

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Anatomie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Hildebrand -

**Lassen Erythrozyten bei morphologischer Klassifizierung
eine Abhängigkeit von ihrem Alter oder der Blutgruppe erkennen?**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Bongert, Katrin Susanne Margarete
aus Münster (Westf.)

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. J. Filler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. R. Liljenqvist

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Anatomie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Hildebrand -

Referent: Prof. Dr. Timm Filler

Koreferent: Prof. Dr. U. R. Liljenqvist

Zusammenfassung

Lassen Erythrozyten bei morphologischer Klassifizierung eine Abhängigkeit von ihrem Alter oder der Blutgruppe erkennen?

Bongert, Katrin Susanne Margarete

Menschliche Erythrozyten haben eine begrenzte Lebenszeit von ca. 120 Tagen. Diese simple Feststellung impliziert, dass trotz Fehlen aller Zellorganellen Leben und Sterben eines Erythrozyten gut reguliert sind. Im Laufe der letzten Jahre wurde das Altern der roten Blutkörperchen untersucht, und der Verdacht liegt mittlerweile sehr nahe, dass es sich um eine Sonderform von Apoptose handelt, die durch verschiedene Stoffe getriggert werden kann. Phosphatidylserin (PS), ein Membranlipid, spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Elimination von alternden Zellen.

Aus einem Kollektiv von 20 gesunden, männlichen Probanden wurden jeweils 4 ml Venenblut entnommen. Nach Separierung der Blutbestandteile wurden die Erythrozyten durch Dichtezentrifugation und anschließender Annexin V FLUOS-Inkubation aufgetrennt und PS an der Membranaußenseite detektiert. Sowohl Durchlicht- als auch Reflexionskontrast- und Fluoreszenzbilder identischer Objektstellen wurden mit Hilfe des Reflexionskontrastmikroskops angefertigt und verglichen. Anhand des Adhäsionsverhaltens wurden ca. 34.000 Erythrozyten nach dem von Filler et al. 1996 vorgestellten Klassifikationsschema in fünf verschiedene Klassen unterteilt. Zusätzlich erfolgte eine Blutgruppenbestimmung aller Probanden in der AB0-, Rhesus- und Kell-Klassifikation.

PS konnte in der Fraktion der Erythrozyten mit hoher Dichte eindeutig häufiger markiert werden als in der Fraktion der roten Blutkörperchen mit geringer Dichte, was bestätigt, dass alternde Zellen eine erhöhte Dichte aufweisen. Klasse 5 Erythrozyten sind signifikant häufiger von leichten Erythrozyten vertreten als von schweren. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen PS-Vorkommen und Klassenverteilung nachgewiesen werden. Auch die Blutgruppe hat keinen Einfluss auf eine vermehrte bzw. verminderte PS-Exposition oder Klassenverteilung.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.3.2007

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. FRAGESTELLUNG	4
2. GRUNDLAGEN	6
2.1. DER MENSCHLICHE ERYTHROZYT	6
2.1.1. ERYTHROPOIESE	7
2.1.2. MEMBRANAUFBAU	8
2.1.3. PHOSPHATIDYLSERIN	10
2.1.4. AMINOPHOSPHOLIPID-TRANSLOKASE, FLOPASE UND SCRAMBLASE	11
2.1.5. CASPASEN	14
2.1.6. GHOSTS	15
2.1.7. APOPTOSE	15
2.1.8. RETIKULOENDOTHELIALES SYSTEM	17
2.2. ERYTHROZYTEN ALS WICHTIGSTE TRÄGER VON BLUTGRUPPENEIGENSCHAFTEN	18
2.2.1. AB0-SYSTEM	19
2.2.2. RHESUS-SYSTEM	21
2.2.3. KELL(-CELLANO)-SYSTEM	23
3. MATERIAL UND METHODE	24
3.1. PROBANDEN	24
3.2. OPTIPREP TM	24
3.3. ANNEXIN-V-FLUOS	25
3.4. ZENTRIFUGATION	27
3.5. MIKROSKOPIE	27
3.6. FILME	28
3.6.1. FILMENTWICKLUNG	28
3.7. BLUTGRUPPENBESTIMMUNG	29
3.8. AUSZÄHLUNG	29
3.9. STATISTISCHE DATENVERARBEITUNG	29
3.10. BLUTABNAHME	30
3.10.1. VORVERSUCH	30
3.11. ANSETZEN DER DICHTELÖSUNGEN	30
3.11.1. VORVERSUCH	31
3.11.2. ÜBERPRÜFUNG DER FRAKTIONEN VON ERYTHROZYTEN MIT GERINGER BZW. HOHER DICHTE	31
3.12. WASCHUNG DER BLUTPROBE	32
3.13. NULLPROBE	32
3.14. DICHTEZENTRIFUGATION	32
3.15. ANSETZEN DER ANNEXINLÖSUNG	34

3.16. WASCHUNG DES OBEREN ERYTHROZYTENRINGES UND DES PELLETS	34
3.17. INKUBATION	34
3.18. VORBEREITUNG DER KAMMER	34
3.18.1. VORBEREITUNG DER DECKGLÄSCHEN	35
3.18.2. BEFÜLLUNG DER KAMMER	35
3.19. FOTOGRAFIE	36
<u>4. ERGEBNISSE</u>	<u>37</u>
4.1. ABSOLUTE UND PROZENTUALE VERTEILUNG DER ERYTHROZYTEN	37
4.2. BLUTGRUPPENVERTEILUNG	41
4.3. SIGNIFIKANZEN	44
<u>5. DISKUSSION</u>	<u>48</u>
5.1. AUSBLICK	51
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>53</u>
<u>7. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>54</u>
7.1. GEDRUCKTE QUELLEN	54
7.2. ONLINE-QUELLEN	66
<u>8. DANKSAGUNG</u>	<u>67</u>
<u>9. LEBENSLAUF</u>	<u>68</u>

1. Einleitung

Erythrozyten stellen mengenmäßig den bedeutendsten Anteil der korpuskulären Elemente im menschlichen Blut dar. Es handelt sich um bikonkave-bikonvexe, organellfreie Blutkörperchen, die im Knochenmark produziert und nach 110-130 Tagen hauptsächlich in der Milz und zu einem geringeren Anteil in der Leber abgebaut werden (Schroit et al. 1985). Auf welche Weise ihre Lebenszeit so und so exakt begrenzt wird, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die am meisten genannte Annahme geht von einer Rigiditätsprüfung überalteter Erythrozyten bei der Passage der Poren der Milzsinusendothelien aus.

Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport gehören zu den wichtigsten Aufgaben der Erythrozyten. Sie zeichnen sich zudem durch das Tragen von Blutgruppensubstanzen auf ihrer Oberfläche aus, die aus unterschiedlich aufgebauten Oligosaccharidresten an membrangebundenen Glykoproteinen oder Sphingolipiden bestehen.

Der Membranaufbau von roten Blutkörperchen gehört bisher zu einem der best untersuchten. Die Doppellipidschicht besteht hauptsächlich aus vier Lipiden, dem Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, die zu der Gruppe der Cholinphospholipide gehören, und dem Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, den Aminophospholipiden. Durch den Besitz eines zusätzlichen Membranskeletts, das auf Zytosolseite mit der Membran verbunden ist, kann der Erythrozyt einerseits seine Form aufrechterhalten und sich andererseits extrem deformieren (lassen), um Kapillaren passieren zu können (Manno et al. 2002).

Die Doppellipidmembran weist im gesunden, reifen Erythrozytenzustand eine Asymmetrie bezüglich der Lipidverteilung auf, wobei die Cholinphospholipide hauptsächlich in der äußeren Hälfte und die Aminophospholipide in der inneren Hälfte zu finden sind. Für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Asymmetrie, die eine wichtige physiologische Rolle spielt (Connor et al. 1994), werden die Flipase, auch Aminophospholipidtranslokase genannt, und die weniger spezifische Flopase benötigt,

die unterschiedlich schnell gegen einen elektrochemischen Gradienten arbeiten (Diaz et Schroit 1996, Kuypers 1998). Antagonistisch zu ihnen bewirkt die Aktivierung der Scramblase eine Gleichverteilung der Lipide in der Membran.

Das negativ geladene Aminophospholipid Phosphatidylserin ist als einziges Lipid im gesunden, reifen Erythrozytenzustand nur in einer Membranhälfte zu finden, nämlich in der inneren. Es wurde wiederholt beschrieben, dass eine Phosphatidylserin-Exposition verschiedene Auswirkungen hat. Connor et al. stellten im Jahr 1994 zum ersten Mal aufgrund der Tatsache, dass alternde Zellen vermehrt Phosphatidylserin exponieren, einen Zusammenhang zwischen Alter und Dichte von Erythrozyten fest. Somit wird angenommen, dass alte Phosphatidylserin-präsentierende Erythrozyten eine hohe Dichte aufweisen und durch diese veränderte Lipidasymmetrie mit Hilfe des retikuloendothelialen Systems beseitigt werden. Phagozyten, die zu diesem System gehören, besitzen einen Phosphatidylserin-Rezeptor, mit dem sie Zellen binden und verschlingen können (Fadok et al. 2000). Apoptotische Zellen, die typischerweise das Aminophospholipid nach außen präsentieren, werden auf diese Art und Weise eliminiert. Somit kann Phosphatidylserin als ein Signal für die Aktivierung der Phagozytose angesehen werden. Außerdem haben Phosphatidylserin-präsentierende Erythrozyten eine Katalysatorfunktion in bezug auf die Hämostase, da sie in diesem Fall als „Assistenten“ der Thrombozyten agieren (Bassé et al. 1996, de Jong et al. 2002), und sie können den alternativen Weg des Komplementsystems aktivieren (Kuypers 1998).

Die Frage, inwiefern Erythrozyten einen apoptotischen Vorgang vollziehen, wird seit 1998 diskutiert (Pan et al. 1998). Dieser Selbstzerstörungsprozess konnte bisher in eukaryontischen Zellen identifiziert und nachvollzogen werden. Da rote Blutkörperchen keine Zellorganellen, also auch keinen Kern und kein Mitochondrium besitzen, ist es klar, dass Erythrozyten einen identischen Prozess nicht vollziehen können. Bratosin et al. haben im Jahr 2001 zum ersten Mal ein „Selbstzerstörungsprogramm“, das ohne Mitwirkung von Kern und Mitochondrium arbeitet, identifiziert und beschrieben. Es

wurde deutlich, dass es trotz Fehlen aller Organellen in Erythrozyten zahlreiche Gemeinsamkeiten, wie z. B. eine Phosphatidylserin-Exposition, mit der Apoptose gibt. Die Vermutung, dass es sich schon bei reifen roten Blutkörperchen um Zellen handelt, die bereits eine Apoptose vollzogen haben, wurde von Daugas et al. geäußert (Daugas et al. 2001). Die Annahme basiert auf dem Ausschleusungsprozess im Sinne des Membran bleedings der Zellorganellen in Retikulozyten, konnte in vivo jedoch noch nicht nachvollzogen werden. Diese Hypothesen sind Hintergrund der vorliegenden Arbeit, die u.a. auf der Phosphatidylserin-Exposition von Erythrozyten basiert.

Annexin V ist ein bewährter Fluoreszenzfarbstoff, der sich für den Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition an Erythrozytenoberflächen eignet (Kuypers et al. 1996, Mecklenbrauck 2003, Kuypers et de Jong 2004, Kempe et al. 2005).

Eine Auftrennung von Erythrozyten ist mit der Dichtezentrifugation möglich und erlaubt durch eine anschließende Handauszählung einzelner roter Blutkörperchen eine Aufteilung dieser in fünf Klassen. Das Kriterium für die Klasseneinteilung ist das Interferenzmuster der Erythrozyten, welches im Reflexionskontrastmikroskop untersucht wird. Anhand des Adhäsionsverhaltens an Glas können ferner zwei Typen von roten Blutkörperchen unterschieden werden, wobei Typ I (bestehend vor allem aus Klasse 1 und 2) wenig und Typ II (bestehend vor allem aus Klasse 3, 4 und 5) viel Adhäsion aufweist. Adhäsion wird im Reflexionskontrast anhand Interferenzen 0. Ordnung identifiziert, optisch entsprechend Focal Contacts. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, Rückschlüsse auf Auflagefläche bzw. Ausmaß der zentralen Einsenkung und Umfang der Erythrozyten zuzulassen und diese Daten mit weiteren Informationen, etwa der Dichte/Alter der roten Blutkörperchen zu korrelieren. Es wird angenommen, dass junge Erythrozyten mit einer ausgeprägten zentralen Konkavität eine geringe Auflagefläche auf Glas haben, während ältere Erythrozyten ein immer größeres Adhäsionsverhalten bis hin zur kompletten Auflage aufweisen (Filler et al. 1996, Filler 1998, Mecklenbrauck 2003). Jedoch hat auch der Hydratationszustand einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der zentralen Einsenkung und auf das

Adhäsionsverhalten. Auf das Ausmaß der adhärennten Fläche hat vor allem der pH-Wert des Untersuchungsmediums Einfluss. Unter der Voraussetzung, dass die Fließeigenschaften des Blutes sowohl in der Makro- als auch in der Mikrozirkulation vor allem von den Erythrozyten abhängen, sind deren Adhäsionseigenschaften und zentrale Einsenkung als Ausdruck der Formstabilität und Rigidität wesentliche Faktoren der Rheologie. Sie können damit besonders im Hinblick auf die Arterioskleroseforschung als bedeutend angesehen werden, auch wenn sich auf diesem Gebiet die bisherigen Untersuchungen vorwiegend auf die Beschaffenheit der Gefäßwand und das Endothel beziehen. So wird beispielsweise für Diabetes mellitus die durch die erhöhten Blutglukosewerte höhere Rigidität der Erythrozyten als eine wesentliche Ursache der Mikroangiopathie angesehen (Chung et al. 1993, Chung et al. 1998, Lawall et Angelkort 1999, Kuypers et de Jong 2004). Die Bestimmung der Blutgruppen und das Adhäsionsverhalten von Erythrozyten spielt auch für die Transfusionsmedizin eine entscheidende Rolle. In dieser Studie wurden die Erythrozyten nach dem AB0-System, dem Rhesussystem und der Kell-Klassifikation unterteilt. Die begrenzte Lagerungsfähigkeit von Erythrozytenkonzentraten von maximal 42 Tagen bei zwei bis fünf Grad Celsius (Priehn-Küpper 2003) stellt nicht zuletzt ein wirtschaftliches Problem dar, das auf den gestressten Erythrozytenzustand zurückzuführen ist. Die vorliegende Studie liefert durch Untersuchung des Adhäsionsverhaltens einen Beitrag zu Ursache und möglichen Lösungsansätzen dieser Problematik.

1.1. Fragestellung

Als Grundlage für die vorliegende Arbeit diene die schon von mehreren Forschergruppen beobachtete vermehrte Phosphatidylserin-Exposition bei alternden Erythrozyten (Connor et al. 1994, Mecklenbrauck 2003).

Die Untersuchung soll zum einen die von Mecklenbrauck in ihrer Pilotstudie gefundenen Ergebnisse bezüglich der Phosphatidylserin-Exposition bei alternden

Erythrozyten und der Fragestellung, ob sich Erythrozyten-Subpopulationen mit Apoptose-Markern identifizieren lassen, auf einem statistisch relevanten Niveau validieren. Zum anderen wird im Rahmen dieser Studie untersucht, ob es Zusammenhänge (Korrelationen) zwischen den verschiedenen Blutgruppenantigenen und den Parametern Erythrozytenklasse und Phosphatidylserin-Exposition gibt.

2. Grundlagen

2.1. Der menschliche Erythrozyt

Erythrozyten stellen mit einer Gesamtmenge von $2,5 \times 10^{13}$ im menschlichen Blut den mengenmäßig bedeutendsten Anteil der korpuskulären Elemente dar. Ihr Abbau findet nach 110-130 Tagen in Milz und Leber statt, wobei die Milz in dieser Hinsicht etwa 30mal leistungsfähiger ist als die Leber (Schroit et al. 1985). Die beiden Organe eliminieren täglich mehr als 10^{11} alt gewordene Erythrozyten. Warum rote Blutkörperchen nicht länger überleben, ist unbekannt; es könnte allerdings auf die Aktivitätsminderung erythrozytärer Enzyme zurückzuführen sein, da eine Proteinbiosynthese aufgrund der fehlenden genetischen Information (Verlust des Zellkerns) und der fehlenden Ribosomen und Mitochondrien (Energie!) nicht mehr möglich ist. Aufgrund des Verlustes aller Zellorganellen kann der Erythrozyt auch als „post-apoptotische Kreatur“ bezeichnet werden (Daugas et al. 2001).

Für den Stoffwechsel des Erythrozyten stellt Glukose die wesentliche Energiequelle dar, die entweder in der Glykolyse oder im Pentosephosphatweg abgebaut wird. Das in der Glykolyse gebildete ATP wird für den aktiven Ionentransport, durch den der Erythrozyt Natrium und Calcium eliminiert und Kalium akkumuliert, für die Aufrechterhaltung der Form und für die Biosynthese von Glutathion benötigt. Befinden sich Erythrozyten für 48 Stunden in einem Glukose-freien Medium, können bei 50% dieser roten Blutkörperchen apoptotische Vorgänge nachvollzogen werden (Lang et al. 2003).

Da rote Blutkörperchen einen Durchmesser von etwa $7,5 \mu\text{m}$ und eine Dicke von etwa $1,5 \mu\text{m}$ besitzen, muss eine Deformierbarkeit des Erythrozyten gewährleistet werden, damit er Kapillaren, die einen Durchmesser von etwa $3-5 \mu\text{m}$ haben, ohne Probleme passieren kann. Diese Deformierbarkeit ist durch den Verlust des Zellkerns, die Flexibilität der Membran und die Oberflächenvergrößerung auf $140 \mu\text{m}^2$ durch eine bikonkave Scheibenform gegeben.

