Föller et al. 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Spermin und Spermidin (jeweils in den Konzentrationen 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$) den suizidalen Zelltod der Erythrozyten in geringem Maße hemmen. Dabei konnte eine Minderung der PS-Exposition bei Inkubation in glukosefreier Lösung nachgewiesen werden, die auf Chloridentzug oder hyperosmotischen Schock folgende PS-Exposition wurde jedoch nicht signifikant beeinflusst. Der Anstieg der intrazellulären

Kalziumkonzentration nach Inkubation in chloridfreier Lösung wurde durch Spermidin signifikant gehemmt. Diese signifikante Hemmung erfolgte jedoch nicht nach Inkubation in glukosefreiem Medium oder hyperosmolarer Lösung. Spermin konnte den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Inkubation in den verschiedenen Stressmedien nicht beeinflussen.

4.3. Relevanz der Ergebnisse und Ausblick

Sowohl der Sphingolipidmetabolismus, die Polyamine als auch die Eryptose spielen eine Rolle im Pathomechanismus zahlreicher Erkrankungen. Eine genauere Kenntnis der beteiligten Mechanismen und des Zusammenspiels der verschiedenen Faktoren könnte den Weg für die Entwicklung zahlreicher neuer Medikamente bahnen. Aufgrund des im Vergleich zu kernhaltigen Zellen einfachen Aufbaus des Erythrozyten kann die Erforschung der Eryptose Kenntnisse über die Apoptose liefern, da dort wohl die gleichen Mechanismen eine Rolle spielen, diese aber durch die komplexeren Vorgänge, wie etwa der Beteiligung des Mitochondriums, verdeckt sind. Die genaue Analyse des suizidalen Zelltodes – einem elementaren biologischen Ereignis - wird helfen, die komplexe Physiologie und Pathophysiologie des Menschen besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und keine Organellen, so dass ihnen wesentliche Elemente für die Apoptose fehlen. Dennoch zeigen sie eine spezielle Form des suizidalen Zelltods, die Eryptose. Die Eryptose zeichnet sich durch den Einstrom von Kalzium in die Zelle aus. Kalzium aktiviert Kaliumkanäle. Der Verlust von Kalium führt zum Ausstrom von Chlorid und Wasser, die Zelle schrumpft. Außerdem wird die Scramblase, ein Enzym, das Phosphatidylserin vom inneren auf das äußere Leaflet der Membran transportiert, durch Kalzium aktiviert.

Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind Sphingolipide, die als Signalmoleküle dienen. Sphingosin wirkt proapoptotisch, S1P schützt die Zelle vor Apoptose. Ceramid, ein Molekül, das im Zentrum des Sphingolipidmetabolismus steht, ist ein bekannter Trigger der Eryptose.

Wichtige Funktionen der Zelle, wie Zellzyklus und Apoptose, werden durch die biogenen Polyamine Spermin und Spermidin beeinflusst. Sie können auch Ionenkanäle modifizieren.

Experimente wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Sphingolipide Sphingosin und S1P sowie die biogenen Polyamine Spermin und Spermidin die Eryptose beeinflussen. Die charakteristischen Merkmale der Eryptose wurden mit einem Durchflusszytometer gemessen. Durch Auswertung des Forward-Scatter-Signals wurde die relative Größe der Zelle gemessen und die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch Färbung mit Fluo-3 bestimmt. Die Phosphatidylserin-Exposition auf der Oberfläche der Erythrozyten konnte durch die Bindung von Annexin-V quantifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Sphingosin zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, einer Verringerung des Zellvolumens und zu gesteigerter Exposition von Phosphatidylserin führt. S1P bewirkt keine dieser Veränderungen. Sphingosin ist, im Gegensatz zu S1P, somit ein potenter Induktor der Eryptose.

Zusammenfassung

Es kann vermutet werden, dass Spermin und Spermidin in geringen Konzentrationen (10 µg/ml) vor Eryptose schützt, die durch Inkubation der Erythrozyten in verschiedenen Stressmedien ausgelöst wurde.

6. Literatur

- Adams, J. M. (2003).** "Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis." *Genes & Development* **17**(20): 2481-2495.
- Akel, A., T. Hermle, O. M. Niemoeller, D. S. Kempe, P. A. Lang, P. Attanasio, M. Podolski, T. Wieder and F. Lang (2006).** "Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine." *European Journal of Pharmacology* **532**(1-2): 11-17.
- Allan, D. and R. H. Michell (1977).** "Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions." *Biochemical Journal* **166**(3): 495-499.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996).** "Human ice/ced-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Ameisen, J. C. (1994).** "Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: Relevance to aids and cancer." *AIDS* **8**(9): 1197-1213.
- Amendola, R., M. Cervelli, E. Fratini, F. Polticelli, D. E. Sallustio and P. Mariottini (2009).** "Spermine metabolism and anticancer therapy." *Current cancer drug targets* **9**
- Andree, H. A., C. P. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H. C. Hemker, W. T. Hermens and G. M. Willems (1990).** "Binding of vascular anticoagulant alpha (vac alpha) to planar phospholipid bilayers." *Journal of Biological Chemistry* **265**(9): 4923-4928.
- Andrews, D. A. and P. S. Low (1999).** "Role of red blood cells in thrombosis." *Current Opinion in Hematology* **6**(2): 76-82.
- Andrews, D. A., L. Yang and P. S. Low (2002).** "Phorbol ester stimulates a protein kinase c-mediated agatoxin-tk-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells." *Blood* **100**(9): 3392-3399.
- Arboleda, G., T.-J. Huang, C. Waters, A. Verkhatsky, P. Fernyhough and R. M. Gibson (2007).** "Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway is inhibited by c2-ceramide in cad cells." *European Journal of Neuroscience* **25**(10): 3030-3038.

- Averill-Bates, D. A., Q. Ke, A. Tanel, J. Roy, G. Fortier and E. Agostinelli (2008).** "Mechanism of cell death induced by spermine and amine oxidase in mouse melanoma cells." *International Journal of Oncology* **32**
- Babbar, N., E. W. Gerner and R. A. Casero (2006).** "Induction of spermidine/spermine n1-acetyltransferase (ssat) by aspirin in caco-2 colon cancer cells." *The Biochemical journal* **394**
- Ballas, S. K., N. Mohandas, L. J. Marton and S. B. Shoet (1983).** "Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(eng).
- Barry, P. H. and J. W. Lynch (1991).** "Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis." *Journal of Membrane Biology* **121**(2): 101-117.
- Bartke, N. and Y. A. Hannun (2009).** "Bioactive sphingolipids: Metabolism and function." *Journal of Lipid Research* **50 Suppl**: S91-96.
- Basu, S., D. Banerjee, M. Ghosh and A. Chakrabarti (2010).** "Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome." *Hematology* **15**(4): 236-239.
- Baylin, S. B., B. J. Rosenstein, L. J. Marton and D. H. Lockwood (1980).** "Age-related abnormalities of circulating polyamines and diamine oxidase activity in cystic fibrosis heterozygotes and homozygotes." *Pediatric Research* **14**(eng).
- Becker, K. A., H. Grassme, Y. Zhang and E. Gulbins (2010).** "Ceramide in pseudomonas aeruginosa infections and cystic fibrosis." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 57-66.
- Beckham, T. H., S. Elojeimy, J. C. Cheng, L. S. Turner, S. R. Hoffman, J. S. Norris and X. Liu (2010).** "Targeting sphingolipid metabolism in head and neck cancer: Rational therapeutic potentials." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **14**(5): 529-539.
- Berg, C. P., I. H. Engels, A. Rothbart, K. Lauber, A. Renz, S. F. Schlosser, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg (2001).** "Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis." *Cell Death & Differentiation* **8**(12): 1197-1206.
- Billich, A. and T. Baumruker (2008).** "Sphingolipid metabolizing enzymes as novel therapeutic targets." *Sub-Cellular Biochemistry* **49**: 487-522.

