

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen**

**Abteilung Physiologie I**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Lang**

**Der Einfluss von Phlorizin auf den  
programmierten Zelltod  
von Erythrozyten**

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

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

**vorgelegt von**

**Anja Doris Meier**

**aus**

**Sonthofen**

**2013**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Gawaz

Für meine Familie

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Erythrozyten .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Apoptose.....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Definition des Wortes Apoptose .....	5
2.2.2 Morphologie der Apoptose.....	5
2.2.3 Signalwege .....	6
2.2.3.1 Der extrinsische Signalweg .....	6
2.2.3.2 Der intrinsische Signalweg .....	8
2.2.3.3 Der alternative intrinsische Signalweg .....	10
2.2.3.4 Der Granzym B-Signalweg .....	11
2.2.4 Regulation der Apoptose .....	12
2.2.4.1 Angriffsstelle: extrinsischer Signalweg .....	12
2.2.4.2 Angriffsstelle: intrinsischer Signalweg .....	12
2.2.4.3 IAPs und Smac/DIABLO .....	13
2.2.5 Physiologische und pathologische Bedeutung .....	14
<b>2.3 Eryptose.....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Signalwege .....	15
2.3.2 Zelluläre K <sup>+</sup> Verluste .....	16
2.3.3 Kontrolle der Sphingomyelinase .....	16
2.3.4 Die Rolle der Kaspase-3 und -8.....	17
2.3.5 Einfluss durch Erythropoietin .....	17
2.3.6 Andere bisher bekannte Inhibitoren der Eryptose .....	19
2.3.7 Bisher bekannte Trigger der Eryptose .....	19
2.3.8 Klinische Bedeutung .....	19
<b>2.4 Phlorizin.....</b>	<b>20</b>
2.4.1 Phlorizin – Geschichtliches und Vorkommen .....	20
2.4.2 Struktur von Phlorizin.....	22
2.4.3 Beeinflussung des zellulären Glukosetransportes durch Phlorizin .....	22
2.4.4 Pharmakologisches Potenzial.....	24
2.4.4.1 Diabetes.....	24
2.4.4.2 Wirkungen auf den Glukosetransport in Gehirn und Gedächtnis .....	24
2.4.5 Die Rolle von Phloretin .....	25
<b>3 Ziel der Studie .....</b>	<b>26</b>
<b>4 Materialien .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Erythrozyten .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Verwendete Substanzen.....</b>	<b>27</b>
4.2.1 Phlorizin .....	27
4.2.2 Annexin V FITC .....	28
4.2.3 Fluo-3 AM Ester.....	28
<b>4.3 Verwendete Lösungen.....</b>	<b>29</b>
4.3.1 CPD-Puffer .....	29
4.3.2 SAG-M-Lösung .....	30
4.3.3 Ringer-Lösung .....	30