Erythrozyten lassen sich nach der Dichte separieren. Ihre Dichte wird mit einer Streubreite zwischen 1,085 und 1,129 g/ml angegeben, was eine grundlegende Tatsache für die Untersuchungen dieser Arbeit ist (siehe Kapitel 3). Lediglich eosinophile (1,088-1,105 g/ml) und neutrophile Granulozyten hoher Dichte (1,085-1,095 g/ml) liegen teilweise ebenfalls innerhalb dieses Bereiches. Auch der Zusammenhang zwischen Dichte und Alter des Erythrozyten ist eine grundlegende Erkenntnis für die vorliegende Arbeit (Vaysse et al. 1988, Piomelli et Seaman 1993, Shinozuka 1994).

2.1.1. Erythropoiese

Erythrozyten können nicht wachsen und sich nicht teilen. Daher sind sie auf die Mithilfe von Stammzellen angewiesen.

Sauerstoffknappheit und/oder ein Mangel an Erythrozyten (z. B. durch Blutverlust oder Hämolyse) regt Zellen in den Nieren und in der Leber dazu an, erhöhte Mengen von dem Hormon Erythropoietin zu synthetisieren und in den Blutstrom abzugeben. Erythropoietin ist ein 34 kDa-Glycoprotein, das zu 85-90% in den Nieren und zu 10-15% in der Leber produziert wird. Es wirkt auf Knochenmarkzellen, die man als Erythrozytenkolonie-bildende Zellen oder CFC-E bezeichnet. Rezeptoren für Erythropoietin befinden sich nicht nur im Knochenmark sondern auch in Endothelzellen (extramedulläre Epo-Rezeptoren). In der Signaltransduktion der Erythropoietin-Rezeptoren spielt Proteinkinase C eine entscheidende Rolle, die jedoch im Einzelnen noch nicht geklärt ist (von Lindern et al. 2000).

Erythropoietin stimuliert die Erythropoiese auch insofern, dass es durch Regulierung des anti-apoptischen Proteins Bcl-X_L den Erythroblasten vor der Apoptose schützt (Daugas et al. 2001). Daugas et al. beschreiben ferner, dass In-vitro-Studien eine proteolytische Tätigkeit von Caspasen (siehe Kapitel 2.1.5) während der Erythroblastendifferenzierung gezeigt haben; in vivo konnte diese Beobachtung jedoch noch nicht gemacht werden.

Rekombinantes menschliches Erythropoietin wird als Therapie von Niereninsuffizienzbedingter Anämie eingesetzt. Im Jahr 2003 wurde festgestellt, dass Erythropoietin an Erythrozyten bindet, Kationen-Kanäle inhibiert und dadurch die Phosphatidylserin-Asymmetrie aufrecht erhalten werden kann (Myssina et al. 2003).

Junge Erythrozyten, sogenannte Retikulozyten, besitzen in den ersten 1-2 Tagen noch einige Reste von Zellorganellen, die Substantia reticulo-granulo-filamentosa, die durch Einwirkung von Brillantkresylblau (siehe Kapitel 3.11.2.) oder Nilblausulfat sichtbar gemacht werden können. Reife Erythrozyten hingegen weisen keine Zellorganellen mehr auf.

2.1.2. Membranaufbau

Die Membran des menschlichen Erythrozyten besteht zu 19,5% aus Wasser, zu 39,6% aus Proteinen, zu 35,1% aus Lipiden und zu 5,8% aus Kohlenhydraten (Yawata 2003). Sie hat zwar wie in anderen Zellen einen typischen Doppellipidschichtaufbau, weist aber durch den zusätzlichen Besitz eines Membranskeletts eine Strukturbesonderheit auf. Es handelt sich um ein zweidimensionales Netzwerk, das über Ankyrin, Protein 4.2 und Spektrin in der zytosolischen Membranoberfläche verankert ist (Shohet et al. 1993). Manno et al. untersuchten im Jahr 2002 die mechanische Membranstabilität an Erythrozyten und stellten fest, dass nicht nur die Bindung der Skelettproteine untereinander, sondern besonders die Bindung zwischen Phosphatidylserin (siehe unten) und Spektrin diese Membranstabilität aufrechterhält ohne jedoch Einfluss auf die Deformierbarkeit zu nehmen. Neben Ankyrin, Spektrin und Protein 4.2 sind Aktin, Protein 4.1 und Bande 3 die entscheidenden Komponenten des Membranskeletts. Weitere Zellmembranproteine sind in Abbildung 1 ersichtlich.

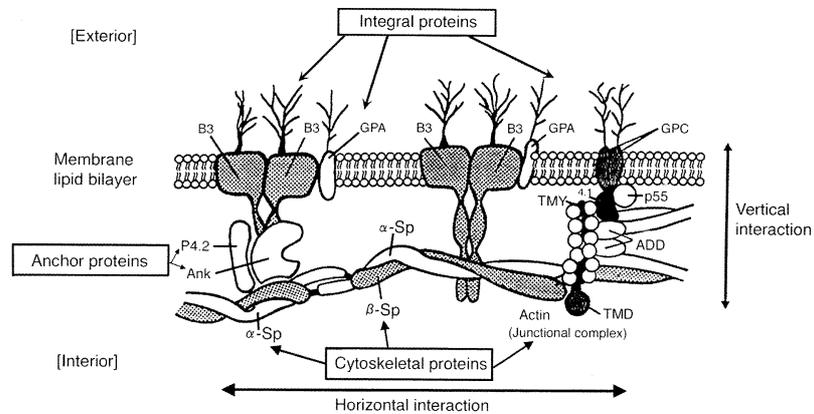


Abb. 1: Lokalisierung der Membranproteine in menschlichen Erythrozyten und ihre Interaktionen. Integral proteins; B3: band 3, GPA: glycophorin A and GPC: glycophorin C. Anchor proteins; Ank: Ankyrin and P4.2: protein 4.2. Cytoskeletal proteins; α-Sp: α-spectrin, β-Sp: β-spectrin, ADD: adducin, 4.1: protein 4.1, TMY: tryptomyosin and TMD: tropomodulin (Yawata, 2003).

Die starke Deformierbarkeit der Membran kann auf die Fähigkeit des Skeletts, eine extreme Umgruppierung vorzunehmen, zurückgeführt werden (Manno et al. 2002). Das Fehlen oder der Defekt eines dieser Proteine bewirkt eine veränderte Morphologie und Membranintegrität des Erythrozyten, wie z. B. bei der hereditären Elliptocytose, die in Folge des Fehlens des Proteins 4.1 durch oval geformte Erythrozyten gekennzeichnet ist und zur hämolytischen Anämie führt. Auch der Alterungsprozess von roten Blutkörperchen geht mit einem Verlust der Membranelastizität einher (Sutera et al. 1985).

In der menschlichen Erythrozytenmembran finden sich fast alle Lipidmoleküle, die in ihrer Kopfgruppe Cholin enthalten, in der äußeren, besser geordneten und weniger flüssigen Hälfte, all jene Phospholipid-Moleküle hingegen, die eine terminale primäre Aminogruppe besitzen, in der inneren, weniger dicht besetzten Hälfte der Doppellipidschicht (Allen et al. 1988, Devaux 1993). Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) gehören hierbei zu der erstgenannten Gruppe, Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) zu der zweiten. Die genaue Verteilung der

Phospholipide wird in der Literatur mit $70 \pm 7\%$ PC und $\sim 80\%$ SM in der äußeren und $96 \pm 4\%$ PS und $80 \pm 5\%$ PE in der inneren Membranhälfte angegeben (Diaz et Schroit 1996, Yawata 2003). Da sich das negativ geladene Phosphatidylserin ausschließlich in der inneren Einzelschicht befindet, gibt es zwischen den beiden Hälften der Doppelschicht einen deutlichen Ladungsunterschied. Es besteht ein nach außen gerichtetes positives Potential von ungefähr 10mV.

2.1.3. Phosphatidylserin

Das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) gehört zu den Aminophospholipiden und ist ausschließlich auf Zytosolseite zu finden (Schroit et al. 1985, Kuypers et al. 1998, de Jong et al. 2002).

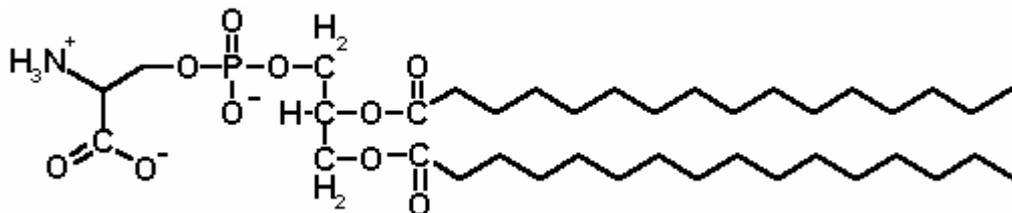


Abb. 2: Strukturformel von Phosphatidylserin

Apoptotische Zellen zeigen dieses Lipid immer auf der Außenseite ihrer Membran, wobei es als Signal für das retikuloendotheliale System (siehe Kapitel 2.1.7.) dient, das die Phagozytose von (unter anderem) apoptotischen Zellen induziert (Bassé et al. 1996, van Engeland et al. 1998, Schlegel et Williamson 2001). Zusätzlich wurde Phosphatidylserin ebenfalls auf der Außenseite der Makrophagenmembran, die der zu phagozytierenden Zelle zugewandt war, nachgewiesen. Somit könnte der Phagozytoseprozess auf einer Interaktion zwischen zwei PS-präsentierenden Membranen basieren (Schlegel et Williamson 2001).

Es wurde zahlreich beschrieben, dass durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Level eine PS-Exposition stattfindet (Williamson et al. 1992, Pradhan et al. 1994, Bassé et al. 1996, de Jong et al. 1997, de Jong et al. 2002), was auf der Inaktivierung der

Translokase und Flopase und gleichzeitigen Aktivierung der Scramblase (siehe Kapitel 2.1.4.) beruht (siehe Abbildung 3). Diese erhöhte Kalziumkonzentration ist in Erythrozyten jedoch nur im Zusammenhang mit Proteinkinase C-Aktivität für das Phospholipid-Scrambling verantwortlich (de Jong et al. 2002). Zusätzlich zur PS-Exposition wurden in roten Blutkörperchen und Thrombozyten Veränderungen der Zellform und das Freisetzen von Mikrovesikeln ohne Zytoskelettanteile beobachtet (Diaz et Schroit 1996). Auch die Endovesikulation könnte eine Rolle spielen (Allan et Walklin 1988). Insgesamt verliert der Erythrozyt im Laufe seines Lebens 30% seines Volumens (Werre et al. 2004).

Zellen, die PS präsentieren, haben außerdem eine Katalysatorfunktion in bezug auf die Hämostase, da eine Aktivierung des Tenasekomplexes (Faktor VIIIa und IXa) und des Prothrombinkomplexes (Faktor Va und Xa) stattfindet (Bassé et al. 1996, de Jong et al. 2002). Obwohl Erythrozyten generell als biologisch inert im eigenen Körper gelten und inaktiv bezüglich interzellulärer Kommunikation sind, agieren sie in diesem Fall als „Assistenten“ der Thrombozyten. Zusätzlich können PS-exponierende Erythrozyten auch den alternativen Weg des Komplementsystems aktivieren (Kuypers 1998).

Zahlreiche Krankheiten, wie z. B. die Sichelzellanämie, Diabetes mellitus und einige Fälle der β -Thalassämie, gehen mit einem Verlust der PS-Asymmetrie einher. Auch die chronische Urämie gehört zu dieser Gruppe von Erkrankungen (Bonomini et al. 2001). Hier wird auch eine erhöhte Adhäsion der PS-präsentierenden Erythrozyten an das Gefäßendothel beobachtet, was die Gefäßerkrankungen dieser Patienten erklärt (Bonomini et al. 2002).

2.1.4. Aminophospholipid-Translokase, Flopase und Scramblase

Die 110-120 kDa-Aminophospholipid-Translokase, auch Flipase (van Engeland et al. 1998, de Jong et al. 2002) oder P-Typ ATPase (Schlegel et Williamson 2001) genannt, ist verantwortlich für die Mg^{2+} /ATP-abhängige Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung der Aminophospholipide in der Erythrozytenmembran, wobei sie speziell

Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin gegen den elektrochemischen Gradienten von der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht zur inneren („flip“) transportiert (Connor et al. 1993, van Engeland et al. 1998, Daleke 2003). Der Transport von Phosphatidylethanolamin ist jedoch weniger effizient, Phosphatidylcholin wird gar nicht transportiert (Schlegel et Williamson 2001, Mandal et al. 2002). Die Flipase wird z. B. durch Ca^{2+} , Vanadate, Acetylphosphat, p-Nitrophenylphosphat und den Sulfhydryl-reaktiven Reagenzien N-Ethylmaleimid (NEM) und Pyridyldithioethylamin (PDA), einem spezifischen Inhibitor der Translokase, inaktiviert (Bassé et al. 1996, Diaz et Schroit 1996, Manno et al. 2002, Daleke 2003), wobei der genaue Mechanismus, der die Aktivität reguliert, nicht bekannt ist (Schlegel et Williamson 2001). Mandal et al. berichteten im Jahr 2002 zum ersten Mal, dass durch Caspase 3 (siehe Kapitel 2.1.5.) die Translokase ebenfalls, entweder direkt oder wahrscheinlicher durch Beeinflussung von Translokaseregulatoren, gehemmt wird.

Die weniger spezifische Mg^{2+} /ATP-abhängige Flopase sorgt antagonistisch zur Translokase für den Transport von Phospholipiden in die äußere Hälfte der Lipiddoppelschicht („flop“). Sie ist zudem temperatursensibel und kann durch Vanadate und verschiedene Sulfhydryloxidantien gehemmt werden. Da dieser Transport nach außen etwa 10mal langsamer ist und mit dem Einwärtstransport konkurriert, wird so die Phospholipid-Asymmetrie aufgebaut und aufrecht erhalten (Diaz et Schroit 1996, Kuypers 1998).

Die Phospholipidscramblase wurde in der Erythrozytenmembran als ein Prolin-reiches 37-kDa-Protein identifiziert, das ein einziges transmembranes Segment nahe dem C-Terminus besitzt (Zhou et al. 1997). Im Gegensatz zur Translokase wird die ATP-unabhängige Phospholipid-Scramblase durch Ca^{2+} aktiviert. Neben Ca^{2+} gelten Ceramide ebenfalls als Trigger. Jedoch ist nachgewiesen worden, dass in apoptotischen Zellen die Aktivierung nicht nur aufgrund eines erhöhten Ca^{2+} -Gehaltes im Zytosol stattfindet (Schlegel et Williamson 2001), sondern die Anwesenheit von z. B. durch Glukoseausschüttung aktivierter Proteinkinase C erforderlich ist (de Jong et al. 2002,

Klarl et al. 2005). Aktuelle Untersuchungen vermuten eine Stimulation der Scramblase durch die Einnahme von Chlorpromazin, einem mittelstark potentem Neuroleptikum, womit der anämische Nebeneffekt dieses Präparates erklärt wird (Akel et al. 2006).

Die Scramblase bewirkt eine symmetrische Verteilung der Phospholipide und ist sowohl in lebenden Zellen, dort jedoch nur kurzweilig aktiv, als auch in apoptotischen Zellen zu finden (Schlegel et Williamson 2001). Die Menge an Phospholipidscramblase ist in Thrombozyten etwa 10mal größer als in Erythrozyten (Zhou et al. 1997, Kuypers 1998).

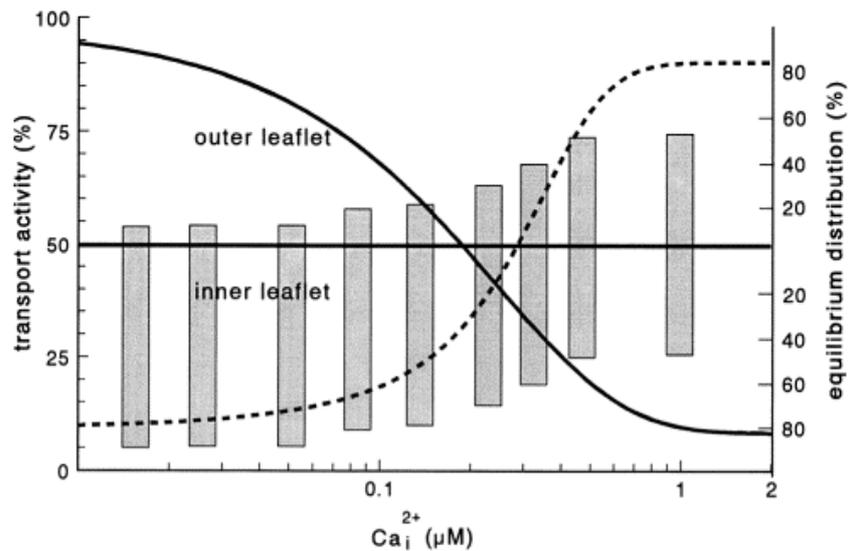


Abb. 3: Verteilung von Phosphatidylserin in den beiden Membranhälften in Abhängigkeit vom intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt. Die durchgezogene und gestrichelte Linie zeigen die inverse Aktivität von Flipase und Scramblase bei erhöhtem intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt. Die Balken verdeutlichen eine Gleichverteilung von Phosphatidylserin in beiden Membranhälften bei ansteigendem Ca^{2+} -Level (Diaz et Schroit, 1996).

Translokase und Scramblase sind Ziele der proteolytischen Caspasen (siehe Kapitel 2.1.5.).

2.1.5. Caspasen

Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die normalerweise als latente Enzymvorstufen (Procaspasen) vorliegen (Mandal et al. 2002). Sie werden durch Calpaine und Apoptosesignale aktiviert und können durch verschiedene Inhibitoren (z. B. zVAD-fmk, Z-DEVD-FMK) gehemmt werden. Das μ -Calpain, das aufgrund von erhöhtem zytosolischem Ca^{2+} -Level aktiviert wird, wurde in Erythrozyten gefunden und zerfällt im aktivierten Zustand in Fragmente, die für den Abbau von Spektrin verantwortlich sind (Daugas et al. 2001).