- Birka, C., P. A. Lang, D. S. Kempe, L. Hoefling, V. Tanneur, C. Durantou, S. Nammi, G. Henke, S. Myssina, M. Krikov, S. M. Huber, T. Wieder and F. Lang (2004).** "Enhanced susceptibility to erythrocyte "Apoptosis" Following phosphate depletion." *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **448**(5): 471-477.
- Boas, F. E., L. Forman and E. Beutler (1998).** "Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(6): 3077-3081.
- Bode, C., S.-C. Sensken, U. Peest, G. Beutel, F. Thol, B. Levkau, Z. Li, R. Bittman, T. Huang, M. Tölle, M. van der Giet and M. H. Gräler (2010).** "Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate." *Journal of Cellular Biochemistry* **109**(6): 1232-1243.
- Bokoch, G. M., A. M. Reilly, R. H. Daniels, C. C. King, A. Olivera, S. Spiegel and U. G. Knaus (1998).** "A gtpase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids." *The Journal of biological chemistry* **273**
- Bonomini, M., V. Sirolli, F. Gizzi, S. Di Stante, A. Grilli and M. Felaco (2002).** "Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: Role of phosphatidylserine exposure." *Kidney International* **62**(4): 1358-1363.
- Bortner, C. D. and J. A. Cidlowski (1998).** "A necessary role for cell shrinkage in apoptosis." *Biochemical Pharmacology* **56**(12): 1549-1559.
- Bosman, G. J. C. G. M., F. L. A. Willekens and J. M. Werre (2005).** "Erythrocyte aging: A more than superficial resemblance to apoptosis?" *Cellular Physiology & Biochemistry* **16**(1-3): 1-8.
- Bratosin, D., J. Estaquier, F. Petit, D. Arnoult, B. Quatannens, J. P. Tissier, C. Slomianny, C. Sartiaux, C. Alonso, J. J. Huart, J. Montreuil and J. C. Ameisen (2001).** "Programmed cell death in mature erythrocytes: A model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria." *Cell Death & Differentiation* **8**(12): 1143-1156.
- Bratton, D. L. (1994).** "Polyamine inhibition of transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the erythrocyte ghost." *The Journal of biological chemistry* **269**
- Bratton, D. L., V. A. Fadok, D. A. Richter, J. M. Kailey, S. C. Frasch, T. Nakamura and P. M. Henson (1999).** "Polyamine regulation of plasma membrane phospholipid flip-flop during apoptosis." *The Journal of biological chemistry* **274**.

- Bridges, D. and G. B. G. Moorhead (2005).** "14-3-3 proteins: A number of functions for a numbered protein." *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**
- Bucki, R., C. Bachelot-Loza, A. Zachowski, F. Giraud and J. C. Sulpice (1998).** "Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways." *Biochemistry* **37**
- Cappellini, M. D., K. M. Musallam, E. Poggiali and A. T. Taher (2012).** "Hypercoagulability in non-transfusion-dependent thalassemia." *Blood reviews* **26 Suppl 1**
- Casero, R. A. and L. J. Marton (2007).** "Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases." *Nature reviews. Drug discovery* **6**
- Cervelli, M., R. Amendola, F. Polticelli and P. Mariottini (2012).** "Spermine oxidase: Ten years after." *Amino acids* **42**
- Chattopadhyay, M. K., W. Chen, G. Poy, M. Cam, D. Stiles and H. Tabor (2009).** "Microarray studies on the genes responsive to the addition of spermidine or spermine to a *saccharomyces cerevisiae* spermidine synthase mutant." *Yeast (Chichester, England)* **26**
- Christian, B. E., M. E. Haque and L. L. Spremulli (2010).** "The effect of spermine on the initiation of mitochondrial protein synthesis." *Biochemical and biophysical research communications* **391**
- Chung, S.-M., O.-N. Bae, K.-M. Lim, J.-Y. Noh, M.-Y. Lee, Y.-S. Jung and J.-H. Chung (2007).** "Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes." *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* **27(2): 414-421.**
- Clarke, P. G. and S. Clarke (1996).** "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena." *Anatomy & Embryology* **193(2): 81-99.**
- Claus, R. A., M. J. Dorer, A. C. Bunck and H. P. Deigner (2009).** "Inhibition of sphingomyelin hydrolysis: Targeting the lipid mediator ceramide as a key regulator of cellular fate." *Current Medicinal Chemistry* **16(16): 1978-2000.**
- Clément, S., J. G. Delcros and B. G. Feuerstein (1995).** "Spermine uptake is necessary to induce haemoglobin synthesis in murine erythroleukaemia cells." *The Biochemical journal* **312 Pt 3**

- Closse, C., J. Dachary-Prigent and M. R. Boisseau (1999).** "Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium." *British Journal of Haematology* **107**(2): 300-302.
- Cohen, L. F., D. W. Lundgren and P. M. Farrell (1976).** "Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subjects." *Blood* **48**(eng).
- Conti, A. A., D. Lippi and G. F. Gensini (2005).** "The historical evolution of the concept of apoptosis in rheumatic diseases." *Reumatismo* **57**(1): 57-61.
- Contreras, F. X., J. Sot, A. Alonso and F. M. Goni (2006).** "Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes." *Biophysical Journal* **90**(11): 4085-4092.
- Cooper, K. D., J. B. Shukla and O. M. Rennert (1976).** "Polyamine distribution in cellular compartments of blood and in aging erythrocytes." *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **73**(eng).
- Corash, L., S. Spielberg, C. Bartsocas, L. Boxer, R. Steinherz, M. Sheetz, M. Egan, J. Schlesselman and J. D. Schulman (1980).** "Reduced chronic hemolysis during high-dose vitamin e administration in mediterranean-type glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *New England Journal of Medicine* **303**(8): 416-420.
- Costantini, C., H. Scoble and L. Puglielli (2006).** "An aging pathway controls the trka to p75^{ntr} receptor switch and amyloid beta-peptide generation." *EMBO Journal* **25**(9): 1997-2006.
- Curtin, J. F. and T. G. Cotter (2003).** "Apoptosis: Historical perspectives." *Essays in Biochemistry* **39**: 1-10.
- Cuvillier, O. (2002).** "Sphingosine in apoptosis signaling." *Biochimica et Biophysica Acta* **1585**
- Cuvillier, O. (2008).** "Downregulating sphingosine kinase-1 for cancer therapy." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **12**(8): 1009-1020.
- Cuvillier, O., I. Ader, P. Bouquerel, L. Brizuela, B. Malavaud, C. Mazerolles and P. Rischmann (2010).** "Activation of sphingosine kinase-1 in cancer: Implications for therapeutic targeting." *Current Molecular Pharmacology* **3**(2): 53-65.
- Daugas, E., C. Cande and G. Kroemer (2001).** "Erythrocytes: Death of a mummy." *Cell Death & Differentiation* **8**(12): 1131-1133.