Caspasen können in drei Gruppen unterteilt werden: Caspase-1 (ICE), Caspase-2 (ICH-1) und Caspase-3 (CPP32). Zu der Caspase-1-Gruppe gehören zusätzlich noch Caspase 4 und 5, zu der Caspase-2-Gruppe wird die Caspase 9 gezählt, und zu der Caspase-3-Gruppe gehören die Caspasen 6, 7, 8, 9 und 10 (Nagata 1997).

1999 wurden zum ersten Mal in Thrombozyten, die wie Erythrozyten ebenfalls keinen Kern haben, funktionelle Vorstufen von Caspase 3 und 9 gefunden. 2001 beschreibt Daugas et al. eine In-vitro-Studie, in der die proteolytische Aktivität von Caspase 3, 6 und 9 während der Erythroblastendifferenzierung beobachtet wurde, wobei Kernproteine gespalten wurden, jedoch der Transkriptionsfaktor intakt blieb und es zu keiner PS-Exposition kam. In vivo ist solch eine Beobachtung noch nicht gemacht worden. Mandal et al. untersuchten im Jahr 2002 oxidativ gestresste Erythrozyten und beobachteten zum ersten Mal die Existenz der 32 kDa-Procaspase 3, die im aktiven Zustand als 20 kDa-Caspase 3 vorliegt. Die aktivierte Caspase 3 bewirkt bei oxidativem Stress durch Beeinflussung der Translokaseaktivität eine PS-Exposition. Im Jahr 2005 stellte dieselbe Forschergruppe eine zusätzliche Mitbeteiligung von Caspase 8 und Fas heraus. Hiermit widerlegten sie die Behauptung von de Jong et al. aus dem Jahr 1997, dass oxidativer Schaden keinen Einfluss auf die Phospholipidasymmetrie in roten Blutkörperchen hätte.

2.1.6. Ghosts

Während eines osmotischen Vorgangs strebt der Erythrozyt ein Gleichgewicht zwischen seinem Inneren und dem umgebenden Medium an. Solch ein Vorgang findet z. B. in Aqua bidest. statt, wobei der Erythrozyt anschwillt und seine Membran zerreißt. Das nun von außen zugängliche Phosphatidylserin kann durch Annexin V (siehe Kapitel 3.3.) markiert werden. Der so entstandene Ghost erscheint im Fluoreszenzmikroskop typischerweise mit einer ringförmigen Fluoreszenz, ist im Phasenkontrast jedoch kaum oder gar nicht sichtbar, was ihn von anderen Annexin V-positiven, nicht geplatzten Erythrozyten unterscheidet.

Die Entstehung von Ghosts ist ebenfalls bei mechanischen Irritationen wie der Blutabnahme beobachtet worden.

2.1.7. Apoptose

Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der einerseits genetisch initiiert werden kann, wie z. B. bei der Organentwicklung und Mauserung, und andererseits durch externe Trigger ausgelöst werden kann. Dieser suizidale Prozess spielt eine besonders wichtige Rolle in der Gewebshomöostase und geht immer, unabhängig vom Zelltyp, mit einer Phosphatidylserin-Exposition einher.

Der apoptotische Vorgang wird in zwei Phasen unterteilt:

- I. Unter der „Triggerphase“ versteht man den Zeitraum, der zwischen Kontakt mit sogenannten Triggern und ersten morphologisch erkennbaren Zeichen der Apoptose liegt. Die Länge dieser Phase ist abhängig vom Zelltyp, von der Triggerart und von den Wachstumsbedingungen der Zelle. Es sind bisher viele verschiedene Auslöser bekannt, wie z. B. Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden, chemotherapeutische Zusätze, Glukokortikoide, synthetische Ceramide, verschiedene zytotoxische Medikamente, UV-Bestrahlung, FAS- oder CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplex-Bindung (van Engeland et al. 1998),

Phosphatidylinositol-Diphosphat (Shiffer et al. 1998), Pb^{+} - und Hg^{2+} -Ionen (Kempe et al. 2004, Eisele et al. 2006). Durch Einwirkung dieser Trigger wird eine proteolytische Kaskade in Gang gesetzt, die die Aktivierung der Caspasen und des ICE (interleukin converting enzyme) beinhaltet.

- II. Das Einsetzen der proteolytischen Kaskade leitet die zweite, sogenannte „Vollstreckungsphase“ ein, die immer relativ kurz andauert und im Untergang der Kernmatrix, des Zytoskeletts und der Poly-ADP-Ribose-Polymerase endet. Es wird vermutet, dass zu Beginn dieser Phase die Phosphatidylserin-Präsentation nach außen hin stattfindet (van Engeland 1998).

Am Beginn der Apoptose steht eine Störung des mitochondrialen transmembranen Potentials, die durch eine Öffnung der sogenannten Megakanäle hervorgerufen wird. Es folgt eine mitochondriale Freisetzung von Apoptose-einleitenden Faktoren, die, wie Cytochrom C und Smac/Diablo, eine Caspaseaktivität initiieren, oder, wie der Apoptose-einleitende Faktor AIF, einen Caspase-unabhängigen Reaktionsweg auslösen (van Engeland et al. 1998, Bratosin et al. 2001).

Da Erythrozyten keine Zellorganellen, also auch keinen Kern und kein Mitochondrium besitzen, war die Frage lange ungeklärt, inwiefern rote Blutkörperchen einen apoptotischen Vorgang vollziehen. Bratosin et al. haben im Jahr 2001 zum ersten Mal ein „Selbsterstörungsprogramm“, das nicht auf die Anwesenheit von Mitochondrien angewiesen ist, identifiziert. Sie untersuchten rote Blutkörperchen und stellten zahlreiche Gemeinsamkeiten fest, wie das Auftreten von Zellschrumpfung, Mikrovesikelbildung der Membran und Phosphatidylexposition, die zum Zerfall oder in Anwesenheit von Makrophagen zur Phagozytose führt. Diese Art der Apoptose -aktuell auch als Eryptose bezeichnet (Lang et al. 2005)- wird durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt eingeleitet und kann durch Cystein-Proteinase-Inhibitoren gehemmt werden, wodurch die Möglichkeit besteht, durch therapeutische Intervention die Lebenszeit von Erythrozyten zu verlängern.

2.1.8. Retikuloendotheliales System

Die Aufgabe des retikuloendothelialen Systems ist die Eliminierung von Zellen und Fremdkörpern, die den Organismus schädigen können, wobei Phosphatidylserin als ein starkes Erkennungssignal für Phagozyten dient (Allen et al. 1988, Shiratsuchi et al. 1998). Diese Zellen erledigen ihre Aufgabe durch Phagozytose und werden aufgrund ihres unterschiedlichen zeitlichen Einschreitens in professionelle (Makrophagen) und nicht-professionelle Zellen (Epithelzellen, BHK) unterteilt. Parnaik et al. untersuchten im Jahr 2000 Phagozyten und stellten anhand von apoptotischen Zellen fest, dass professionelle Phagozyten sofort beim Auftreten des ersten apoptotischen Signals die Zelle verschlingen, nicht-professionelle hingegen erst nach Stunden einschreiten. Beide Phagozytenarten erkennen die apoptotische Zelle beim ersten Kontakt, jedoch werden sie durch unterschiedliche Signale aktiv, was stark vermuten lässt, dass die apoptotische Zelle mit der Zeit ihre Signale verändert. Die Art dieser Veränderung ist noch unbekannt. Außerdem wird angenommen, dass die nicht-professionellen Phagozyten eine Absicherung für den Organismus darstellen, wenn professionelle nicht ausreichend vorhanden sind.

Von Fadok et al. wurden im Jahr 2000 ein Rezeptor auf Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen identifiziert, der für die Erkennung von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen dient. Hierzu wurde der monoklonale Antikörper 217 eingesetzt, der wie Phosphatidylserin-Liposome (Allen et al. 1988) die Phagozytose inhibiert.

PS-abhängige Zellerkennung ist jedoch nicht begrenzt auf Phagozyten, da Bennett et al. im Jahr 1995 beobachtet haben, dass ebenfalls glatte Muskelzellen PS-exponierende Erythrozyten binden.

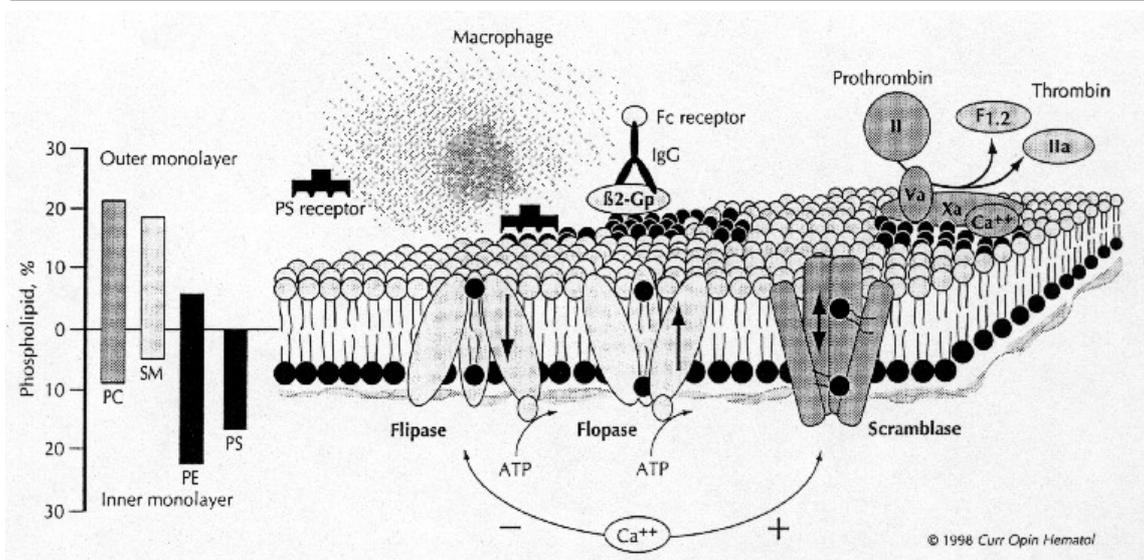


Abb. 4: Das Modell zeigt eine Reihe von Schlüsselfiguren, die von der Aufrechterhaltung und vom Verlust der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide abhängig sind. ATP–Adenosintriphosphat; β 2-Gp– β 2-Glykoprotein (Kuypers, 1998).

2.2. Erythrozyten als wichtigste Träger von Blutgruppeneigenschaften

Bereits vor mehr als 100 Jahren ist bemerkt worden, dass man beim Mischen des Blutes verschiedener Individuen immer wieder Auftreten von schweren Agglutinationsreaktionen der Erythrozyten beobachten kann. Dieses Phänomen ist auf das Vorhandensein von Blutgruppensubstanzen bzw. Antigenen auf der Oberfläche von Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, allen Endothelzellen, vielen Epithelzellen und Spermatozoen zurückzuführen. Bei diesen zellgebundenen Antigenen handelt es sich meist um Glykosphingolipide. Die Produktion von Antikörpern gegen sie wird durch Darmbakterien ausgelöst, die auf ihrer Zelloberfläche zufällig analoge Verbindungen tragen. Genetisch bedingt ist nur die Fähigkeit, Antikörper, oder auch Isoagglutinine genannt, mit einer derartigen Spezifität zu bilden. Menschliche Isoagglutinine sind also heterophile Antikörper, die nicht nur im Blut, sondern auch in der Tränenflüssigkeit, im Vaginalsekret und im Speichel vorkommen. Zudem kommen Blutgruppen und blutgruppenähnliche Substanzen nicht nur beim Menschen, sondern auch bei allen Tieren und vielen Mikroorganismen vor.

Etwa 80% der Population werden als Sekretoren bezeichnet, die wasserlösliche Blutgruppensubstanzen ausscheiden, die in Urin, Speichel, Magensaft, Samenflüssigkeit, Zervikalschleim, in der pathologischen Flüssigkeit von Ovarialzysten und im Mekonium, dem ersten Stuhl des Neugeborenen, nachgewiesen werden können.

Die Blutgruppeneigenschaften sind während des ganzen Lebens konstante Merkmale, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden. Aufgrund der Immuntoleranz gegen „selbst“ werden natürlich keine Antikörper gegen die eigenen Blutgruppensubstanzen gebildet. Klinische Bedeutung kommt den Blutgruppeneigenschaften bei der Erythrozytentransfusion zu, da hämolytische Reaktionen infolge Transfusionen gruppenungleichen Blutes auftreten. Außerdem gibt es Unverträglichkeitserscheinungen, sogenannte Inkompatibilität, der Blutgruppen von Mutter und Kind, die zu schweren Schäden des Kindes bis zu dessen Tod führen können. Man spricht von einer Rhesusunverträglichkeit oder vom Morbus haemolyticus neonatorum. Eine wichtige Bedeutung erfahren die Blutgruppen in der Gerichtsmedizin, wenn alte Blutspuren vorhanden sind und das genetische Material nicht mehr hinreichend untersucht werden kann. In der Genetik und Anthropologie werden die Blutgruppen beim Vaterschaftsnachweis und bei der Bestimmung von ethnischen Merkmalen herangezogen.

Es sind beim Menschen 14 Blutgruppensysteme bekannt, die aus mehr als 100 verschiedenen Blutgruppenantigenen bestehen. Die am längsten bekannten sind das AB0-System und das Rhesussystem.

2.2.1. AB0-System

Das AB0-System wurde 1901 von dem österreichischen Bakteriologen Karl Landsteiner entdeckt und umfasst vier verschiedene Gruppen, nämlich A, B, AB und 0, wobei die Merkmale A und B dominant, das Merkmal 0 rezessiv vererbt wird. In den Seren der Träger der Blutgruppe A, B oder AB kommen die Antikörper Anti-B, Anti-A bzw. keine Antikörper vor. Bei Menschen mit der Blutgruppe 0 finden sich im Serum die

Antikörper Anti-A und Anti-B. Es gibt kein 0-Antigen, Gruppe-0-Erythrozyten besitzen das H-Antigen, wobei die Bezeichnung Blutgruppe 0 nur aus historischen Gründen beibehalten wurde. A-,B- und H-Antigene sind Kohlenhydrat-Antigene, die kovalent an Proteine und/oder Sphingolipide gebunden sind und deren (jeweils zwei) Erbanlagen auf dem langen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert sind. Da das Produkt des 0-Gens weder auf den Erythrozyten noch im Serum nachweisbar ist, wird es als amorph (stumm) bezeichnet.

AB0-Blutgruppenverteilung für Deutschland

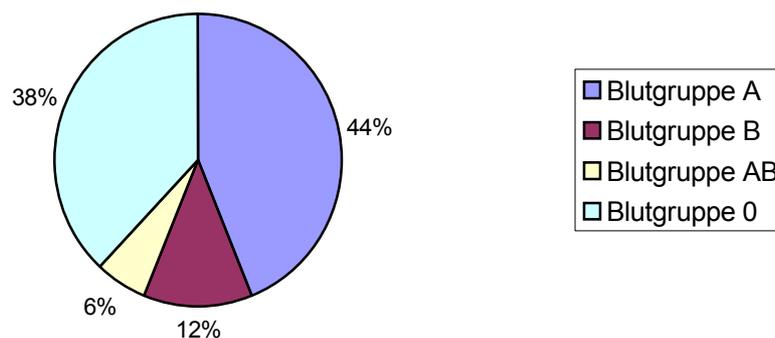


Abb. 5: AB0-Blutgruppenverteilung Deutschland (Quelle: Roche Lexikon Medizin, 4.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 1999).

2.2.2. Rhesus-System

Das Rhesus-System (Rh-System) wurde 1940 ebenfalls von Landsteiner und von Wiener entdeckt. Zu diesem System gehören mehrere Antigene, sogenannte Rhesusfaktoren, die auf den Erythrozyten vorkommen. Am bekanntesten sind die Faktoren C, D, E und c, d, e, die nicht durch Kohlenhydrate, sondern durch Proteine kodiert werden. Für die drei Antigene werden nur zwei Gene benötigt. Das Rhesus D-Gen kodiert für das D-Antigen mit 417 Aminosäuren, das für die rhesuspositive Blutgruppe verantwortlich und am stärksten immunogen wirksam ist. Es setzt sich aus mehreren Partialantigenen (D^A , D^B , D^C , D^D) zusammen. Rhesusnegative Individuen (Genotyp dd) sind homozygot bei einer Deletion der Rhesus D-Gensequenz. Neben diesen drei Antigenen sind bis heute 37 weitere hoch- und niedrigfrequente Rh-Faktoren bekannt.

Beim Phänotyp Rh_{null} fehlen nicht nur alle Rh-, sondern auch andere Blutgruppenantigene. Die Erythrozyten weisen zum Teil Membrandefekte auf, die zu Formveränderungen und einer verkürzten Lebenszeit führen können. Kuypers et al. stellten 1984 fest, dass es im Vergleich zu normalen Erythrozyten drei entscheidende Unterschiede im Membranaufbau gibt: 1. Das Rh(D) Polypeptid und das R6A-bindende Polypeptid, die entscheidend für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide sind, fehlen. 2. Menschliche Rh_{null} -Erythrozyten weisen eine andere asymmetrische Verteilung von Phosphatidylethanolamin auf als die Kontrollzellen. 3. Phosphatidylcholin zeigt eine schnellere Bewegung innerhalb der Membran als in normalen Erythrozyten. Smith und Daleke stellten 1990 fest, dass sowohl A+ Zellen wie auch B- und Rh_{null} Erythrozyten einen normalen Phosphatidylserintransport aufweisen. Somit war klar, dass das Rh-Protein kein Aminophospholipidtransporter ist. 1997 wurde von Geldwerth et al. schließlich veröffentlicht, dass die Aminophospholipidtranslokase und das Rh-Polypeptid zwei eindeutig unterschiedlich molekulare Spezies sind.