- Davis, R. J., N. Gironès and M. Faucher (1988).** "Two alternative mechanisms control the interconversion of functional states of the epidermal growth factor receptor." *The Journal of biological chemistry* **263**
- Dekkers, D. W. C., P. Comfurius, E. M. Bevers and R. F. A. Zwaal (2002).** "Comparison between Ca^{2+} -induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells." *Biochemical Journal* **362**(Pt 3): 741-747.
- Denault, J.-B. and G. S. Salvesen (2002).** "Caspases: Keys in the ignition of cell death." *Chemical Reviews* **102**(12): 4489-4500.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999).** "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes & Development* **13**(3): 239-252.
- Dhami, R., X. He and E. H. Schuchman (2010).** "Acid sphingomyelinase deficiency attenuates bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis in mice." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(4-5): 749-760.
- Donevan, S. D. and M. A. Rogawski (1995).** "Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca^{2+} -permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000).** "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Duan, R.-D. and A. Nilsson (2009).** "Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development." *Progress in Lipid Research* **48**(1): 62-72.
- Durantón, C., S. M. Huber and F. Lang (2002).** "Oxidation induces a Cl^{-} -dependent cation conductance in human red blood cells." *Journal of Physiology* **539**(Pt 3): 847-855.
- Eberhard, M., K. Ferlinz, K. Alizzi, P. M. Cacciato, C. Faggio, M. Foller and F. Lang (2010).** "Fty720-induced suicidal erythrocyte death." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(4-5): 761-766.
- Eda, S. and I. W. Sherman (2002).** "Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine." *Cellular Physiology & Biochemistry* **12**(5-6): 373-384.
- Eisele, K., P. A. Lang, D. S. Kempe, B. A. Klarl, O. Niemöller, T. Wieder, S. M. Huber, C. Durantón and F. Lang (2006).** "Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions." *Toxicology & Applied Pharmacology* **210**(1-2): 116-122.

- Ekiz, H. A. and Y. Baran (2010).** "Therapeutic applications of bioactive sphingolipids in hematological malignancies." *International Journal of Cancer* **127**(7): 1497-1506.
- Elabbadi, N., M. L. Ancelin and H. J. Vial (1997).** "Phospholipid metabolism of serine in plasmodium-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation." *Biochemical Journal* **324**(Pt 2): 435-445.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan and H. R. Horvitz (1991).** "Mechanisms and functions of cell death." *Annual Review of Cell Biology* **7**: 663-698.
- Fadeel, B. and S. Orrenius (2005).** "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." *Journal of Internal Medicine* **258**(6): 479-517.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson (1992).** "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *Journal of Immunology* **148**(7): 2207-2216.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz and P. M. Henson (2000).** "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." *Nature* **405**(6782): 85-90.
- Farooqui, A. A., W.-Y. Ong and T. Farooqui (2010).** "Lipid mediators in the nucleus: Their potential contribution to alzheimer's disease." *Biochimica et Biophysica Acta* **1801**(8): 906-916.
- Ficker, E., M. Taglialatela, B. A. Wible, C. M. Henley and A. M. Brown (1994).** "Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier k⁺ channels." *Science (New York, N.Y.)* **266**
- Foller, M., E. Shumilina, R. Lam, W. Mohamed, R. Kasinathan, S. Huber, T. Chakraborty and F. Lang (2007).** "Induction of suicidal erythrocyte death by listeriolysin from *listeria monocytogenes*." *Cellular Physiology & Biochemistry* **20**(6): 1051-1060.
- Foller, M., R. S. Kasinathan, S. Koka, C. Lang, E. Shumilina, L. Birnbaumer, F. Lang and S. M. Huber (2008a).** "Trpc6 contributes to the ca²⁺ leak of human erythrocytes." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **21**
- Foller, M., R. S. Kasinathan, S. Koka, C. Lang, E. Shumilina, L. Birnbaumer, F. Lang and S. M. Huber (2008b).** "Trpc6 contributes to the ca²⁺ leak of human erythrocytes." *Cellular Physiology & Biochemistry* **21**(1-3): 183-192.

- Foller, M., D. Bobbala, S. Koka, S. M. Huber, E. Gulbins and F. Lang (2009).** "Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria." *Cellular Physiology & Biochemistry* **24**(3-4): 133-140.
- Foller, M., M. Braun, S. M. Qadri, E. Lang, H. Mahmud and F. Lang (2010).** "Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death." *European Journal of Clinical Investigation* **40**(6): 534-540.
- Föller, M., S. M. Huber and F. Lang (2008).** "Erythrocyte programmed cell death." *IUBMB Life* **60**(10): 661-668.
- Föller, M., H. Mahmud, S. Gu, Y. Kucherenko, E.-M. Gehring, E. Shumilina, E. Floride, R. Sprengel and F. Lang (2009).** "Modulation of suicidal erythrocyte cation channels by an ampa antagonist." *Journal of cellular and molecular medicine* **13**
- Fukumoto, G. H. and C. V. Byus (1996).** "A kinetic characterization of putrescine and spermidine uptake and export in human erythrocytes." *Biochimica et Biophysica Acta* **1282**
- Gangoiti, P., L. Camacho, L. Arana, A. Ouro, M. H. Granado, L. Brizuela, J. Casas, G. Fabrias, J. L. Abad, A. Delgado and A. Gomez-Munoz (2010).** "Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease." *Progress in Lipid Research* **49**(4): 316-334.
- Gavin, I. M., D. Glesne, Y. Zhao, C. Kubera and E. Huberman (2004).** "Spermine acts as a negative regulator of macrophage differentiation in human myeloid leukemia cells." *Cancer research* **64**
- Gerner, C., J. Gotzmann, U. Frohwein, C. Schamberger, A. Ellinger and G. Saueremann (2002).** "Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation." *Cell Death & Differentiation* **9**(6): 671-681.
- Ghafourifar, P., S. D. Klein, O. Schucht, U. Schenk, M. Pruschy, S. Rocha and C. Richter (1999).** "Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state." *Journal of Biological Chemistry* **274**(10): 6080-6084.
- Goetzl, E. J. and H. Rosen (2004).** "Regulation of immunity by lysosphingolipids and their g protein-coupled receptors." *The Journal of Clinical Investigation* **114**(11): 1531-1537.