8 häufigste Antigen-Kombinationen nach der Fisher-Race 3-Gen-Theorie

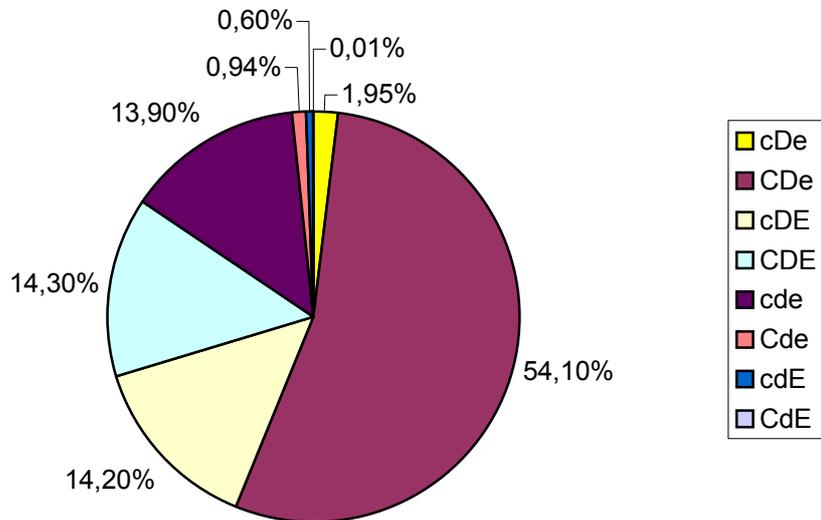


Abb. 6: Die 8 häufigsten Antigen-Kombinationen nach der Fisher-Race 3-Gen-Theorie (Quelle: Roche Lexikon Medizin, 4.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 1999)

AB0- und Rh-Blutgruppenverteilung in Deutschland

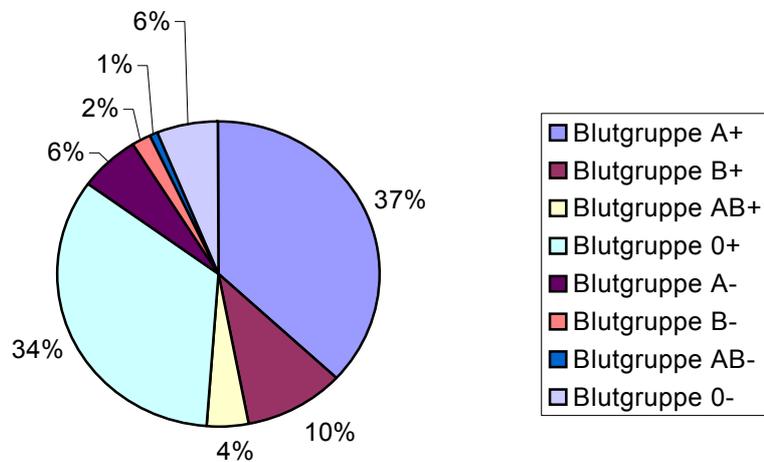


Abb. 7: AB0- und Rh-Blutgruppenverteilung in Deutschland (Quelle: <http://www.medicin.uni-halle.de/tmb/info1.htm> Stand: 13.02.2003)

Somit sind 84,55% der Bevölkerung rhesuspositive und 15,45% rhesusnegative Individuen.

2.2.3. Kell(-Cellano)-System

Dieses System wurde nach den zwei Frauen Kellacher und Cellano benannt. Neben den antagonistischen Hauptantigenen K (Kell, K1) und k (Cellano, K2) werden noch 19 weitere Antigene zum Kell-System gerechnet. Beim extrem seltenen McLeod-Phänotyp fehlen die Kell-Antigene bzw. sind abgeschwächt; die bei dieser Erkrankung auftretende verkürzte Erythrozyten-Überlebenszeit spricht für eine funktionelle Bedeutung des Kell-Systems. Der häufig vorkommende Antikörper Anti-K wie auch das seltene Anti-k können schwere Zwischenfälle bei Transfusionen und Schwangerschaften verursachen.

Kell-Blutgruppenverteilung in unserer Bevölkerung

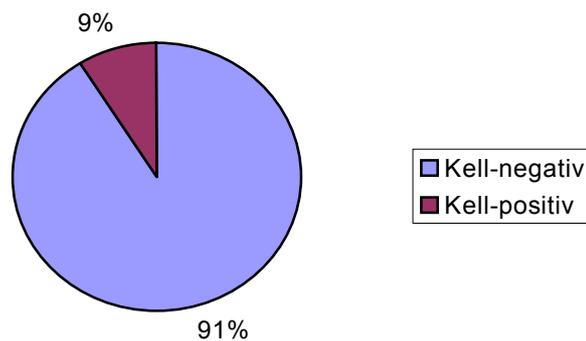


Abb. 8: Kell-Blutgruppenverteilung in unserer Bevölkerung

(Quellen: Blutspendedienst Baden-Württemberg, DRK Ortsverleih Durlach e.V., <http://www.drk-durlach.de/blutspendedienst/gruppen.html>, Stand: 10.06.2003

Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen GmbH, http://www.bsdhessen.de/bsd/blutgruppenserologie_06.htm, Stand: 10.06.2003)

3. Material und Methode

3.1. Probanden

Da Erythrozyten weiblicher Probanden einerseits durch hormonelle, zyklusbedingte Schwankungen unterschiedliche Verhalten zeigen und andererseits eine etwas geringere Dichte als die der männlichen Probanden haben, wurden für die vorliegende Arbeit ausschließlich männliche Blutspender ausgewählt.

Da das Verhalten der roten Blutkörperchen ebenfalls durch Nikotinabusus, Medikamenteneinnahme (insbesondere des Wirkstoffs Acetylsalicylsäure), systemische bzw. erworbene Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Hämorrhagische Diathesen) und Infektionskrankheiten (z. B. Hepatitis, AIDS/HIV) beeinflusst wird, wurde sichergestellt, dass die Probanden gesunde Nichtraucher sind.

Es wurden an insgesamt 20 Männern im Alter von 22-43 Jahren Blutentnahmen durchgeführt, wobei 75% der Probanden 22-26 Jahre alt waren.

3.2. OptiPrep™

OptiPrep™ Universal ist eine gebrauchsfertige, sterile und Endotoxin-getestete Iodixanol-Lösung, die zur Isolation verschiedenster Zelltypen aus Blut und Gewebe, zur Isolation von Zellorganellen und Membranfraktionen und zur Herstellung von selbstgenerierenden Gradienten geeignet ist (Bildirici et al. 2000). Es handelt sich um Iodixanol 60% (5,5'-[(2-hydroxy-1,3-propanediyl)-bis (acetylamino)] bis [(N, N'-bis (2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenedicarboxamide]) der Firma Nycomed, Oslo, Norwegen. Die Dichte der Lösung beträgt $1,320 \pm 0,001$ g/ml bei 20°C, die Osmolarität liegt bei 170 ± 15 mOsm und der Schmelzpunkt zwischen 221°C und 244°C.

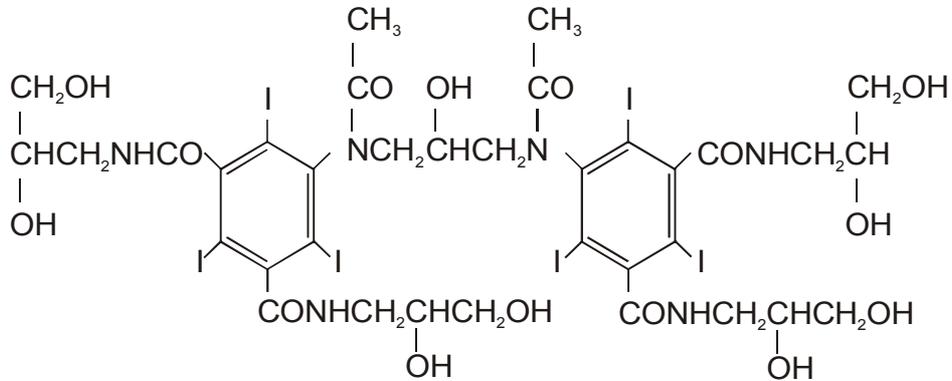


Abb. 9: Strukturformel von Iodixanol, Mol-Gew = 1550.

Es wurde ein saccharidfreies, nicht-ionisches Trennmedium verwendet, um verschiedene Störfaktoren wie z. B. das Verklumpen der Erythrozyten in Anwesenheit von Polysacchariden und das Interagieren der Kohlenhydrate mit der Glykokalix des Erythrozytolenms auszuschalten.

In der Literatur wird vor allem das schnelle und effiziente Herstellen von selbstgenerierenden Gradienten als Vorteil gegenüber anderen gleichartigen Lösungen herausgestellt (Graziani-Bowering et al. 1997, Billington et al. 1998).

3.3. Annexin-V-FLUOS

Annexine sind eine von zwei Hauptgruppen der Calcium-bindenden Proteine. Zu dieser Gruppe gehören mindestens 12 Proteine, die in Abhängigkeit von Calcium an Phospholipide binden und in allen Eukaryonten zu finden sind. Sie haben sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zahlreiche Aufgaben. Annexine spielen eine Rolle bei der Calcium-abhängigen Exozytose, inhibieren die Phospholipase A2 und die Proteinkinase C, sind bei der Bildung oder Regulation von Ionenkanälen beteiligt und

wirken als Antikoagulantium, wobei dieser Effekt in vivo keine Rolle spielt, da die Plasmakonzentration von Annexinen sehr niedrig ist (Walker et al. 1992).

Annexin V ist ein monomeres Protein mit einer molaren Masse von 35 kDa. Die dreidimensionale Struktur des menschlichen Annexins V wurde erstmals 1990 von Professor R. Huber (München) aufgeklärt. Das Protein hat 3-5 Ca^{2+} -bindende Anteile und bindet an negativ geladene Phospholipid-Membranen, wobei es eine hohe Spezifität für Phosphatidylserin zeigt (van Engeland 1998) und somit zum Nachweis von apoptotischen Zellen dient. Mecklenbrauck hat in ihrer Promotionsschrift diese Spezifität an Rattenfibroblasten überprüft. Es gibt jedoch auch zwei bisher beobachtete Beispiele für eine Annexin-Bindung durch nicht-apoptotische Zellen: Myoblasten bzw. Myokardioblasten und Megakaryoblasten bzw. Megakaryozyten (Schlegel et al. 2001).

Annexin V wurde als Inhibitor von aktivierten und unaktivierten Makrophagen identifiziert, wobei eine Verbindung mit dem Phosphatidylserin-Rezeptor auf dem untersuchten Lymphozyten und/oder auf dem Makrophagen vermutet wird (Schlegel et al. 2001, Williamson et al. 2001). Durch Annexin-Markierung konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Makrophagen auf dem Membrananteil, der der zu phagozytierenden Zelle zugewandt ist, Phosphatidylserin nach außen präsentieren (Schlegel et al. 2001).

Rekombinantes Annexin V wird in E.coli (Stamm NB42) produziert.

Das für diese Arbeit verwendete Annexin-V-FLOUS Staining Kit der Firma Roche dient zur Detektion und Quantifikation von Apoptose und zur Unterscheidung apoptotischer von nekrotischen Zellen auf Einzelzellbasis. Das Kit besteht aus drei Komponenten: Flasche 1 beinhaltet 110 μl Annexin-V-Fluorescein, Flasche 2 beinhaltet 150 μl Propidiumjodid und in Flasche 3 befinden sich 50 ml Bindungspuffer (Hepes-Puffer). Der Gebrauch von fluoreszierenden Annexin V-Derivaten wurde erstmals 1992 von Ravanat et al. beschrieben, in deren Arbeit Phosphatidylserin auf der Oberfläche von Endothelzellen nachgewiesen wurde.

1996 legten Kuypers et al. eine Arbeit vor, in der fluoreszierendes Annexin V im Zusammenhang mit Erythrozyten zur Anwendung kam. Ein weiteres Annexin V-Derivat, das Annexin V-Ferrofluid, wurde im Jahr 1999 an roten Blutkörperchen getestet und dient ebenfalls zur Detektion von Phosphatidylserin (Geldwerth et al. 1999).

3.4. Zentrifugation

Für die Waschvorgänge der Vollblutprobe und der Erythrozyten wurde die Labofuge I der Firma Heraeus Christ verwendet. Die Zentrifuge besitzt vier verschiedene Geschwindigkeitsstufen.

Die Dichtezentrifugation wurde mit der Zentrifuge Rotanta/RP der Firma Hettich durchgeführt, die über ein Kühlaggregat verfügt, das eine Temperatureinstellung von -10°C bis zu $+40^{\circ}\text{C}$ erlaubt.

3.5. Mikroskopie

Für jegliche mikroskopische Untersuchungen und Fotografien wurde ein inverses Reflexionskontrastmikroskop (RKM) vom Typ Diavert der Firma Leitz Wetzlar verwendet, dessen Auflichteinrichtung eine spezielle Blende hat, die das Köhlern des Auflichtmikroskops erlaubt (Filler 1998). Der Köhlersche Beleuchtungsapparat gewährleistet ein homogen ausgeleuchtetes Gesichtsfeld und parallele Lichtstrahlen. Letztere sind eine wesentliche Voraussetzung für die Generierung des Reflexionskontrastes, der darauf aufbauend zirkular polarisiertes Licht im 45° Winkel auf das Objekt bricht, wobei ähnlich dem Dunkelfeld der zentrale Anteil des Lichtkegels ausgeblendet wird und somit nur eine ringförmige Belichtung besteht (Stachsche Beleuchtung). Dadurch werden Streustrahlen effizient unterdrückt.

Das verwendete Licht ist dazu geeignet, Fluoreszenzen zu erzeugen. Der 515 nm Langpassfilter dient zur Detektion der Fluoreszenzen, der 488 nm Filter wird zur

Anregung benötigt. Spezieller Aufbau und vielseitige Anwendungsmöglichkeiten des RKM werden an anderer Stelle detailliert beschrieben (Filler 1998, Filler et al. 2000).

3.6. Filme

Für die Fotografie der Nullproben und für die Aufnahmen der Annexinansätze im Hellfeld und Phasenkontrast wurden AGFA 100 ASA Filme verwendet.

KODAK Tmax p3200 Filme wurden für die Fotografie der Fluoreszenzen verwendet.

Beide Filmarten sind für Schwarzweiß-Bilder geeignet.

Die Belichtungszeiten der AGFA Filme lagen bei ca. einer Sekunde, die der KODAK Filme bei ca. 3-5 Sekunden.

3.6.1. Filmentwicklung

Nach dem Aufspulen der AGFA 100 ASA Filme in der Dunkelkammer wurden sie in eine Entwicklerlösung gegeben, die im Verhältnis 1 (Entwickler): 25 (Leitungswasser) angesetzt wurde. Es wurde der Einmal-Entwickler Rodinal der Firma AGFA verwendet. Durch sorgfältiges Spülen wurden die Filme nach fünf Minuten von der Entwicklerlösung befreit und für 10 Minuten in ein Fixierbad gelegt, das eine Zusammensetzung von 1 (Fixierer): 4 (Leitungswasser) hatte. Nach dem Fixieren sind die Filme für 30 Minuten in fließendem Leitungswasser gewässert worden. Anschließend wurden sie vom Wasser befreit und über Nacht zum Trocknen aufgehängt.

Die Filmentwicklung der KODAK Tmax p3200 Filme wurde im Fotolabor der Westfälischen Wilhelms-Universität durchgeführt. Die Filme wurden dort gepusht. Das bedeutet, dass der durch das Fluoreszenzlicht an sich unterbelichtete Film länger entwickelt wird, um seinen Kontrast zu erhöhen. Dabei wird durch das längere Entwickeln nicht die Filmempfindlichkeit angehoben, sondern der Negativkontrast ausgeglichen.

3.7. Blutgruppenbestimmung

Im Fall der Verfügbarkeit über einen Blutspendeausweis des Probanden wurde die Blutgruppe aus dem Ausweis übernommen. In allen anderen Fällen wurde dem Probanden mit einer 8 ml-EDTA-Monovette Vollblut abgenommen, das im Institut für Transfusionsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität zur Feststellung der Blutgruppe untersucht wurde.

Die Blutgruppe wurde im AB0-System mit dem Rhesusfaktor, dem Rhesussystem und in der Kell-Klassifikation angegeben.

3.8. Auszählung

Nach Digitalisierung der Bilder durch das Abfotografieren der Negative mit einer Digitalkamera (AGFA-Filme) oder durch das Einscannen dieser (KODAK-Filme) wurden die Erythrozyten entsprechend ihrer Klassenverteilung und Fluoreszenz an einem 19 Zoll Monitor ausgezählt.

3.9. Statistische Datenverarbeitung

Die statistische Datenverarbeitung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 13) durchgeführt. Um eine statistische Signifikanz festzustellen, kamen der Wilcoxon- und der Chi-Quadrat-Test zur Anwendung. Die statistische Signifikanz wird jeweils ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. Der Wilcoxon-Test zum Vergleich der Mediane zweier abhängiger Untersuchungen (z. B. oberer und unterer Erythrozytenring einer Dichtezentrifugation) über einen Rangsummentest ist nicht parametrisch, wobei die Stichproben (jedes einzelne Bild) innerhalb des gegebenen Untersuchungszeitfensters unabhängig voneinander sind. Die Nullhypothese besagt jeweils, dass die verglichenen Verteilungen nicht verschieden sind. Nominal verteilte Werte wurden mit den Chi-Quadrat-Test auf ihren Zusammenhang bzw. ihre

Abhängigkeit hin untersucht. Die jeweils formulierte Nullhypothese wird bei den Ergebnissen angegeben.

3.10. Blutabnahme

Das Blut des Probanden wurde mit einer Kanüle, deren Durchmesser 0,9 mm beträgt, und einer 4 ml-Lithium-Heparin-Monovette (15 I.E. Heparin/ml Blut) der Firma Sarstedt bei gestauter Armvene langsam entnommen, um eine möglichst geringe Irritation der Erythrozyten zu erzeugen. Die entnommene Blutprobe wurde sofort nach Entnahme vorsichtig umgeschwenkt, um eine Verwirbelung und weitergehende mechanische Irritation zu vermeiden. Sie wurde zur Abkühlung auf Raumtemperatur für 20 Minuten stehen gelassen.