- Goetzl, E. J., W. Wang, C. McGiffert, M.-C. Huang and M. H. Gräler (2004).** "Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system." *Journal of Cellular Biochemistry* **92**(6): 1104-1114.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007).** "Cell death by necrosis: Towards a molecular definition." *Trends in Biochemical Sciences* **32**(1): 37-43.
- Graler, M. H. (2010).** "Targeting sphingosine 1-phosphate (s1p) levels and s1p receptor functions for therapeutic immune interventions." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 79-86.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998).** "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-1312.
- Gulbins, E., A. Jekle, K. Ferlinz, H. Grassmé and F. Lang (2000).** "Physiology of apoptosis." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **279**(4): F605-F615.
- Hacker, G. and A. Weber (2007).** "Bh3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?" *Archives of Biochemistry & Biophysics* **462**(2): 150-155.
- Halestrap, A. P., G. P. McStay and S. J. Clarke (2002).** "The permeability transition pore complex: Another view." *Biochimie* **84**(2-3): 153-166.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981).** "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **391**(2): 85-100.
- Hanel, P., P. Andreani and M. H. Graler (2007).** "Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood." *FASEB Journal* **21**(4): 1202-1209.
- Head, D. J., Z. E. Lee, M. M. Swallah and N. D. Avent (2005).** "Ligation of cd47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability in vitro." *British Journal of Haematology* **130**(5): 788-790.
- Hermle, T., E. Shumilina, P. Attanasio, A. Akel, D. S. Kempe, P. A. Lang, M. Podolski, S. Gatz, R. Bachmann, C. Bachmann, H. Abele, S. Huber, T. Wieder and F. Lang (2006).** "Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **291**(4): C710-717.

- Hill, M. M., C. Adrain and S. J. Martin (2003).** "Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." *Molecular Interventions* **3**(1): 19-26.
- Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber and S. J. Korsmeyer (1990).** "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." *Nature* **348**(6299): 334-336.
- Hofmann, L. P., S. Ren, S. Schwalm, J. Pfeilschifter and A. Huwiler (2008).** "Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner." *Biological Chemistry* **389**(11): 1399-1407.
- Holland, W. L. and S. A. Summers (2008).** "Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism." *Endocrine Reviews* **29**(4): 381-402.
- Huber, S. M., N. Gamper and F. Lang (2001).** "Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts." *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **441**(4): 551-558.
- Huettenbrenner, S., S. Maier, C. Leisser, D. Polgar, S. Strasser, M. Grusch and G. Krupitza (2003).** "The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity." *Mutation Research* **543**(3): 235-249.
- Igarashi, K. and K. Kashiwagi (2010).** "Modulation of cellular function by polyamines." *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**
- Isa, T., M. Iino, S. Itazawa and S. Ozawa (1995).** "Spermine mediates inward rectification of Ca^{2+} -permeable ampa receptor channels." *Neuroreport* **6**.
- Ito, K., Y. Anada, M. Tani, M. Ikeda, T. Sano, A. Kihara and Y. Igarashi (2007).** "Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes." *Biochemical & Biophysical Research Communications* **357**(1): 212-217.
- Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997).** "Programmed cell death in animal development." *Cell* **88**(3): 347-354.
- Jana, A. and K. Pahan (2010).** "Sphingolipids in multiple sclerosis." *NeuroMolecular Medicine* **12**(4): 351-361.
- Johnson, G. V. and R. P. Guttman (1997).** "Calpains: Intact and active?" *Bioessays* **19**(11): 1011-1018.

- Kaestner, L. and I. Bernhardt (2002).** "Ion channels in the human red blood cell membrane: Their further investigation and physiological relevance." *Bioelectrochemistry* **55**(1-2): 71-74.
- Karliner, J. S. (2004).** "Mechanisms of cardioprotection by lysophospholipids." *Journal of Cellular Biochemistry* **92**(6): 1095-1103.
- Kempe, D. S., P. A. Lang, K. Eisele, B. A. Klarl, T. Wieder, S. M. Huber, C. Duranton and F. Lang (2005).** "Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **288**(2): C396-402.
- Kempe, D. S., P. A. Lang, C. Duranton, A. Akel, K. S. Lang, S. M. Huber, T. Wieder and F. Lang (2006).** "Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes." *FASEB Journal* **20**(2): 368-370.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972).** "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British Journal of Cancer* **26**(4): 239-257.
- Khan, N. A., V. Quemener and J. P. Moulinoux (1989).** "Characterization of na⁺-dependent and system a-independent polyamine transport in normal human-erythrocytes." *Biochemical Archives* **5**(2): 161-169.
- Khan, N. A., V. Quemener and P. Moulinoux (1990).** "Inhibition of adenylate cyclase activity by polyamines in human erythrocyte plasma membranes." *Life sciences* **46**
- Klarl, B. A., P. A. Lang, D. S. Kempe, O. M. Niemoeller, A. Akel, M. Sobiesiak, K. Eisele, M. Podolski, S. M. Huber, T. Wieder and F. Lang (2006).** "Protein kinase c mediates erythrocyte "Programmed cell death" Following glucose depletion." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **290**(1): C244-253.
- Kobayashi, N., N. Kobayashi, A. Yamaguchi and T. Nishi (2009).** "Characterization of the atp-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes." *Journal of Biological Chemistry* **284**(32): 21192-21200.
- Koh, D. S., N. Burnashev and P. Jonas (1995).** "Block of native ca⁽²⁺⁾-permeable ampa receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification." *The Journal of physiology* **486** (Pt 2)
- Kohno, H., K. Sasaki, M. Yamaguchi and Y. Ohkubo (1997).** "Spermine modulates calcium flux through the rat erythrocyte membrane." *Biological & pharmaceutical bulletin* **20**

- Kornhuber, J., P. Tripal, M. Reichel, C. Muhle, C. Rhein, M. Muehlbacher, T. W. Groemer and E. Gulbins (2010).** "Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (fiasmas): A novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 9-20.
- Krammer, P. H. (2000).** "Cd95's deadly mission in the immune system." *Nature* **407**(6805): 789-795.
- Kristiansen, M., J. H. Graversen, C. Jacobsen, O. Sonne, H. J. Hoffman, S. K. Law and S. K. Moestrup (2001).** "Identification of the haemoglobin scavenger receptor." *Nature* **409**(6817): 198-201.
- Kucherenko, Y. V. and F. Lang (2010).** "Inhibition of cation channels in human erythrocytes by spermine." *The Journal of membrane biology* **237**(Department of Physiology Institute I, Eberhard-Karls Universität Tübingen, 72076 Tübingen, Germany.).
- Kuebler, W. M., Y. Yang, R. Samapati and S. Uhlig (2010).** "Vascular barrier regulation by paf, ceramide, caveolae, and no - an intricate signaling network with discrepant effects in the pulmonary and systemic vasculature." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 29-40.
- Kurata, H. T., L. J. Marton and C. G. Nichols (2006).** "The polyamine binding site in inward rectifier k⁺ channels." *The Journal of general physiology* **127**
- Kuypers, F. A. and K. de Jong (2004).** "The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes." *Cellular & Molecular Biology* **50**(2): 147-158.
- Lai, W.-Q., W. S. F. Wong and B. P. Leung (2011).** "Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in asthma." *Bioscience Reports* **31**(2): 145-150.
- Lang, F., K. S. Lang, T. Wieder, S. Myssina, C. Birka, P. A. Lang, S. Kaiser, D. Kempe, C. Duranton and S. M. Huber (2003a).** "Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte." *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **447**(2): 121-125.
- Lang, F., P. A. Lang, K. S. Lang, V. Brand, V. Tanneur, C. Duranton, T. Wieder and S. M. Huber (2004a).** "Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria." *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **448**(3): 319-324.
- Lang, F., K. S. Lang, P. A. Lang, S. M. Huber and T. Wieder (2006a).** "Mechanisms and significance of eryptosis." *Antioxidants & Redox Signaling* **8**(7-8): 1183-1192.