3.10.1. Vorversuch

Vorversuche, in denen keine Fluoreszenz unter dem Mikroskop festgestellt werden sollte, wurden mit EDTA-Monovetten durchgeführt.

3.11. Ansetzen der Dichtelösungen

Es wurden drei verschiedene Dichtelösungen zur Dichtentrennung der Erythrozyten angesetzt während die Blutprobe abkühlte. Diese Lösungen wurden nach folgender Formel erstellt:

$$Vd + V_1d_1 = (V + V_1)d_2$$

d= Dichte der OptiPrepTM-Lösung

d₁= Dichte des Verdünnungsmittels

d₂= Dichte, die hergestellt werden soll

V= Volumen der OptiPrepTM-Lösung

V₁= Volumen des Verdünnungsmittels

Die Dichte der OptiPrep™-Lösung beträgt 1,320 g/ml bei einer Temperatur von 20°C; die Dichte des Verdünnungsmittels (NaCl) beträgt 1 g/ml. Alle Angaben stammen aus <http://www.nycomed-diagnostics.com/gradmed/optiprep/opti1.html> Stand: 09.11.2000.

Menschliche Erythrozyten besitzen eine Dichte mit einer Streubreite zwischen 1,085 g/ml und 1,129 g/ml. Daher wurden folgende Lösungen zur Ermittlung von einer Fraktion von Erythrozyten geringer Dichte und einer Fraktion von Erythrozyten hoher Dichte angesetzt:

- Lösung 1: Dichte: 1,085 g/ml (0,400 ml OptiPrep™ + 1,106 ml NaCl)
- Lösung 2: Dichte: 1,095 g/ml (0,450 ml OptiPrep™ + 1,066 ml NaCl)
- Lösung 3: Dichte: 1,111 g/ml (0,555 ml OptiPrep™ + 1,045 ml NaCl)

Nach dem Waschen der Blutprobe wurde 1ml Erythrozyten zu Lösung 1 gegeben. Darauf folgend wurde zuerst Lösung 2 und dann Lösung 3 mit einer Insulinspritze und einer langen Kanüle unterschichtet.

3.11.1. Vorversuch

Um zu klären, inwiefern sich die Dichtelösungen beim Schichten vermischen, wurde Lösung 2 mittels May-Grünwald-Färbung sichtbar gemacht und die Ergebnisse des Überschichtens mit denen des Unterschichtens verglichen. Es zeigte sich bei dem Unterschichten eine deutlich klarere Abgrenzung zwischen den Dichtelösungen als beim Überschichten.

3.11.2. Überprüfung der Fraktionen von Erythrozyten mit geringer bzw. hoher Dichte

Zur Überprüfung diente der Nachweis von Retikulozyten im oberen Erythrozytenring mittels Ausstrich und Färbung mit Brillantkresylblaulösung der Firma Merck. Durch Einwirkung von Brillantkresylblau wird in Retikulozyten eine Konglomeration bzw. Ausfällung von Ribonukleoproteinen bewirkt. Dadurch werden die noch vorhandenen

Reste der Zellorganellen (Mitochondrien, Ribosomen, Reste des endoplasmatischen Retikulums) als sogenannte Substantia reticulo-granulofilamentosa sichtbar. Nach 1-2 Tagen verlieren Retikulozyten diese Substanz. Im Pellet konnten keine Retikulozyten nachgewiesen werden.

3.12. Waschung der Blutprobe

Die Blutprobe wurde einmal eine Minute lang mit einer relativen Zentrifugenbeschleunigung von 1430 g in der Labofuge I zentrifugiert. Der dadurch entstandene Plasmaüberstand wurde mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und verworfen.

3.13. Nullprobe

4 µl Erythrozyten wurden zu 25 ml physiologischer Kochsalzlösung in ein NUNC-Röhrchen gegeben. Die Fotografie der Nullprobe fand während der Dichtezentrifugation statt, wobei von jedem Ausschnitt eine Aufnahme im Hellfeld und im Phasenkontrast gemacht wurde.

3.14. Dichtezentrifugation

Mit der Rotanta/RP Zentrifuge wurden die drei unterschichteten Dichtelösungen mit den Erythrozyten in Lösung 1 für 40 Minuten bei 745 g und 20°C zentrifugiert. Vorversuche haben gezeigt, dass bei dieser Einstellung ein optimales Ergebnis erzielt wird (s. Abbildung 10 und 11). Die Temperatureinstellung entspricht der Temperatur, bei der die OptiPrepTM-Lösung die angegebene Dichte hat.

3. Material und Methode

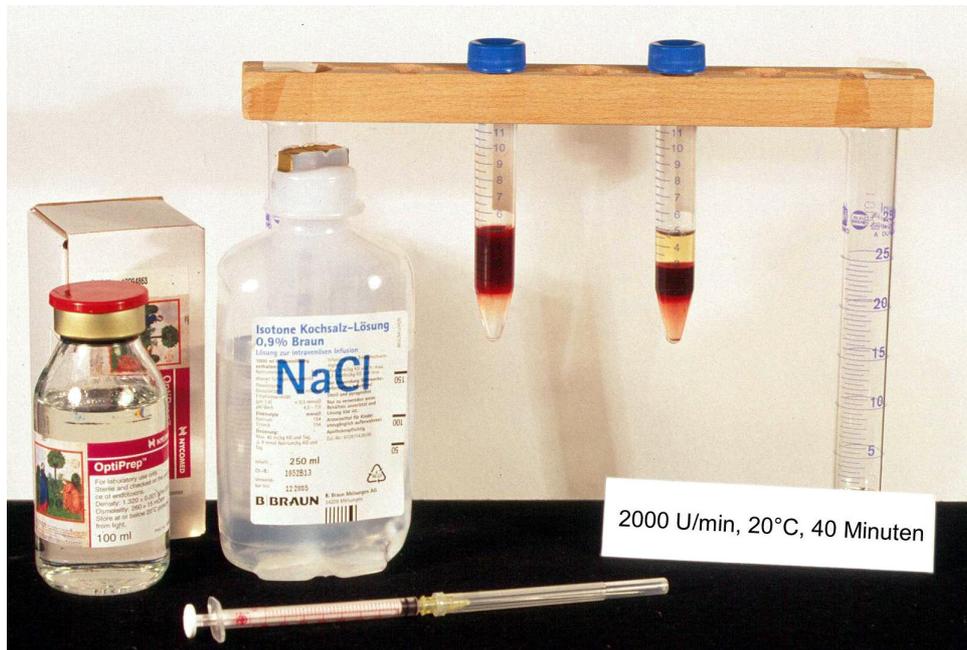


Abb. 10: Versuchsaufbau

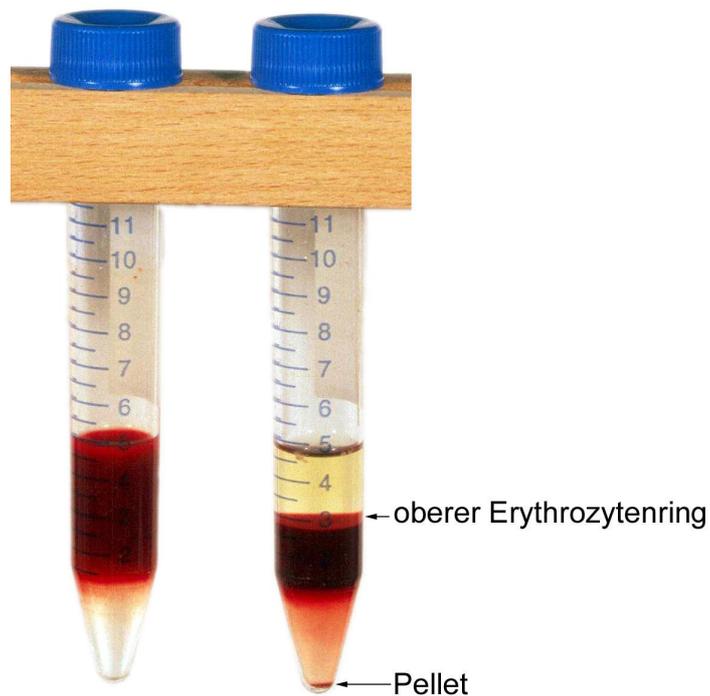


Abb. 11: links vor der Dichtezentrifugation, rechts nach der Dichtezentrifugation

3.15. Ansetzen der Annexinlösung

Nach dem angegebenen Rezept des Annexin-V-FLUOS Staining Kit wurden 4 µl Annexin-V-Fluorescein mit 200 µl HEPES-Puffer verdünnt. Das Propidiumjodid wurde nicht hinzugefügt, da eine Abgrenzung zu nekrotischen Zellen nicht notwendig war. Der Farbstoff setzt außerdem das Vorhandensein von denudierter DNA, wie sie bei Nekrose auftritt, voraus, was bei Erythrozyten nicht zu erwarten ist. Der Lösungsansatz musste in einem Eppendorfhütchen dunkel gelagert werden.

3.16. Waschung des oberen Erythrozytenringes und des Pellets

Nach der Dichtezentrifugation wurden mit einer heparinisierten Einmal-Mikropipette 0,5 µl Erythrozyten aus dem oberen Erythrozytenring entnommen und zu 5 ml NaCl in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Danach konnte der Überstand bis zum Pellet mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und verworfen werden. Es wurden ebenfalls 0,5 µl Erythrozyten aus dem Pellet entnommen und zu 5 ml NaCl in ein Zentrifugenröhrchen gegeben.

Beide Röhrchen wurden zweimal eine Minute lang bei 3.200 U/min (Stufe 4) in der Labofuge I zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes mit NaCl auf 5 ml wieder aufgefüllt.

3.17. Inkubation

Die gewaschenen 0,5 µl Erythrozyten aus beiden Fraktionen wurden jeweils mit 10 µl NaCl und 100 µl Annexinlösung für 30 Minuten in einem Eppendorfhütchen im Dunkeln inkubiert.

3.18. Vorbereitung der Kammer

Zur Vorbereitung der Gewebezucht-Beobachtungs-Kammer „SELECTA“-Mikroaquarium-DBGM wurden die Metallklammern geöffnet und die Kammer im

aufgeklappten Zustand auf eine plane Unterfläche gelegt. Ein geputztes Deckgläschen (siehe Kapitel 3.18.1.) wurde mit einer Pinzette zur Vermeidung einer Verschmutzung in die Fassung des aufliegenden Teils gelegt; darauf wurde eine Gummidichtung mit dem breiteren Rand nach unten ausgerichtet und auf diese wiederum ein Deckgläschen gelegt. Nun wurde die Kammer zusammengeklappt, und die beiden Klammern wurden geschlossen.

3.18.1. Vorbereitung der Deckgläschen

Es wurde eine 10%ige Lösung aus dem Detergenz 7X der Firma Serva mit bidestilliertem Wasser hergestellt. In diese Lösung wurden die Deckgläschen für mindestens 24 Stunden gelegt. Anschließend wurden sie mit Aqua bidest. gespült und mit einem weichen, sauberen, staubfreien Tuch geputzt. Die geputzten Deckgläschen wurden in einem weiteren Schritt für mindestens 24 Stunden in eine 1:1 Lösung aus Aceton und Ethanol gelegt. Aus dieser Lösung durften die Deckgläschen nur noch mit einer sauberen Pinzette entnommen werden, um jegliche neue Verunreinigungen zu vermeiden. Die auf diese Weise entnommenen Deckgläschen wurden mit einem neuen, weichen, sauberen, staubfreien Tuch nochmals gründlich geputzt und in einem Glasbehälter mit Deckel, im Wechsel mit Josephs Papier geschichtet, aufbewahrt.

3.18.2. Befüllung der Kammer

Für die Untersuchung der Nullprobe wurde nach Platzierung des zweiten Deckgläschens auf der Dichtung und Schließung der Kammer mit einer Monovette und einer Kanüle die Kammer befüllt. Hierzu musste die Dichtung mit der Kanüle durchstochen werden, und die Kammer wurde somit blasenfrei komplett gefüllt. Vor der Untersuchung unter dem RKM blieb die Kammer für fünf Minuten ruhig liegen, damit sich die Erythrozyten auf dem unteren Deckgläschen absetzen konnten.

Für die Untersuchung der Annexinansätze wurde nach Ausrichtung der Gummidichtung die Kammer mit einer Eppendorfpipette befüllt. Danach konnte das zweite

Deckgläschen platziert und die Kammer geschlossen werden. Die Kammer blieb ebenfalls für fünf Minuten mit einer Abdeckung, um einen überflüssigen Lichtkontakt zu vermeiden, vor der Mikroskopie liegen.

3.19. Fotografie

Nachdem das Objektmikrometer jeweils im Hellfeld und im Phasenkontrast fotografiert worden war, wurden insgesamt 16 Ausschnitte der Nullprobe ausgewählt, die ebenfalls jeweils im Hellfeld und im Phasenkontrast festgehalten wurden. Für diese Aufnahmen wurde der AGFA 100 ASA Film verwendet.

Auch von den Annexinansätzen des oberen Erythrozytenringes und des Pellets wurden jeweils 16 Gesichtsfelder fotografiert, die zusätzlich mit dem KODAK Tmax p3200 Film belichtet wurden, um die auftretenden, grün erscheinenden Fluoreszenzen festzuhalten. Hierbei wurden zuerst fluoreszierende Ausschnitte fotografiert und anschließend phasenkontrastmikroskopische und reflexionskontrastmikroskopische Ansichten festgehalten, um nicht durch eine zu vermeidende Belichtung eine Schwächung der Fluoreszenz zu erzeugen.

4. Ergebnisse

4.1. Absolute und prozentuale Verteilung der Erythrozyten

	Phaco Erys	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4	Klasse 5	Summe
Nullprobe	7954	376	576	683	1145	3477	6257
leichte Erys	17003	2709	261	257	566	11105	14898
schwere Erys	16732	3243	414	300	641	8418	13016
Summe	41689						34171

Abb. 12: grundsätzliche Verteilung (absolute Zahlen)

Tabelle 12 zeigt eine grundsätzliche Verteilung der Erythrozyten (Erys), die anhand der fotografierten Ausschnitte auszuwerten waren, in phasenkontrastmikroskopischer und reflexionskontrastmikroskopischer Ansicht. Insgesamt konnten ca. 41.500 Erythrozyten im Phasenkontrast (Phaco) und ca. 34.000 Erythrozyten im Reflexionskontrast bewertet werden. Somit lässt sich feststellen, dass mehr Erythrozyten im Phasenkontrast als im Reflexionskontrast erkennbar sind.

Bezüglich der Nullprobe konnten ca. 8.000 Erythrozyten im Phasenkontrast und ca. 6.300 im Reflexionskontrast bewertet werden. Die Verteilung auf die jeweiligen Klassen zeigt, dass in der Nullprobe mit ca. 380 roten Blutkörperchen am wenigsten Klasse 1 und mit ca. 3.500 roten Blutkörperchen am meisten Klasse 5 Erythrozyten vorhanden sind. Es ist ein stetiger Anstieg von Klasse 1 bis 5 erkennbar.

Nach Zentrifugation findet sowohl bei den wenig dichten/leichten roten Blutkörperchen als auch bei den dichten/schweren eine Verteilung auf die Klassen 1 und 5 statt. Insgesamt konnten ca. 17.000 leichte bzw. 16.800 schwere Erythrozyten in phasenkontrastmikroskopischer Ansicht und ca. 14.900 leichte bzw. ca. 13.000 schwere Erythrozyten in reflexionskontrastmikroskopischer Ansicht ausgewertet werden.

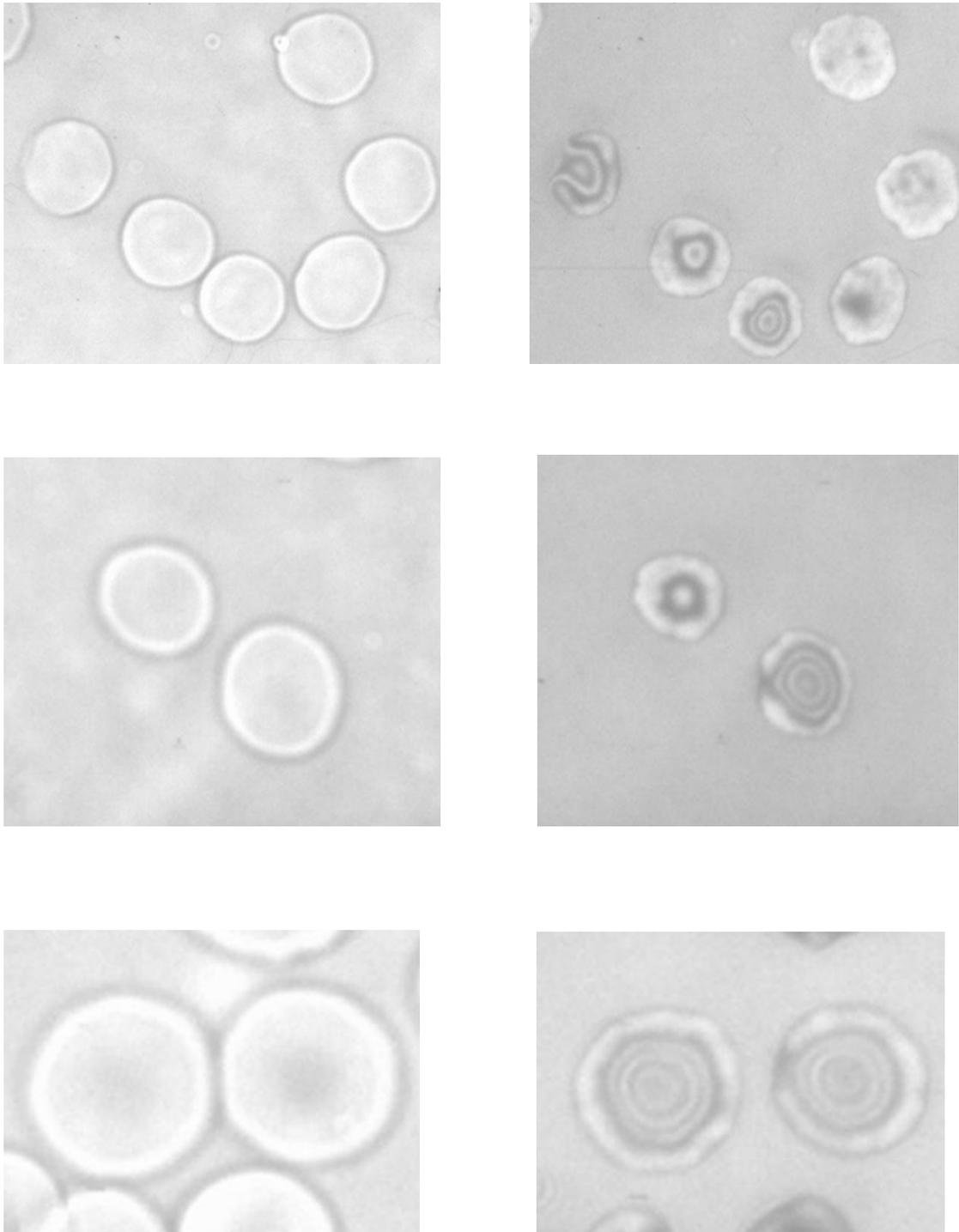


Abb. 13: Gegenüberstellung eines Phasenkontrastbildes (links) mit dem zugehörigen Reflexionskontrastbild (rechts)

Die Bildpaare zeigen unterschiedliche Ausschnitte aus den einzelnen Proben. Das erste Bildpaar stammt aus einer Probe von leichten Erythrozyten. Am rechten Bildrand kann man drei Klasse 5 Erythrozyten erkennen, die mit ihrer Unterseite komplett auf der Glasoberfläche aufliegen. Am unteren Rand befindet sich ein Klasse 1 Erythrozyt mit multiplen Interferenzringen und links von ihm ein Vertreter der Klasse 2 mit zentraler Interferenz. Das rote Blutkörperchen am linken Bildrand zeigt keine vollständige Auflagefläche. Das mittlere Bildpaar stammend aus einer Nullprobe zeigt einen Klasse 3 Erythrozyten, erkennbar an der fehlenden zentralen Interferenz, und einen Klasse 1 Erythrozyten. Das dritte Bildpaar stellt zwei Klasse 1 Erythrozyten dicht nebeneinander dar, die aus einer Probe des oberen Erythrozytenrings fotografiert wurden.

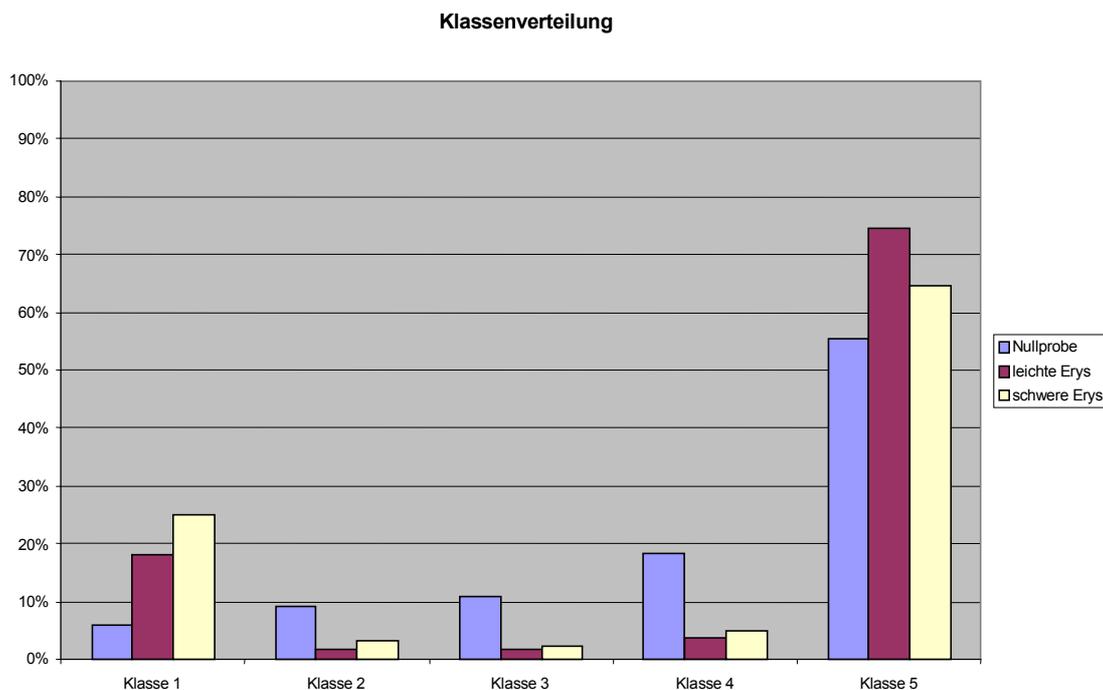


Abb. 14: prozentuale Verteilung der Klassen auf die einzelnen Proben

Das Säulendiagramm in Abbildung 14 zeigt die deutliche Besetzung der Klassen 1 und 5 nach Zentrifugation. Es gibt ca. 10% mehr leichte Klasse 5 Erythrozyten als schwere

und ca. 7% weniger Klasse 1 Erythrozyten, die leicht sind, verglichen mit den schweren. Die Klassen 2 bis 4 sind nach Zentrifugation mit ca. 2-5% sehr gering besetzt.

Die Nullprobe hingegen zeigt einen stetigen Mengenanstieg der roten Blutkörperchen von Klasse 1 mit ca. 5% Besetzung bis Klasse 5 mit ca. 55% Besetzung.

Die nachfolgenden Tabellen 15a-c stellen die jeweiligen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen dar. Man beachte die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen bei den schweren Erythrozyten von 17,8 (Klasse 1) und 18,2 (Klasse 5).

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Klasse 1_0-Probe_rel	20	0,00	18,80	6,4945	4,92934
Klasse 2_0-Probe_rel	20	2,18	22,92	10,2008	5,12865
Klasse 3_0-Probe_rel	20	2,01	21,43	12,2094	4,96335
Klasse 4_0-Probe_rel	20	6,71	34,99	19,4348	7,12232
Klasse 5_0-Probe_rel	20	41,20	85,45	63,8698	11,47098
Gültige Werte (Listenweise)	20				

Abb. 15a: Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Klassen der Nullprobe

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Klasse 1_leichte Erys_rel	20	6,11	39,20	18,3036	9,88092
Klasse 2_leichte Erys_rel	20	0,00	5,08	1,8746	1,57660
Klasse 3_leichte Erys_rel	20	0,00	5,49	1,6974	1,48380
Klasse 4_leichte Erys_rel	20	0,18	8,40	3,6988	1,91759
Klasse 5_leichte Erys_rel	20	53,96	91,89	74,4256	10,48929
Gültige Werte (Listenweise)	20				

Abb. 15b: Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Klassen bei leichten Erys

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Klasse 1_schwere Erys_rel	20	4,32	74,27	25,6384	17,83343
Klasse 2_schwere Erys_rel	20	0,32	13,46	3,6310	3,99830
Klasse 3_schwere Erys_rel	20	0,42	12,22	2,5296	2,62633
Klasse 4_schwere Erys_rel	20	2,87	8,18	5,0535	1,56973
Klasse 5_schwere Erys_rel	20	19,06	88,89	63,1474	18,27138
Gültige Werte (Listenweise)	20				

Abb. 15c: Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Klassen bei schweren Erys

4.2. Blutgruppenverteilung

Blutgruppe	N
0	10
A	7
B	3
AB	0
rh neg	6
rh pos	14
Kell neg	20
Kell pos	0

Abb. 16: absolute Verteilung der Blutgruppen

Tabelle 16 zeigt das Blutgruppenvorkommen verteilt auf die 20 untersuchten Probanden. Nach der AB0-Klassifikation konnten 50% der Blutgruppe 0, und 0% der Blutgruppe AB zugeordnet werden. Gruppe A war ca. doppelt so häufig vertreten wie Klasse B.

14 der 20 Probanden zeigten ein positives Rhesusmerkmal, folglich hatten 6 Probanden eine negative Rhesusgruppe. Dieses entspricht einer prozentualen Verteilung von 70% zu 30%.

Keiner der Probanden konnte zu einer positiven Kell-Blutgruppe zugeordnet werden. Demnach besaßen alle Probanden ein negatives Kellmerkmal.

Bezüglich der Rhesusuntergruppen konnte nur eine diffuse Verteilung der Klassen festgestellt werden, deren Auswertung kein interpretierbares Ergebnis erbracht hätte.

Nachfolgend zeigt Abbildung 17 die Verteilung der Klasse 5 Erythrozyten auf die Blutgruppen 0, A und B. Die drei Boxplots stellen jeweils die Verteilung in der Nullprobe, der Probe der leichten Erythrozyten und der Probe der schweren Erythrozyten dar. Die direkte Gegenüberstellung der jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen lässt eine Vermutung bezüglich Signifikanzen zu, die jedoch im Einzelnen nicht bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 4.3.). Die Untersuchung bezüglich der restlichen Klassen ergab jeweils ein entsprechendes Ergebnis.

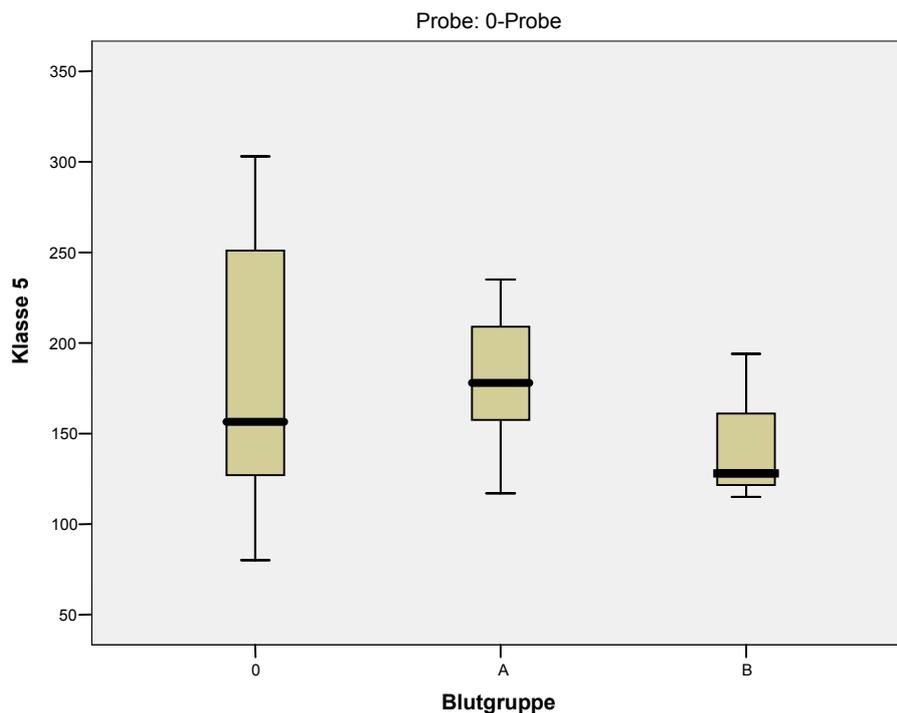


Abb. 17 a): Verteilung der Klasse 5 Erythrozyten der Nullprobe auf die AB0-Blutgruppe

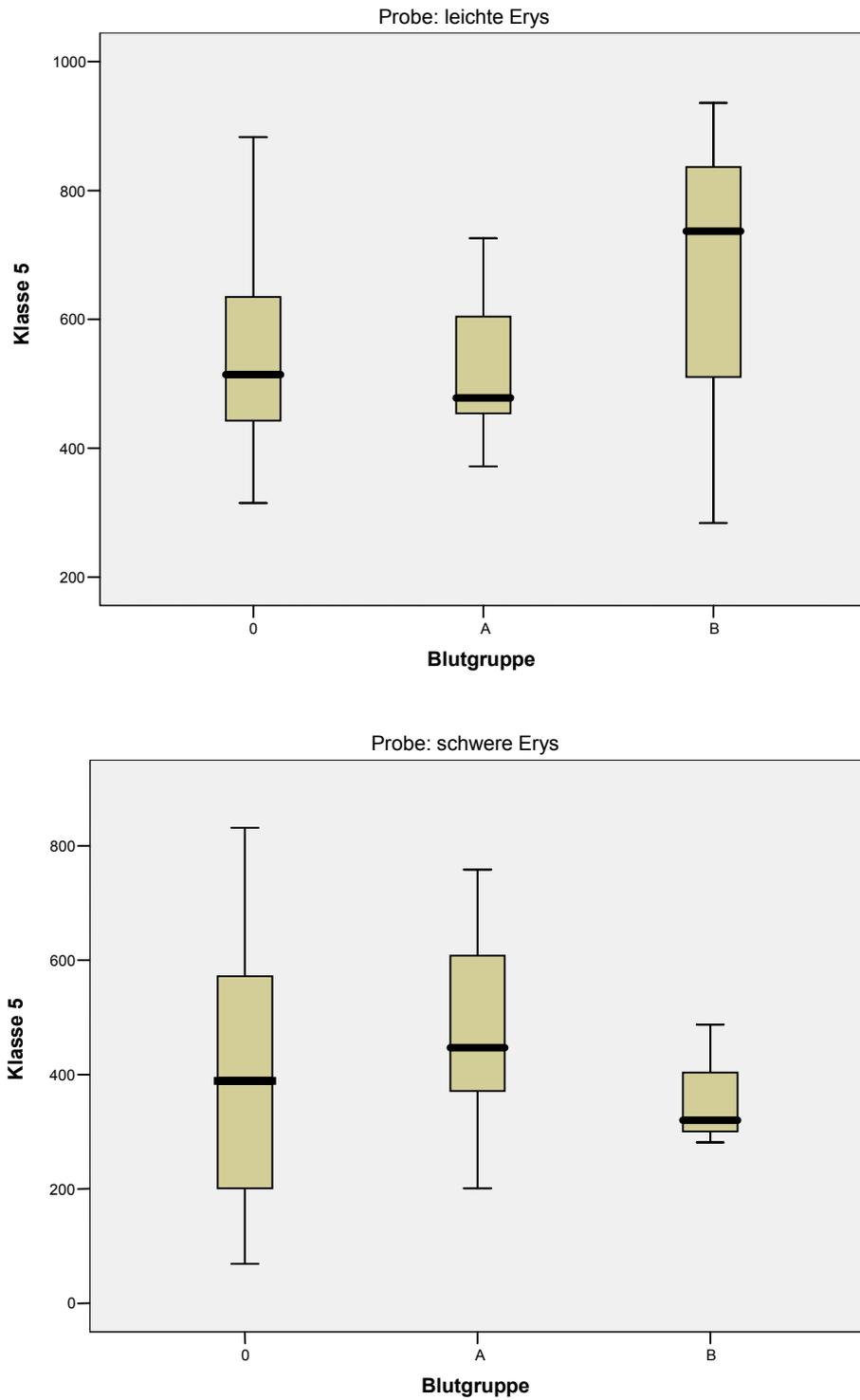


Abb. 17 b), c) : Verteilung der Klasse 5 Erythrozyten der Proben der leichten und schweren Erythrozyten auf die AB0-Blutgruppe

4.3. Signifikanzen

Pro Proband konnten im Mittel 18,65 phosphatidylserin-positive Erythrozyten in der Probe der leichten roten Blutkörperchen und 20,8 in der Probe der schweren Erythrozyten gefunden werden, wobei Ghosts mit einbezogen wurden. Unter Verwendung des Wilcoxon-Tests konnte diesbezüglich ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 0,097 festgestellt werden. Somit kamen mehr fluoreszierende Erythrozyten im Pellet als im oberen Erythrozytenring vor. Abbildung 18 a) zeigt vier rote Blutkörperchen, die kreisförmig fluoreszieren. Das dazugehörige Phasen- und Reflexionskontrastbild (Abb. 18 b) und c)) zeigt die entsprechenden Erythrozyten nicht, was darauf hinweist, dass es sich um Ghosts handelt.