- Lang, F., K. S. Lang, P. A. Lang, S. M. Huber and T. Wieder (2006b).** "Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes." *Acta Physiologica* **187**(1-2): 191-198.
- Lang, F., E. Gulbins, H. Lerche, S. M. Huber, D. S. Kempe and M. Foller (2008).** "Eryptosis, a window to systemic disease." *Cell Physiol Biochem* **22**(5-6): 373-380.
- Lang, F., E. Gulbins, P. A. Lang, D. Zappulla and M. Foller (2010).** "Ceramide in suicidal death of erythrocytes." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 21-28.
- Lang, K. S., B. Roll, S. Myssina, M. Schittenhelm, H.-G. Scheel-Walter, L. Kanz, J. Fritz, F. Lang, S. M. Huber and T. Wieder (2002).** "Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *Cellular Physiology & Biochemistry* **12**(5-6): 365-372.
- Lang, K. S., C. Duranton, H. Poehlmann, S. Myssina, C. Bauer, F. Lang, T. Wieder and S. M. Huber (2003b).** "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes." *Cell Death & Differentiation* **10**(2): 249-256.
- Lang, K. S., S. Myssina, V. Brand, C. Sandu, P. A. Lang, S. Berchtold, S. M. Huber, F. Lang and T. Wieder (2003c).** "Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes." *Cell Death Differ* **11**(2): 231-243.
- Lang, K. S., S. Myssina, V. Tanneur, T. Wieder, S. M. Huber, F. Lang and C. Duranton (2003d).** "Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **367**(4): 391-396.
- Lang, K. S., S. Myssina, P. A. Lang, V. Tanneur, D. S. Kempe, A. F. Mack, S. M. Huber, T. Wieder, F. Lang and C. Duranton (2004b).** "Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and cl." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **286**(6): F1046-1053.
- Lang, K. S., P. A. Lang, C. Bauer, C. Duranton, T. Wieder, S. M. Huber and F. Lang (2005a).** "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." *Cell Physiol Biochem* **15**(5): 195-202.
- Lang, P. A., S. Kaiser, S. Myssina, T. Wieder, F. Lang and S. M. Huber (2003e).** "Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human erythrocyte apoptosis." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **285**(6): C1553-1560.

- Lang, P. A., D. S. Kempe, A. Akel, B. A. Klarl, K. Eisele, M. Podolski, T. Hermle, O. M. Niemoeller, P. Attanasio, S. M. Huber, T. Wieder, F. Lang and C. Duranton (2005b).** "Inhibition of erythrocyte "Apoptosis" By catecholamines." *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **372(3)**: 228-235.
- Lang, P. A., D. S. Kempe, S. Myssina, V. Tanneur, C. Birka, S. Laufer, F. Lang, T. Wieder and S. M. Huber (2005c).** "Pge(2) in the regulation of programmed erythrocyte death." *Cell Death & Differentiation* **12(5)**: 415-428.
- Lang, P. A., D. S. Kempe, V. Tanneur, K. Eisele, B. A. Klarl, S. Myssina, V. Jendrossek, S. Ishii, T. Shimizu, M. Waidmann, G. Hessler, S. M. Huber, F. Lang and T. Wieder (2005d).** "Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor." *Journal of Cell Science* **118(Pt 6)**: 1233-1243.
- Lang, P. A., O. Beringer, J. P. Nicolay, O. Amon, D. S. Kempe, T. Hermle, P. Attanasio, A. Akel, R. Schafer, B. Friedrich, T. Risler, M. Baur, C. J. Olbricht, L. B. Zimmerhackl, P. F. Zipfel, T. Wieder and F. Lang (2006c).** "Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome." *Journal of Molecular Medicine* **84(5)**: 378-388.
- Lang, P. A., M. Schenck, J. P. Nicolay, J. U. Becker, D. S. Kempe, A. Lupescu, S. Koka, K. Eisele, B. A. Klarl, H. Rubben, K. W. Schmid, K. Mann, S. Hildenbrand, H. Hefter, S. M. Huber, T. Wieder, A. Erhardt, D. Haussinger, E. Gulbins and F. Lang (2007).** "Liver cell death and anemia in wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide." *Nature Medicine* **13(2)**: 164-170.
- Lee, J. M. and A. Bernstein (1995).** "Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene." *Cancer & Metastasis Reviews* **14(2)**: 149-161.
- Leong, W. I. and J. D. Saba (2010).** "S1p metabolism in cancer and other pathological conditions." *Biochimie* **92(6)**: 716-723.
- Li, H., C. Costantini, H. Scrable, R. Weindruch and L. Puglielli (2009).** "Egr-1 and hipk2 are required for the trka to p75(ntr) switch that occurs downstream of igf1-r." *Neurobiology of Aging* **30(12)**: 2010-2020.
- Li, X., K. A. Becker and Y. Zhang (2010).** "Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26(1)**: 41-48.
- Liu, G., C. Wu, Y. Wu and Y. Zhao (2006).** "Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation." *Scandinavian Journal of Immunology* **64(1)**: 1-9.

- Liu, X., J. C. Cheng, L. S. Turner, S. Elojeimy, T. H. Beckham, A. Bielawska, T. E. Keane, Y. A. Hannun and J. S. Norris (2009).** "Acid ceramidase upregulation in prostate cancer: Role in tumor development and implications for therapy." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **13**(12): 1449-1458.
- Lopatin, A. N., E. N. Makhina and C. G. Nichols (1994).** "Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification." *Nature* **372**
- Lorenz, H. M., M. Herrmann, T. Winkler, U. Gaipf and J. R. Kalden (2000).** "Role of apoptosis in autoimmunity." *Apoptosis* **5**(5): 443-449.
- Lucke, S. and B. Levkau (2010).** "Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 87-96.
- Lü, C.-f., H.-j. Yu, J.-x. Hou and J. Zhou (2008).** "Increased procoagulant activity of red blood cells in the presence of cisplatin." *Chinese medical journal* **121**
- Lutz, H. U. (2004).** "Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance." *Cellular & Molecular Biology* **50**(2): 107-116.
- Ma, Y., S. Pitson, T. Hercus, J. Murphy, A. Lopez and J. Woodcock (2005).** "Sphingosine activates protein kinase a type ii by a novel camp-independent mechanism." *The Journal of biological chemistry* **280**
- Mahmud, H., D. Mauro, S. M. Qadri, M. Foller and F. Lang (2009).** "Triggering of suicidal erythrocyte death by amphotericin b." *Cellular Physiology & Biochemistry* **24**(3-4): 263-270.
- Malhi, H., G. J. Gores and J. J. Lemasters (2006).** "Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths?" *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S31-44.
- Mandal, D., P. K. Moitra, S. Saha and J. Basu (2002).** "Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes." *FEBS Letters* **513**(2-3): 184-188.
- Mandal, D., V. Baudin-Creuzat, A. Bhattacharyya, S. Pathak, J. Delaunay, M. Kundu and J. Basu (2003).** "Caspase 3-mediated proteolysis of the n-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)." *Journal of Biological Chemistry* **278**(52): 52551-52558.
- Manodori, A. B., G. A. Barabino, B. H. Lubin and F. A. Kuypers (2000).** "Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin." *Blood* **95**(4): 1293-1300.