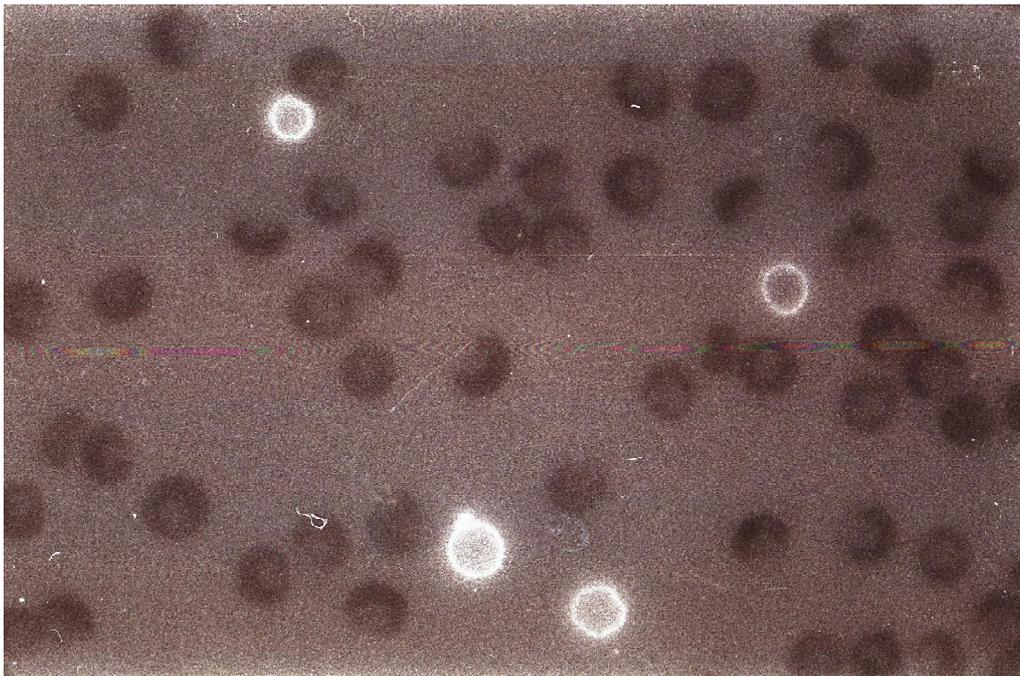


Abb. 18 a) : Erythrozyten im RKM mit Fluoreszenzeinstellung

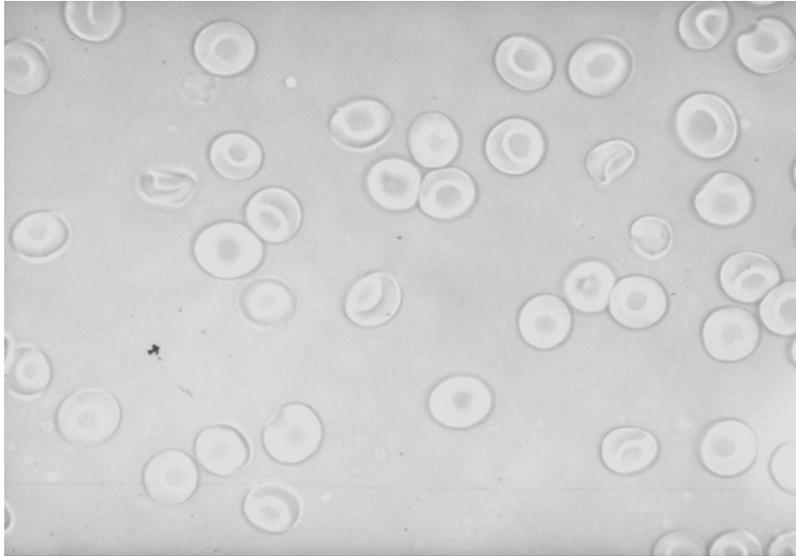


Abb. 18 b) : Erythrozyten mit Phasenkontrasteinstellung

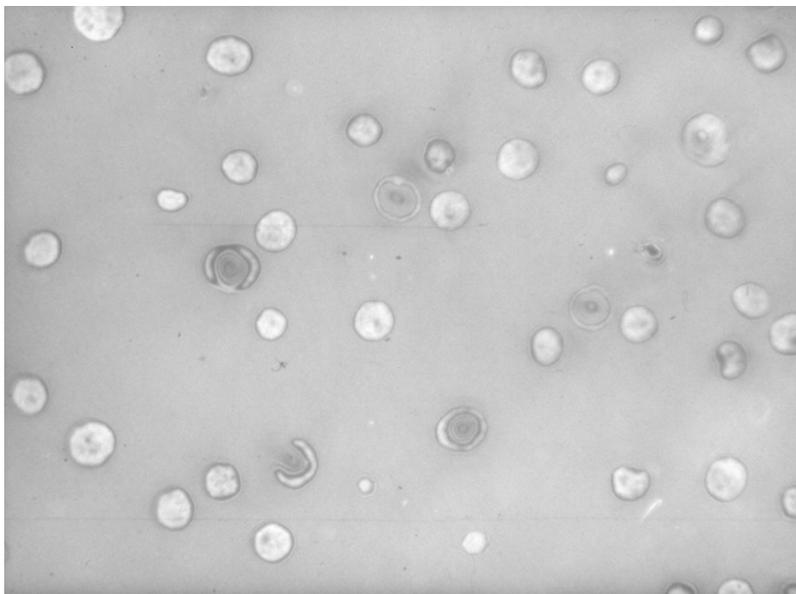


Abb. 18 c) : Erythrozyten mit Reflexionskontrast

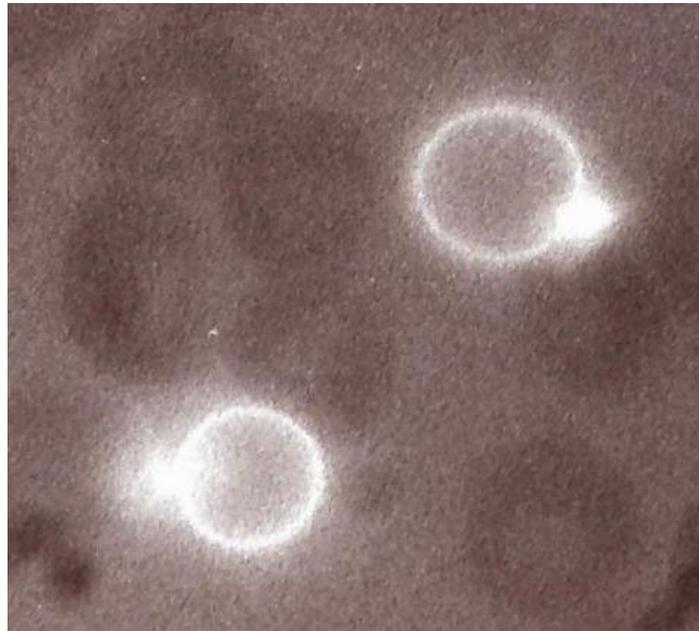


Abb. 19: Zwei fluoreszierende Erythrozyten mit Annexin V-positiven Vesikeln

Obwohl anhand der in Abbildung 17 gezeigten Boxplots durch Darstellung der Verteilung der Klasse 5 Erythrozyten der einzelnen Proben auf die AB0-Blutgruppen optisch eine Signifikanz zu erwarten ist, konnte dieses in den jeweiligen Signifikanztests nicht nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (Kreuztabelle) wurde geprüft, ob signifikante Differenzen zwischen der Anzahl der leichten und der Menge der schweren Erythrozyten bezüglich Klassen 1 und 5 bestehen. Die Daten lagen in nominal bzw. ordinal skalierten Kategorien vor. Die Nullhypothese lautet, dass ein Unterschied besteht, wohingegen die Alternativhypothese keinen Unterschied festlegt. Bezüglich der Klasse 1 konnte bei einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 0,101 kein Unterschied festgestellt werden. Hingegen zeigte Klasse 5 bei gleichem Test und gleichem Signifikanzniveau mit 0,026 einen signifikanten Unterschied. Dieses bedeutet, dass

unter leichten Erythrozyten signifikant mehr der Klasse 5 vertreten sind als unter schweren.

Es wurde ebenfalls mit dem Chi-Quadrat-Test der Einfluss des Rhesusfaktors auf die Verteilung der Erythrozyten in den Klassen 1 und 5 untersucht. Wieder lautet die Nullhypothese, dass ein Unterschied in der Besetzung besteht; die Alternativhypothese besagt das Gegenteil. Bei einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 0,271 kann kein Unterschied bezüglich der Besetzung der Klasse 1 in Abhängigkeit vom Rhesusfaktor in der Nullprobe festgestellt werden. Ebenfalls kann bei gleichem Signifikanzniveau mit 0,335 kein Unterschied in der Klasse 5 Verteilung der Nullprobe dokumentiert werden.

Bezüglich der Kell-Klassifikation und der Rhesusuntergruppen können keine Aussagen getroffen werden, da die Probandenzahl für eine solche Untersuchung zu klein ist.

5. Diskussion

Grundlage dieser Arbeit war die von Mecklenbrauck durchgeführte Pilotstudie zur Untersuchung der Phosphatidylserin-Exposition bei alternden Erythrozyten und der Identifikationsmöglichkeit von Erythrozyten-Subpopulationen durch Apoptose-Marker. Die Ergebnisse sollten durch Erhöhung der Probandenzahl und somit der zu untersuchenden roten Blutkörperchen auf einem statistisch relevanten Niveau validiert werden.

Mit einer Anzahl von 41.000 bzw. 34.000 ausgezählten Erythrozyten in dieser Studie kann von einer breiten, aussagekräftigen, statistischen Basis ausgegangen werden. Die erste Zahlenangabe bezieht sich auf die phasenkontrastmikroskopische Auszählung, die zweite auf die reflexionskontrastmikroskopische. Die unterschiedlichen Mengen können durch die größere Schärfentiefe beim Phasenkontrast erklärt werden, die jedoch auch vermehrt Überlagerungen in der Betrachtung zulässt. Insgesamt jedoch liefert das RKM durch geringe Schärfentiefe wenig Überlagerungen oder durch Streustrahlung erzeugte Unschärfen (Filler 1997).

In Übereinstimmung mit Mecklenbraucks Ergebnissen und zahlreichen in der Literatur zu findenden Studien, in denen mittlerweile standardmäßig der Fluoreszenz-Marker Annexin V zur Markierung von Phosphatidylserin verwendet wird, konnte eine spezifische Bindung des Annexins V an das Phosphatidylserin bestätigt werden. Unbekannt war bisher, ob nach Auftrennung entsprechend der Dichte und anschließender Behandlung entsprechend der Färbvorschrift noch Interferenzfiguren zur Klassifizierung in statistisch auswertbarer Größenordnung zeigen. Die Frage, ob Annexin V die Membran penetrieren und Markierungen an der Innenseite vornehmen kann, wurde bisher zahlreich untersucht (Kuypers et al. 1996, van Engeland et al. 1998, Mecklenbrauck 2003) und auch unsere Ergebnisse liefern keinen Anhalt dafür, dass eine Bindung des Annexins V auf Zytosolseite durch Penetration der intakten Membran möglich ist.

Die Annexin V-Bindung ist calciumabhängig, was durch die fehlende Fluoreszenz bei Verwendung von EDTA-Monovetten in unserem Vorversuch eindeutig belegt werden kann (siehe Kapitel 3.10.1.). Durch den Calciumkomplexbildner wurde die reversible Bindung an das Phosphatidylserin verhindert. Die EDTA-Monovetten wurden durch Lithium-Heparin-Monovetten ausgetauscht.

Balasubramanian et al. diskutierten im Jahr 2001 die ebenfalls calciumabhängige Bindung von Annexin V und Malondialdehyd (MDA), das durch Lipid-Peroxidation in oxidativ gestressten Zellen und Geweben entsteht. Die Reduktion dieses Produktes hat bei Diabetes-Typ-II-Patienten eine verbesserte Blut-Rheologie bewirkt (Chung et al. 1998). Da oxidativer Stress ohnehin zu einer erhöhten Phosphatidylserin-Exposition führt (Mandal et al. 2002), sollte die Bindungsfähigkeit von MDA mit Annexin V bei der Beurteilung von Apoptosevorgängen relativiert werden.

Durch die vorliegende Arbeit konnte die Annahme, dass ältere, dichtere Erythrozyten mehr Phosphatidylserin exponieren als jüngere, weniger dichte Erythrozyten statistisch validiert werden. Das Signifikanzniveau von 0,097 zeigt zwar keine hohe Signifikanz, jedoch muss das methodische Vorgehen diesbezüglich in dieser Arbeit beachtet werden. Da bei der Auswahl der fotografierten Ausschnitte bevorzugt Fluoreszenzen betrachtet wurden und somit die Ausschnitte nicht frei gewählt wurden, ist dieses Ergebnis lediglich ein Anhaltspunkt, denn es ist klar davon auszugehen, dass ohne diese systematische Beeinflussung zur Beantwortung der Frage ein hochsignifikantes Ergebnis zu erwarten ist. Diese Tatsache sollte als Anstoß für eine weitere Studie dienen, in der randomisiert Ausschnitte gewählt werden unabhängig davon, ob Fluoreszenzen sichtbar sind oder nicht. Durch das primäre Fotografieren des phasen- bzw. kontrastmikroskopischen Ausschnittes und das nachfolgende Betrachten der Fluoreszenz bewirkte die Belichtung eine starke Verringerung bis hin zu einem Verlust der Fluoreszenz.

Bezüglich der Methodik sollte ebenfalls die Auszählung der Erythrozyten mit dem bloßen Auge kritisch betrachtet werden. Sie unterliegt der individuellen Fehlerquote des Untersuchers, was aber in der vorliegenden Arbeit aufgrund der hohen statistischen Basis und vorheriger Verblindung nicht als relevante Fehlerquelle im Sinne der Fragestellung anzusehen ist. Als Weiterführung dieser Arbeit sollte die Auswertung mit einem speziellen Bildanalysesystem erfolgen und die Ergebnisse könnten digital verglichen werden.

Wesentliche Ziele der Arbeit waren die Fragen:

Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Blutgruppe und der Phosphatidylserin-Exposition an der Membranaußenseite oder der Klassenverteilung von unfixierten Erythrozyten?

Lässt sich eine altersspezifische Verteilung der Klassenbesetzung von unfixierten Erythrozyten nachweisen?

Korreliert die zunehmende Adhäsion von Erythrozyten mit deren zunehmendem Alter mit einer Phosphatidylserin-Exposition an der Membranaußenseite?

Die Beobachtung von Mecklenbrauck bezüglich der Klassenverteilung auf den oberen Erythrozytenring und das Pellet konnte in unserer Studie jedoch nicht nachvollzogen werden. Es konnten signifikant mehr Klasse 5 Erythrozyten in der Probe der leichten roten Blutkörperchen als im Pellet nachgewiesen werden. Klasse 5 Erythrozyten sind flexibler und besitzen durch Schrumpfung einen geringeren Umfang als junge Klasse 1 oder 2 Vertreter. Somit besteht kein Zusammenhang zwischen der Phosphatidylserinverteilung und den Klassen.

Bezüglich des Einflusses der Blutgruppen nach der AB0-Klassifikation und der Rhesus-Einteilung auf die Verteilung der Erythrozyten der Klassen 1 und 5 konnten keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden. Dies hätte bedeutet, dass eine Kopplung der Blutgruppeneigenschaft mit dem Zytoskelett vorliegen müsste, was aber durch

unsere Ergebnisse nicht verifiziert werden konnte. Die Ergebnisse von Kuypers, Smith und Geldwerth aus den Jahren 1984, 1990 und 1997 bezüglich ihrer Untersuchungen des Einflusses der Blutgruppen auf die Phosphatidylserinverteilung können mit dieser Arbeit bestätigt und vervollständigt werden. Weder das Rhesus-Polypeptid noch der Membranaufbau bei A-, B- oder 0-Blutgruppenträgern hat irgendeinen Einfluss auf die Phosphatidylserinverteilung oder dessen Transport durch mögliche Beeinflussung oder Transaktion mit Aminophospholipidtransportern bzw. Caspasen. Eine Beurteilung hinsichtlich der Einteilung nach Kell oder der Rhesusuntergruppen war aufgrund der zu geringen Probandenzahl nicht möglich, jedoch gibt es auch in der Literatur keinen Anhalt dafür, dass ausgerechnet diese Blutgruppenmerkmale relevant für die Fragestellung sein könnten.

5.1. Ausblick

Es ist mittlerweile bekannt und wurde zahlreich untersucht, dass Krankheiten, wie z. B. die Sichelzellanämie, der Diabetes mellitus, die Urämie und einige Fälle der β -Thalassämie, einer Erbkrankheit, bei der die Lebensdauer von Erythrozyten auf 30-40 Tage reduziert ist, auf die beschriebenen Vorgänge der Phosphatidylserin-Exposition und deren Folgen zurückzuführen sind. Die meisten Patienten mit hämolytischen Anämien zeigen jedoch die Anzeichen für ein erhöhtes Phosphatidylserin-Vorkommen nicht, was darauf hinweist, dass es im Fall dieser Erkrankung eine andere Signaltransduktion der Erythrozytenelimination geben muss (Boas et al. 1998). Sowohl osmotischer bzw. oxidativer Stress, Glukose- und Eisenmangel, als auch der Kontakt mit Blei- und Quecksilberionen und geringe Konzentrationen des Wirkstoffs Chlorpromazin sind als Trigger der erythrozytären Apoptose identifiziert worden (Lang et al. 2003, Kempe et al. 2005, Eisele et al. 2006, Akel et al. 2006). Auch lange Zeit nach Chemotherapie können bei Leukämie-Patienten Phosphatidylserin-präsentierende Erythrozyten nachgewiesen werden, was auf die verminderte Phagozytose als Folge der Knochenmark-Suppression zurückzuführen ist (Zhang et al. 2005). Die Arbeiten von

Lang et al. aus den Jahren 2004 und 2005 weisen jedoch auf wichtige neue Ansatzpunkte hin, um den Mechanismus der PS-Exposition zu unterbrechen. Er fand heraus, dass verschiedene Katecholamine wie z. B. Phenylephrin und Dopamin die durch Ca^{2+} -Einstrom bedingte Präsentation von Phosphatidylserin nach außen inhibieren. Sie wirken -direkt oder indirekt- auf die Calcium-permeablen Kationen-Kanäle (Lang et al. 2005). Eine ähnliche Wirkung wird den Cl^- -Ionen zugesprochen. Harnstoff hemmt die Sphingomyelinase und somit die Wirkung von Ceramiden, die als Trigger der Scramblase gelten (Lang et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit dient ebenfalls dem besseren Verständnis der Erythrozytenelimination. Durch die Auftrennung der roten Blutkörperchen mittels Dichtezentrifugation und anschließende Annexin-Markierung kann festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Zelldichte und Phosphatidylserin-Exposition besteht. Durch die Einteilung in die verschiedenen Erythrozytenklassen konnte nachgewiesen werden, dass statistisch signifikant mehr leichte Erythrozyten in der Klasse 5 vertreten sind als schwere. In dieser Studie besteht kein nachweisbarer Zusammenhang zwischen Phosphatidylserin-Exposition und Klassenverteilung. Die Blutgruppenbestimmung dient ebenfalls nicht als Merkmal für eine gesteigerte oder verminderte Phosphatidylserin-Präsentation nach außen. Sie ist zudem auch kein einflussnehmender Faktor bei der Klassenverteilung.