- Mansat, V., A. Bettaieb, T. Levade, G. Laurent and J. P. Jaffrezou (1997).** "Serine protease inhibitors block neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin." *FASEB Journal* **11**(8): 695-702.
- Marton, L. J. and A. E. Pegg (1995).** "Polyamines as targets for therapeutic intervention." *Annual review of pharmacology and toxicology* **35**
- Matarrese, P., E. Straface, D. Pietraforte, L. Gambardella, R. Vona, A. Maccaglia, M. Minetti and W. Malorni (2005).** "Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases." *FASEB Journal* **19**(3): 416-418.
- McDonald, O. B., Y. A. Hannun, C. H. Reynolds and N. Sahyoun (1991).** "Activation of casein kinase ii by sphingosine." *The Journal of biological chemistry* **266**
- McIntyre, J. A. (2003).** "Antiphospholipid antibodies in implantation failures." *American Journal of Reproductive Immunology* **49**(4): 221-229.
- McVerry, B. J. and J. G. N. Garcia (2005).** "In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: Mechanistic insights." *Cellular Signalling* **17**(2): 131-139.
- Megidish, T., J. Cooper, L. Zhang, H. Fu and S. Hakomori (1998).** "A novel sphingosine-dependent protein kinase (sdk1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein." *The Journal of biological chemistry* **273**
- Melino, G., R. A. Knight and D. R. Green (2001).** "Publications in cell death: The golden age." *Cell Death & Differentiation* **8**(1): 1-3.
- Minta, A., J. P. Kao and R. Y. Tsien (1989).** "Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores." *Journal of Biological Chemistry* **264**(14): 8171-8178.
- Miramar, M. D., P. Costantini, L. Ravagnan, L. M. Saraiva, D. Haouzi, G. Brothers, J. M. Penninger, M. L. Peleato, G. Kroemer and S. A. Susin (2001).** "Nadh oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Journal of Biological Chemistry* **276**(19): 16391-16398.
- Miura, Y. and Y. Koyanagi (2005).** "Death ligand-mediated apoptosis in hiv infection." *Reviews in Medical Virology* **15**(3): 169-178.
- Miyamoto, S., K. Kashiwagi, K. Ito, S. Watanabe and K. Igarashi (1993).** "Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in escherichia coli." *Archives of biochemistry and biophysics* **300**

- Miyoshi, H., K. Umeshita, M. Sakon, S. Imajoh-Ohmi, K. Fujitani, M. Gotoh, E. Oiki, J. Kambayashi and M. Monden (1996).** "Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury.[erratum appears in gastroenterology 1996 nov;111(5):1402]." *Gastroenterology* **110**(6): 1897-1904.
- Morris, A. J., M. Panchatcharam, H. Y. Cheng, L. Federico, Z. Fulkerson, S. Selim, S. Miriyala, D. Escalante-Alcalde and S. S. Smyth (2009).** "Regulation of blood and vascular cell function by bioactive lysophospholipids." *Journal of Thrombosis & Haemostasis* **7 Suppl 1**: 38-43.
- Moulinoux, J. P., M. Le Calve, V. Quemener and G. Quash (1984).** "In vitro studies on the entry of polyamines into normal red blood cells." *Biochimie* **66**(eng).
- Myssina, S., P. A. Lang, D. S. Kempe, S. Kaiser, S. M. Huber, T. Wieder and F. Lang (2004).** "Cl⁻ channel blockers nppb and niflumic acid blunt ca²⁺-induced erythrocyte 'apoptosis'." *Cellular Physiology & Biochemistry* **14**(4-6): 241-248.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997).** "Caspases: Killer proteases." *Trends in Biochemical Sciences* **22**(8): 299-306.
- Nicolay, J. P., S. Gatz, G. Liebig, E. Gulbins and F. Lang (2007).** "Amyloid induced suicidal erythrocyte death." *Cellular Physiology & Biochemistry* **19**(1-4): 175-184.
- Nicolay, J. P., G. Liebig, O. M. Niemoeller, S. Koka, M. Ghashghaieina, T. Wieder, J. Haendeler, R. Busse and F. Lang (2008).** "Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide." *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **456**(2): 293-305.
- Nieminen, A.-L. (2003).** "Apoptosis and necrosis in health and disease: Role of mitochondria." *International Review of Cytology* **224**: 29-55.
- Niemoeller, O. M., A. Akel, P. A. Lang, P. Attanasio, D. S. Kempe, T. Hermle, M. Sobiesiak, T. Wieder and F. Lang (2006a).** "Induction of eryptosis by cyclosporine." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **374**(1): 41-49.
- Niemoeller, O. M., V. Kiedaisch, P. Dreischer, T. Wieder and F. Lang (2006b).** "Stimulation of eryptosis by aluminium ions." *Toxicology & Applied Pharmacology* **217**(2): 168-175.

- Nitta, T., K. Igarashi and N. Yamamoto (2002).** "Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway." *Experimental cell research* **276**
- Nixon, G. F. (2009).** "Sphingolipids in inflammation: Pathological implications and potential therapeutic targets." *British Journal of Pharmacology* **158**(4): 982-993.
- Ogretmen, B. and Y. A. Hannun (2004).** "Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment." *Nature Reviews Cancer* **4**(8): 604-616.
- Okada, T., T. Kajimoto, S. Jahangeer and S.-i. Nakamura (2009).** "Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system." *Cellular Signalling* **21**(1): 7-13.
- Orrenius, S. (2004).** "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death." *Toxicology Letters* **149**(1-3): 19-23.
- Oskouian, B. and J. D. Saba (2010).** "Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism." *Advances in Experimental Medicine & Biology* **688**: 185-205.
- Pandolfi, A., N. Di Pietro, V. Sirolli, A. Giardinelli, S. Di Silvestre, L. Amoroso, P. Di Tomo, F. Capani, A. Consoli and M. Bonomini (2007).** "Mechanisms of uremic erythrocyte-induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells." *Journal of Cellular Physiology* **213**(3): 699-709.
- Papucci, L., L. Formigli, N. Schiavone, A. Tani, M. Donnini, A. Lapucci, F. Perna, A. Tempestini, E. Witort, M. Morganti, D. Nosi, G. E. Orlandini, S. Zecchi Orlandini and S. Capaccioli (2004).** "Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression." *Cell & Tissue Research* **316**(2): 197-209.
- Patwardhan, G. A. and Y.-Y. Liu (2011).** "Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer." *Progress in Lipid Research* **50**(1): 104-114.
- Perrotta, C., C. De Palma and E. Clementi (2008).** "Nitric oxide and sphingolipids: Mechanisms of interaction and role in cellular pathophysiology." *Biological Chemistry* **389**(11): 1391-1397.

- Ponnusamy, S., M. Meyers-Needham, C. E. Senkal, S. A. Saddoughi, D. Sentelle, S. P. Selvam, A. Salas and B. Ogretmen (2010).** "Sphingolipids and cancer: Ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance." *Future Oncology* **6**(10): 1603-1624.
- Pop, C., J. Timmer, S. Sperandio and G. S. Salvesen (2006).** "The apoptosome activates caspase-9 by dimerization." *Molecular Cell* **22**(2): 269-275.
- Potteck, H., B. Nieuwenhuis, A. Luth, M. van der Giet and B. Kleuser (2010).** "Phosphorylation of the immunomodulator fty720 inhibits programmed cell death of fibroblasts via the s1p3 receptor subtype and bcl-2 activation." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 67-78.
- Proctor, M. S., H. V. Fletcher, J. B. Shukla and O. M. Rennert (1975).** "Elevated spermidine and spermine levels in the blood of psoriasis patients." *The Journal of investigative dermatology* **65**(eng).
- Rao, R. V., H. M. Ellerby and D. E. Bredesen (2004).** "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program." *Cell Death & Differentiation* **11**(4): 372-380.
- Reed, J. C. (2002).** "Apoptosis-based therapies." *Nature Reviews Drug Discovery* **1**(2): 111-121.
- Ren, S., C. Xin, J. Pfeilschifter and A. Huwiler (2010).** "A novel mode of action of the putative sphingosine kinase inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole (ski ii): Induction of lysosomal sphingosine kinase 1 degradation." *Cellular Physiology & Biochemistry* **26**(1): 97-104.
- Rennert, O., T. Miale, J. Shukla, D. Lawson and J. Frias (1976).** "Polyamine concentrations in bone marrow aspirates of children with leukemia and other malignancies." *Blood* **47**(eng).
- Reutelingsperger, C. P., G. Hornstra and H. C. Hemker (1985).** "Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord." *European Journal of Biochemistry* **151**(3): 625-629.
- Rice, L. and C. P. Alfrey (2005).** "The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: Physiologic and pathophysiologic manifestations." *Cellular Physiology & Biochemistry* **15**(6): 245-250.
- Rosen, H. and E. J. Goetzl (2005).** "Sphingosine 1-phosphate and its receptors: An autocrine and paracrine network." *Nature Reviews Immunology* **5**(7): 560-570.

- Rudin, C. M. and C. B. Thompson (1997).** "Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death." *Annual Review of Medicine* **48**: 267-281.
- Ruiz-Vela, A., J. T. Opferman, E. H. Y. Cheng and S. J. Korsmeyer (2005).** "Proapoptotic bax and bak control multiple initiator caspases." *EMBO Reports* **6**(4): 379-385.
- Russell, D. H. (1971).** "Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients." *Nature: New biology* **233**(eng).
- Sachs, J. R. (1994).** "Soluble polycations and cationic amphiphiles inhibit volume-sensitive k-cl cotransport in human red cell ghosts." *The American journal of physiology* **266**
- Saddoughi, S. A., P. Song and B. Ogretmen (2008).** "Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics." *Sub-Cellular Biochemistry* **49**: 413-440.
- Saez, M. E., R. Ramirez-Lorca, F. J. Moron and A. Ruiz (2006).** "The therapeutic potential of the calpain family: New aspects." *Drug Discovery Today* **11**(19-20): 917-923.
- Saraste, A. and K. Pulkki (2000).** "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovascular Research* **45**(3): 528-537.
- Schiller, M., N. Blank, P. Heyder, M. Herrmann, U. S. Gaipl, J. R. Kalden and H. M. Lorenz (2005).** "Induction of apoptosis by spermine-metabolites in primary human blood cells and various tumor cell lines." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **10**
- Schipper, R. G., L. C. Penning and A. A. Verhofstad (2000).** "Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: Effectors or protectors?" *Seminars in Cancer Biology* **10**
- Schneider, J., J. P. Nicolay, M. Foller, T. Wieder and F. Lang (2007).** "Suicidal erythrocyte death following cellular k+ loss." *Cellular Physiology & Biochemistry* **20**(1-4): 35-44.
- Schroder, M. (2006).** "The unfolded protein response." *Molecular Biotechnology* **34**(2): 279-290.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter (1998).** "Apoptosis signaling by death receptors." *European Journal of Biochemistry* **254**(3): 439-459.

- Seigneuret, M. and P. F. Devaux (1984).** "Atp-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: Relation to shape changes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**(12): 3751-3755.
- Seiler, N. and F. Dezeure (1990).** "Polyamine transport in mammalian cells." *The International journal of biochemistry* **22**
- Shi, Y. (2002).** "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Molecular Cell* **9**(3): 459-470.
- Shida, D., K. Takabe, D. Kapitonov, S. Milstien and S. Spiegel (2008).** "Targeting sphk1 as a new strategy against cancer." *Current Drug Targets* **9**(8): 662-673.
- Siskind, L., S. Fluss, M. Bui and M. Colombini (2005).** "Sphingosine forms channels in membranes that differ greatly from those formed by ceramide." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **37**(4): 227-236.
- Smith, E. R., A. H. Merrill, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2000).** "Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase c." *Methods in Enzymology* **312**: 361-373.
- Sorimachi, H., S. Ishiura and K. Suzuki (1997).** "Structure and physiological function of calpains." *Biochemical Journal* **328**(Pt 3): 721-732.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003).** "Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**(5): 397-407.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1999).** "Catalytic properties of the caspases." *Cell Death & Differentiation* **6**(11): 1054-1059.
- Stuart, M. J. and B. N. Setty (2001).** "Hemostatic alterations in sickle cell disease: Relationships to disease pathophysiology." *Pediatric pathology & molecular medicine* **20**
- Suhaiman, L., G. A. De Blas, L. M. Obeid, A. Darszon, L. S. Mayorga and S. A. Belmonte (2010).** "Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase are involved in a novel signaling pathway leading to acrosomal exocytosis." *Journal of Biological Chemistry* **285**(21): 16302-16314.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, C. Brenner, N. Larochette, M. C. Prevost, P. M. Alzari and G. Kroemer (1999a).** "Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process." *Journal of Experimental Medicine* **189**(2): 381-394.

- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger and G. Kroemer (1999b).** "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* **397**(6718): 441-446.
- Suzuki, K., S. Hata, Y. Kawabata and H. Sorimachi (2004).** "Structure, activation, and biology of calpain." *Diabetes* **53 Suppl 1**: S12-18.
- Tabor, C. W. and H. Tabor (1984).** "Polyamines." *Annual review of biochemistry* **53**(eng).
- Takabe, K., S. W. Paugh, S. Milstien and S. Spiegel (2008).** ""Inside-out" Signaling of sphingosine-1-phosphate: Therapeutic targets." *Pharmacological Reviews* **60**(2): 181-195.
- Teichgraber, V., M. Ulrich, N. Endlich, J. Riethmuller, B. Wilker, C. C. De Oliveira-Munding, A. M. van Heeckeren, M. L. Barr, G. von Kurthy, K. W. Schmid, M. Weller, B. Tummler, F. Lang, H. Grassme, G. Doring and E. Gulbins (2008).** "Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis." *Nature Medicine* **14**(4): 382-391.
- Thompson, C. B. (1995).** "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* **267**(5203): 1456-1462.
- Thorburn, A., J. Thorburn and A. E. Frankel (2004).** "Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins." *Apoptosis* **9**(1): 19-25.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998).** "Caspases: Enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-1316.
- Tolle, M., M. Schuchardt and M. van der Giet (2010).** "Relevance of sphingolipids in the pleiotropic protective effects of high-density lipoproteins." *Current Pharmaceutical Design* **16**(13): 1468-1479.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000).** "Bcl-2 family: Life-or-death switch." *FEBS Letters* **466**(1): 6-10.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2007).** "Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death." *Apoptosis* **12**(5): 835-840.
- Tsujinaka, S., K. Soda, Y. Kano and F. Konishi (2011).** "Spermine accelerates hypoxia-initiated cancer cell migration." *International Journal of Oncology* **38**