Diese Untersuchungen bieten entscheidende Anhaltspunkte, um die Reaktionskaskade der Eryptose genauer aufzuschlüsseln und unterbrechen zu können, damit die Therapie der Erkrankungen in Zukunft verbessert werden kann. Nicht zuletzt kann auch die Problematik der begrenzten Haltbarkeit der Erythrozytenkonzentrate in der Transfusionsmedizin angegangen werden, die neben begrenzter Verfügbarkeit für den Patienten auch ein wirtschaftliches Problem darstellt. Jedoch konnte bis heute nicht geklärt werden, wie und warum ein Erythrozyt eine so genau begrenzte Lebensspanne von ca. 120 Tagen hat.

6. Zusammenfassung

Es ist unzweifelhaft, dass menschliche Erythrozyten eine begrenzte Lebenszeit von ungefähr 120 Tagen haben. Diese simple Feststellung impliziert, dass trotz Fehlen aller Zellorganellen Leben und Sterben eines Erythrozyten gut reguliert sind. Im Laufe der letzten Jahre wurde das Altern der roten Blutkörperchen untersucht, und der Verdacht liegt mittlerweile sehr nahe, dass es sich um eine Sonderform von Apoptose handelt, die durch verschiedene Stoffe getriggert werden kann. Phosphatidylserin, ein Membranlipid, spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Elimination von alternden Zellen.

Aus einem Kollektiv von 20 gesunden, männlichen Probanden wurden jeweils 4 ml Venenblut entnommen. Nach Separierung der Blutbestandteile wurden die Erythrozyten durch Dichtezentrifugation und anschließender Annexin V FLUOS-Inkubation aufgetrennt und Phosphatidylserin an der Membranaußenseite detektiert. Sowohl Durchlicht- als auch Reflexionskontrast- und Fluoreszenzbilder identischer Objektstellen wurden mit Hilfe des Reflexionskontrastmikroskops angefertigt und verglichen. Anhand des Adhäsionsverhaltens wurden ca. 34.000 Erythrozyten nach dem von Filler et al. 1996 vorgestellten Klassifikationsschema in fünf verschiedene Klassen unterteilt. Zusätzlich erfolgte eine Blutgruppenbestimmung aller Probanden in der AB0-, Rhesus- und Kell-Klassifikation.

Phosphatidylserin konnte in der Fraktion der Erythrozyten mit hoher Dichte eindeutig häufiger markiert werden als in der Fraktion der roten Blutkörperchen mit geringer Dichte, was bestätigt, dass alternde Zellen eine erhöhte Dichte aufweisen. Klasse 5 Erythrozyten sind signifikant häufiger von leichten Erythrozyten vertreten als von schweren. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen PS-Vorkommen und Klassenverteilung nachgewiesen werden. Auch die Blutgruppe hat keinen Einfluss auf eine vermehrte bzw. verminderte PS-Exposition oder Klassenverteilung.

7. Literaturverzeichnis

7.1. Gedruckte Quellen

1. Akel A, Hermle T, Niemoeller OM, Kempe DS, Lang PA, Attanasio P, Podolski M, Wieder T, Lang F: **Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine.** Eur J Pharmacol, 532(1-2): 11-17 (2006)
2. Allan D, Walklin CM: **Endovesiculation of human erythrocytes exposed to sphingomyelinase C: a possible explanation for the enzyme-resistant pool of sphingomyelin.** Biochim Biophys Acta, 938(3): 403-410 (1988)
3. Allen TM, Williamson P, Schlegel RA: **Phosphatidylserine as a determinant of reticuloendothelial recognition of liposome models of the erythrocyte surface.** Proc Natl Acad Sci USA, 85(21): 8067-8071 (1988)
4. Balasubramanian K, Bevers EM, Willems GM, Schroit AJ: **Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation.** Biochem, 40(30): 8672-8676 (2001)
5. Bassé F, Stout JG, Sims PJ, Wiedmer T: **Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid.** J Biol Chem, 271(29): 17205-17210 (1996)

6. Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF: **Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine.** *Circ Res*, 77(6): 1136-1142 (1995)

7. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DWC, Harmsma M, Zwaal RFA: **Regulatory mechanism of transmembrane phospholipid distribution and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling.** *Lupus*, 7 Suppl 2: 126-131 (1998)

8. Bildirici L, Rickwood D: **Fractionation of differentiating cells using density perturbation.** *J of Imm Meth*, 240: 93-99 (2000)

9. Billington D, Maltby PJ, Jackson AP, Graham JM: **Dissection of hepatic receptor-mediated endocytic pathways using self-generated gradients of Iodixanol (Optiprep).** *Analytical Biochem*, 258: 251-258 (1998)

10. Boas FE, Forman L, Beutler E: **Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in haemolytic anemia.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(6): 3077-3081 (1998)

11. Bonomini M, Sirolli V, Reale M, Arduini A: **Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes.** *Am J Kidney Dis*, 37(4): 807-814 (2001)

12. Bonomini M, Sirolli V, Gizzi F, di Stante S, Grilli A, Felaco M: **Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure.** *Kidney International*, 62: 1358-1363 (2002)
13. Bosman GJCGM, Willekens FLA, Were JM: **Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?** *Cell Physiol Biochem*, 16(1-3): 01-08 (2005)
14. Bratosin D, Mazurier J, Tissier J-P, Estaquier J, Huart J-J, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J: **Cellular and molecular mechanism of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review.** *Biochim*, 80: 173-195 (1998)
15. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier J-P, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart J-J, Montreuil J, Ameisen JC: **Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria.** *Cell Death Differ*, 8(12): 1143-1156 (2001)
16. Brito MA, Silva RF, Brites D: **Bilirubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes.** *Cell Biol Toxicol*, 18(3): 181-192 (2002)
17. Chung TW, Liu AG, Yu JH: **Increased red cell rigidity might affect retinal capillary blood flow velocity and oxygen transport efficiency in type II diabetes.** *Diabetes Res*, 23(2): 75-82 (1993)

18. Chung TW, Yu JJ, Liu DZ: **Reducing lipid peroxidation stress of erythrocyte membrane by alpha-tocopherol nicotinate plays an important role in improving blood rheological properties in type 2 diabetic patients with retinopathy.** Diabet Med, 15(5): 380-385 (1998)
19. Connor J, Charles CP, Schroit AJ: **Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells.** J Biol Chem, 269(4): 2399-2404 (1994)
20. Daleke DL: **Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry.** J Lipid Res, 44: 233-242 (2003)
21. Daugas E, Candé C, Kroemer G: **Erythrocytes: death of a mummy.** Cell Death Differ, 8(12): 1131-1133 (2001)
22. de Jong K, Geldwerth D, Kuypers FA: **Oxidative damage does not alter membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes.** Biochem, 36: 6768-6776 (1997)
23. de Jong K, Rettig MP, Low PS, Kuypers FA: **Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells.** Biochem, 41: 12562-12567 (2002)
24. Devaux PF: **Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers.** Current Opinion in Structural Biology, 3: 489-494 (1993)

25. Diaz C, Schroit AJ: **Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry.** J Membrane Biol, 151: 1-9 (1996)
26. Eisele K, Lang PA, Kempe DS, Klarl BA, Niemöller O, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: **Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions.** Toxicol Appl Pharmacol, 210(1-2): 116-122 (2006)
27. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM: **A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.** Nature, 405: 85-90 (2000)
28. Filler TJ: **Computer-gestützte Reflexionskontrastmikroskopie als hereutisches Prinzip in theoretischer und praktischer Medizin.** Habilitationsschrift der WWU Münster, Schöling-Verlag, ISBN 3-390962-22-5 (1998)
29. Filler TJ, Peuker ET: **Reflection contrast microscopy (RCM): a forgotten technique?** J Pathol, 190: 635-638 (2000)
30. Filler TJ, Rickert CH, Pera F: **Adhäsions- und Interferenzfiguren unfixierter Erythrozyten.** Ann Anat, 178: 237-242 (1996)
31. Geldwerth D, Cherif-Zahar B, Helley D, Gane P, Freyssinet JM, Colin Y, Devaux PF, Cartron JP: **Phosphatidylserine exposure and aminophospholipid translocase activity in Rh-deficient erythrocytes.** Mol Membr Biol, 14(3): 125-132 (1997)

32. Geldwerth D, Helley D, de Jong K, Sabolovic D, Sestier C, Roger J, Pons J-N, Freyssinet J-M, Devaux PF, Kuypers FA: **Detection of phosphatidylserine surface exposure on human erythrocytes using Annexin V-Ferrofluid.** Biochem Biophys Res Comm, 258: 199-203 (1999)
33. Graziani-Bowering GM, Graham JM, Filion LG: **A quick, easy and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes.** J of Imm Meth, 270: 157-168 (1997)
34. Kempe DS, Lang PA, Eisele K, Klarl BA, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: **Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions.** Am J Physiol Cell Physiol, 288: C396-C402 (2005)
35. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F: **Protein kinase C mediates erythrocyte “programmed cell death” following glucose depletion.** Am J Physiol Cell Physiol, 290(1): C244-C253 (2006)
36. Kuypers FA, PhD: **Phospholipid asymmetry in health and disease.** Curr Opin Hematol, 5(2): 122-31 (1998)
37. Kuypers F, van Linde-Sibenius-Trip M, Roelofsen B, Tanner MJA, Anstee DJ, op den Kamp JAF: **Rh_{null} human erythrocytes have an abnormal membrane phospholipid organization.** Biochem J, 221: 931-934 (1984)

38. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, Lubin BH: **Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V.** Blood, 87(1): 1179-1187 (1996)
39. Kuypers FA, de Jong K: **The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes.** Cell Mol Biol, 50(2): 147-158 (2004)
40. Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM: **Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes.** Cell Death Differ, 10: 249-256 (2003)
41. Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F, Duranton C: **Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻.** Am J Physiol Renal Physiol, 286: F1046-F1053 (2004)
42. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F: **Mechanisms of suicidal erythrocyte death.** Cell Physiol Biochem, 15(5): 195-202 (2005)
43. Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, Niemoeller OM, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F, Duranton C: **Inhibition of erythrocyte “apoptosis” by catecholamines.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 372(3): 228-235 (2005)

44. Lawall H, Angelkort B: **Correlation between rheological parameters and erythrocyte velocity in nailfold capillaries in patients with diabetes mellitus.** Clin Hemorheol Microcirc, 20(1): 41-47 (1999)
45. Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J: **Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalisation and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes.** FEBS Lett, 513(2-3): 184-188 (2002)
46. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J: **Fas-, Caspase 8-, and Caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes.** J Biol Chem, 280(47): 39460-39467 (2005)
47. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N: **Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability.** Proc Natl Acad Sci USA, 99(4): 1943-1948 (2002)
48. Mecklenbrauck A: **Lassen sich mit Apoptose-Markern Erythrozyten-Subpopulationen identifizieren?** Promotionsschrift (2003)
49. Myssina S, Huber S, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T, Lang F: **Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin.** J Am Soc Nephrol 14: 2750-2757 (2003)

50. Nagata S: **Apoptosis by death factor.** Cell, 88(1): 355-365 (1997)
51. Pan H, Feng L, Lu H, Xu C, Zhang P, Zhang Z: **Aging of human mature erythrocytes is like a process of apoptosis in enucleated cell.** Chin Med Sci J, 13(1): 20-23 (1998)
52. Parnaik R, Raff MC, Scholes J: **Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes.** Curr Biol, 10(2): 857-860 (2000)
53. Piomelli S, Seaman C: **Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age.** Am J Hematol, 42(1): 46-52 (1993)
54. Pradhan D, Williamson P, Schlegel RA: **Phosphatidylserine vesicles inhibit phagocytosis of erythrocytes with a symmetric transbilayer distribution of phospholipids.** Mol Membr Biol, 11(3): 181-187 (1994)
55. Priehn-Küpper S: **Der Saft, der es in sich hat.** zm, 93(13): 34-39 (1.7.2003)
56. Ravanat C, Archipoff G, Beretz A, Freund G, Cazenave J-P, Freyssinet J-M: **Use of annexin-V to demonstrate the role of phosphatidylserine exposure in the maintenance of haemostatic balance by endothelial cells.** Biochem J, 282: 7-13 (1992)

57. Schlegel RA, Williamson P: **Phosphatidylserine, a death knell.** Cell Death Differ 8(6): 551-563 (2001)
58. Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y: **In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes.** J Biol Chem, 260(8): 5131-8 (1985)
59. Shiffer KA, Rood L, Emerson RK, Kuypers FA: **Effects of phosphatidylinositol diphosphate on phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane.** Biochem, 37(10): 3449-3458 (1998)
60. Shinozuka T: **Changes in human red blood cells during aging in vivo.** Keio J Med, 43(3): 155-163 (1994)
61. Shiratsuchi A, Osada S, Kanazawa S, Nakanishi Y: **Essential role of phosphatidylserine externalisation in apoptosing cell phagocytosis by macrophages.** Biochem and Biophys Research Com, 246: 549-555 (1998)
62. Shohet SB, Bicknese SE: **Defining the architecture of the red blood cell membrane: newer biophysical approaches.** Am J Hematol, 42(1): 19-24 (1993)
63. Smith RE, Daleke DL: **Phosphatidylserine transport in Rh_{null} erythrocytes.** Blood 76(5) (September 1): 1021-1027 (1990)

64. Sutura SP, Gardner RA, Boylan CW, Carroll GL, Chang KC, Marvel JS, Kilo C, Gonen B, Williamson JR: **Age-related changes in deformability of human erythrocytes.** Blood 65(2): 275-282 (1985)
65. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM: **Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.** Cytometry 31: 1-9 (1998)
66. von Lindern M, Parren-van Amelsvoort M, van Dijk T, Deiner E, van den Akker E, van Emst-de Vries S, Willems P, Beug H, Löwenberg B: **Protein kinase C α controls erythropoietin receptor signaling.** J Biol Chem, 275(44): 34719-34727 (2000)
67. Vaysse J, Vassy R, Eclache V, Gattegno L, Bladier D, Pilardeau P: **Some characteristics of human red blood cells separated according to their size: a comparison with density-fractionated red blood cells.** Am J Hematol, 28(4): 232-238 (1988)
68. Walker JH, Boustead CM, Koster JJ, Bewley M, Waller DA: **Annexin V, a calcium-dependent phospholipid-binding protein.** Biochem Soc Trans, 20(4): 828-833 (1992)
69. Werre JM, Willekens FLA, Bosch FH, de Haan LD, van der Vegt SGL, van den Bos AG, Bosman GJCGM: **The red cell revisited – matters of life and death.** Cell Mol Biol, 50(2): 139-145 (2004)

70. Williamson P, Kulick A, Zachowski A, Schlegel RA, Devaux PF: **Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes.** Biochem, 31(27): 6355-6360 (1992)

71. Williamson P, van den Eijnde S, Schlegel RA: **Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells.** Methods Cell Biol, 66: 339-364 (2001)

72. Yawata Y: **Cell membrane: the red blood cell as a model.** Wiley-VCH, ISBN 3-527-30463-0 (2003)

73. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Nemoto A, Takahashi K, Sato H, Kagami K, Goi K, Sugita K, Nakazawa S: **Induction of impaired membrane phospholipid asymmetry in mature erythrocytes after chemotherapy.** Int J Hematol 82(2): 132-136 (2005)

74. Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ: **Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase.** J Biol Chem, 272(29): 18240-18244 (1997)

7.2. Online-Quellen

1. <http://gesundheit.de/roche/ro32500/r33406.html>, kein Autor genannt, Stand: 06.03.2003
2. http://www.kl.unibe.ch/kl/ipsla/2000_01/s1/Html/Blutgruppen.htm, kein Autor genannt, Stand: 06.03.2003
3. http://www.m-ww.de/krankheiten/blutkrankheiten/blut_blutgruppen.html, kein Autor genannt, Stand: 06.03.2003
4. <http://www.nycomed-diagnostics.com/gradmed/optiprep/opti1.html>, kein Autor genannt, Stand: 09.11.2000
5. <http://www.nycomed-diagnostics.com/gradmed/optiprep/opti2.html>, kein Autor genannt, Stand: 09.11.2000
6. http://www.progen.de/prod_show_D.php?search=1&id=507, kein Autor genannt, Stand: 10.02.2003
7. Blutspendedienst Baden-Württemberg, DRK Ortsverleih Durlach e.V., <http://www.drk-durlach.de/blutspendedienst/gruppen.html>, kein Autor genannt, Stand: 10.06.2003
8. Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen GmbH, http://www.bsdhessen.de/bsd/blutgruppenserologie_06.htm, kein Autor genannt, Stand: 10.06.2003

8. Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Timm Filler für die Bereitstellung dieser Arbeit und die geduldige und tatkräftige Unterstützung auch am Wochenende bedanken.

Des weiteren möchte ich Frau Sabine Kupich für ihre intensive Hilfe im Labor und stets am Telefon danken.

Meinem Freund Hans danke ich ganz besonders für seine einfühlsame und aufopferungsvolle Geduld bei allen formalen Problemen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Sylvia Loheide, die mich bei der Anfertigung der Fotos zur Darstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit sehr unterstützt hat.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern, die mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht haben.

Münster im März 2007,

Katrin Bongert

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Katrin Susanne Margarete Bongert
Geburtsdatum	15. November 1977
Geburtsort	Münster
Konfession	evangelisch
Eltern	Dr. med. Margrit Dreier-Bongert, geb. Dreier, Fachärztin für Anästhesie und Ottmar Bongert, Assessor des Bergfachs
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1984-1988	Antoniusgrundschule in Dorsten
1988-1997	St. Ursula Gymnasium in Dorsten
1995-1996	New Hampton School, New Hampton, New Hampshire, USA
1997	allgemeine Hochschulreife

Studium

1997-2002	Studium der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
23.12.2002	Approbation als Zahnärztin

Ausbildung

2003-2004

Assistenz Zahnärztin und Weiterbildungs-
assistentin für Oralchirurgie in der privaten
Gemeinschaftspraxis Dr. Dr. Erpenstein,
Dr. Borchard, Münster

seit Mai 2004

Weiterbildungsassistentin für Oralchirurgie
in der Poliklinik für Chirurgische Zahn-,
Mund- und Kieferheilkunde der Universität
Bonn (Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Wahl)