- Twomey, C. and J. V. McCarthy (2005).** "Pathways of apoptosis and importance in development." *Journal of Cellular & Molecular Medicine* **9**(2): 345-359.
- Vadas, M., P. Xia, G. McCaughan and J. Gamble (2008).** "The role of sphingosine kinase 1 in cancer: Oncogene or non-oncogene addiction?" *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**(9): 442-447.
- Vaux, D. L., I. L. Weissman and S. K. Kim (1992).** "Prevention of programmed cell death in *caenorhabditis elegans* by human *bcl-2*." *Science* **258**(5090): 1955-1957.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger (1995).** "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v." *Journal of Immunological Methods* **184**(1): 39-51.
- Vessey, D. A., L. Li, M. Kelley, J. Zhang and J. S. Karliner (2008).** "Sphingosine can pre- and post-condition heart and utilizes a different mechanism from sphingosine 1-phosphate." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **22**(2): 113-118.
- Wallace, H. M. and A. V. Fraser (2003).** "Polyamine analogues as anticancer drugs." *Biochemical Society transactions* **31**
- Wang, K., H. Mahmud, M. Foller, R. Biswas, K. S. Lang, E. Bohn, F. Gotz and F. Lang (2008).** "Lipopeptides in the triggering of erythrocyte cell membrane scrambling." *Cellular Physiology & Biochemistry* **22**(5-6): 381-386.
- Wang, L., X.-P. Xing, A. Holmes, C. Wadham, J. R. Gamble, M. A. Vadas and P. Xia (2005).** "Activation of the sphingosine kinase-signaling pathway by high glucose mediates the proinflammatory phenotype of endothelial cells." *Circulation Research* **97**(9): 891-899.
- Washburn, M. S. and R. Dingledine (1996).** "Block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (ampa) receptors by polyamines and polyamine toxins." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **278**
- Wassell, J. (2000).** "Haptoglobin: Function and polymorphism." *Clinical Laboratory* **46**(11-12): 547-552.
- Watanabe, S., K. Kusama-Eguchi, H. Kobayashi and K. Igarashi (1991).** "Estimation of polyamine binding to macromolecules and atp in bovine lymphocytes and rat liver." *The Journal of biological chemistry* **266**

- Weigert, A., N. Weis and B. Brune (2009).** "Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate." *Immunobiology* **214**(9-10): 748-760.
- Werre, J. M., F. L. A. Willekens, F. H. Bosch, L. D. de Haans, S. G. L. van der Vegt, A. G. van den Bos and G. J. C. G. M. Bosman (2004).** "The red cell revisited--matters of life and death." *Cellular & Molecular Biology* **50**(2): 139-145.
- Willekens, F. L. A., J. M. Werre, J. K. Kruijt, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, Y. A. M. Groenen-Dopp, A. G. van den Bos, G. J. C. G. M. Bosman and T. J. C. van Berkel (2005).** "Liver kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors." *Blood* **105**(5): 2141-2145.
- Williams, K. (1997).** "Interactions of polyamines with ion channels." *The Biochemical journal* **325 (Pt 2)**(Department of Pharmacology, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA 19104-6084, USA.).
- Wood, B. L., D. F. Gibson and J. F. Tait (1996).** "Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: Flow-cytometric measurement and clinical associations." *Blood* **88**(5): 1873-1880.
- Woodcock, J. (2006).** "Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis." *IUBMB Life* **58**(8): 462-466.
- Woodcock, J. M., J. Murphy, F. C. Stomski, M. C. Berndt and A. F. Lopez (2003).** "The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of ser58 at the dimer interface." *The Journal of biological chemistry* **278**
- Woon, L. A., J. W. Holland, E. P. Kable and B. D. Roufogalis (1999).** "Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts." *Cell Calcium* **25**(4): 313-320.
- Xing, H., S. Zhang, C. Weinheimer, A. Kovacs and A. J. Muslin (2000).** "14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate mapk cascades." *The EMBO journal* **19**
- Xu, R., W. Sun, J. Jin, L. M. Obeid and C. Mao (2010).** "Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes." *The FASEB Journal* **24**(7): 2507-2515.
- Yang, L., Y. Yatomi, Y. Miura, K. Satoh and Y. Ozaki (1999).** "Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells." *British Journal of Haematology* **107**(2): 282-293.

- Yang, L., W. Li, Z. Tian, J. Zhao and C. Wang (2011).** "Mononaphthalimide spermidine conjugate induces cell proliferation inhibition and apoptosis in hela cells." *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **25**
- You, B., A. Ren, G. Yan and J. Sun (2007).** "Activation of sphingosine kinase-1 mediates inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis by hyperglycemia." *Diabetes* **56**(5): 1445-1453.
- Zamzami, N., C. Brenner, I. Marzo, S. A. Susin and G. Kroemer (1998).** "Subcellular and submitochondrial mode of action of bcl-2-like oncoproteins." *Oncogene* **16**(17): 2265-2282.
- Zwaal, R. F. A., P. Comfurius and E. M. Bevers (2005).** "Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells." *Cellular & Molecular Life Sciences* **62**(9): 971-988.

7. Anhang

7.1. Publikation

Im Rahmen der Doktorarbeit entstand folgende Publikation:

Qadri, S. M., J. Bauer, C. Zelenak, H. Mahmud, Y. Kucherenko, S. H. Lee, K. Ferlinz and F. Lang (2011).

"Sphingosine but not sphingosine-1-phosphate stimulates suicidal erythrocyte death."

Cellular Physiology and Biochemistry **28**(2): 339-346.

7.2. Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt denen ich danken möchte.

Mein besonderer Dank geht an:

Prof. Dr. Florian Lang für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die immerzu engagierte Betreuung.

PD Dr. Michael Föller für die engagierte Betreuung der experimentellen Arbeit und das immer offene Ohr für Fragen jeder Art.

Meine Laborkollegen Syed M. Quadri, Christine Zelenak, Hasan Mahmud, Yuliya Kucherenko und Syeda Tasneem Towhid, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und die K6PC-5 Versuche sowie die Patch-Clamp-Experimente durchführten.

Alle Mitgliedern des Physiologischen Institutes für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und die ausgeprägte Hilfsbereitschaft.

Meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich stets in Allem unterstützen.

Meine Schwester Manuela für die Hilfe bei technischen Problemen und das Korrekturlesen der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und den Rückhalt während meines Studiums und speziell bei der Erstellung dieser Arbeit.