4.3.4	Glukosefreie Ringer-Lösung .....	31
4.3.5	Annexin Wash Buffer .....	31
4.3.6	PBS (Phosphate Buffered Saline) .....	32
4.3.7	t-BOOH .....	32
4.3.8	Glutathione Assay Kit .....	33
4.3.9	Perchlorsäure-Lösung .....	33
4.3.10	Kaliumhydrogencarbonat-Lösung .....	33
4.3.11	ATP .....	33
4.3.12	Luciferase .....	34
<b>4.4</b>	<b>Durchflusszytometrie – FACS Analyse .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Luminometer .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Annexin V-Bindung und forward scatter .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Messung des intrazellulären Kalziums .....</b>	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>Bestimmung der GSH/GSSG Rate .....</b>	<b>37</b>
<b>5.4</b>	<b>Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration .....</b>	<b>38</b>
5.4.1	Vorbereitung der Proben .....	38
5.4.2	Messen der Standardkurve .....	39
5.4.3	Messung der Proben .....	39
<b>5.5</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>6.1</b>	<b>Messung des intrazellulären Kalziums .....</b>	<b>40</b>
<b>6.2</b>	<b>Forward Scatter .....</b>	<b>41</b>
<b>6.3</b>	<b>Annexin V-Bindung .....</b>	<b>43</b>
<b>6.4</b>	<b>Auswirkungen von Phlorizin unter oxidativem Stress .....</b>	<b>45</b>
6.4.1	Bestimmung des intrazellulären Kalziums .....	45
6.4.2	Forward Scatter .....	46
6.4.3	Annexin V-Bindung .....	48
<b>6.5</b>	<b>Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration .....</b>	<b>50</b>
6.5.1	Erstellen der Standardkurve .....	50
6.5.2	Ergebnisse .....	51
6.5.2.1	Vergleich Ringer-Lösung und glukosefreie Ringer-Lösung .....	51
6.5.2.2	Vergleich Ringer-Lösung und Ringer-Lösung mit oxidativem Stress .....	52
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>7.1</b>	<b>Methodendiskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>7.2</b>	<b>Ergebnisdiskussion .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALPS	Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APLT	Aminophospholipidtranslokase
APO1	Apoptosis Antigen 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	B-cell-associated death promoter
Bak	B-cell-2 homologus antagonist/ killer
Bax	B-cell-2 associated X-protein
Bcl	B-cell
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
Bfl1	B-cell-2-related protein A1
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain agonist
Bim	B-cell-2 like protein 11
C	Kaspase
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CD	Cluster of differentiation
CG	Cytotoxic granule
Cl	Chlor
CPD (-Puffer)	Zitrat-Puffer (Citrat, Phosphat, Dextrose)
CrmA	Cytokine response modifier A
CTL	Cytotoxic Lymphocyte
CY	Cytoplasma
Cyt/Cyto	Cytochrom

DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFFA/B	DNA Fragmentation Factor A/B
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low PI
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death Receptor
EDAR	Ectodysplasin A Rezeptor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EIPA	Etylisopropylamilorit
EPO	Eritropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EV	Endocytic vesicle
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorting
FADD	FAS-associated death domain
FasL	Fas Ligant
Fe	Ferrum
FITC	Fluoreszenzthiozyanat
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-convertig enzyme
FLIP	FLICE inhibitor protain
FoxO	Forkhead box O Gene
FSC	Forward Scatter
GLUT	Glucosetransporter
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
H	Wasserstoff
HEPES	N-2- Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HUS	Hämolythisch Urämisches Syndrom
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
K	Kalium

Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
Mg	Magnesium
mM	Millimolar
MT	Mytochondrion
mV	Millivolt
n	Probenzahl
N	Stickstoff
Na	Natrium
NAC	N-Acetylcystein
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B-Cells
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NKC	Natural Killer Cell
NO	Stickoxid
O	Sauerstoff
OMI	Mitochondriale Serin Protease HRTA2
P	Phosphat
PAF	Platelet activiating factor
PC	Prokaspase
PFN	Perforin
PGE	Prostaglandin E
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTP	Permeability transition pores
puma	P53 upregulated modulator of apoptosis
rel.	Relativ
RIP	Ribomsom inactivating protein
RPM	Rounds Per Minute
S	Schwefel
SAG-M	Salzlösung, Adenin, Glukose, Mannitol
SEM	Standardfehler
SGLT	Sodium linked Glucosetransporter
SK	Small Conductance



Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSC	Side Scatter
Sur	Survivin
t-BOOH	Tert-Butylhydroperoxid
tBid	Truncated Bid
TC	Target cell
TL1A	TNF-like ligand 1A
TNFR	Tumor Necrose Faktor Rezeptor
TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Recptor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Morphologie der Apoptose (Yau 2004).....	6
<b>Abbildung 2:</b> Signalwege der Todesrezeptoren (Lavrik, Golks et al. 2005).....	8
<b>Abbildung 3:</b> Der intrinsische Signalweg (Leibowitz and Yu 2010) .....	10
<b>Abbildung 4:</b> Der Granzym B-Signalweg (Rousalova and Krepela 2010) .....	11
<b>Abbildung 5:</b> Signalwege der Eryptose (Lang) .....	18
<b>Abbildung 6:</b> Strukturformel von Phlorizin .....	22
<b>Abbildung 7:</b> Glucosetransport im Dünndarmepithel (Scheepers, Joost et al. 2004) .....	23
<b>Abbildung 8:</b> Strukturformel Fluo-3 AM Ester .....	29
<b>Abbildung 9:</b> t-BOOH.....	32
<b>Abbildung 10:</b> Strukturformel von ATP .....	34
<b>Abbildung 11:</b> Original-Histogramm – Messung des intrazellulären Kalziums +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	40
<b>Abbildung 12:</b> Messung des intrazellulären Kalziums in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	40
<b>Abbildung 13:</b> Original-Histogramm – Messung des Vorwärtsstreulichts +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	42
<b>Abbildung 14:</b> Messung des Vorwärtsstreulichts in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	42
<b>Abbildung 15:</b> Original-Histogramm – Annexin V-Bindung in glukosefreier Ringer-Lösung +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	43
<b>Abbildung 16:</b> Messung der Annexin V-Bindung in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	44
<b>Abbildung 17:</b> Original-Histogramm – Messung des intrazellulären Kalziums in Ringer-Lösung unter oxidativem Stress +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011).....	45
<b>Abbildung 18:</b> Messung des intrazellulären Kalziums unter oxidativem Stress in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011).....	45
<b>Abbildung 19:</b> Original-Histogramm – Messung des Vorwärtsstreulichts in Ringer-Lösung unter oxidativem Stress +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011).....	46
<b>Abbildung 20:</b> Messung des Vorwärtsstreulichts unter oxidativem Stress in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	47
<b>Abbildung 21:</b> Original-Histogramm – Messung der Annexin V-Fluoreszenz in Ringer-Lösung unter oxidativem Stress +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011).....	48
<b>Abbildung 22:</b> Messung der Annexin V-Fluoreszenz unter oxidativem Stress in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011) .....	49
<b>Abbildung 23:</b> ATP-Standardkurve 1 .....	50
<b>Abbildung 24:</b> Messung des ATP-Gehalts in Ringer-Lsg./ glukosefreie Ringer-Lösung +0, 50, 100 µM Phlorizin .....	51

<b>Abbildung 25:</b> Standardkurve oxidativer Stress.....	52
<b>Abbildung 26:</b> Messung des ATP-Gehalts mit und ohne oxidativem Stress in Ringer-Lösung +0, 50, 100 $\mu$ M Phlorizin .....	53

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung des CPD-Puffers .....	30
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung der SAG-M-Lösung .....	30
<b>Tabelle 3:</b> Zusammensetzung der modifizierten Ringer-Lösung .....	30
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung der glukosefreien Ringer-Lösung .....	31
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung des Annexin Wash Buffers .....	32
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung PBS .....	32

# 1 Einleitung

Die Wissenschaft hat schon sehr früh begonnen, sich mit dem Thema Blut zu beschäftigen und seine Funktion und Bedeutung für den Körper zu erschließen. So war Hippokrates (460 – 370 v. Chr.) der Meinung, dass es in unserem Körper vier Säfte gebe, die als Lebensträger fungieren und deren Ausgewogenheit für unsere Gesundheit essentiell sei: Die gelbe Galle, die schwarze Galle, den Schleim und das Blut. Bestehe zwischen diesen Säften ein Ungleichgewicht (Dyskrasie) käme es zu Krankheiten. Er teilte den Säften bestimmte Eigenschaften zu; so bezeichnet man auch heute z.B. einen lebhaften, heiteren Menschen noch immer als Sanguiniker (aus dem Lateinischen sanguis; dt.: Blut). Seitdem hat man außer der Tatsache, dass Blut zweifelsohne lebensnotwendig ist, noch sehr viel mehr herausgefunden:

Blut hat im Körper verschiedene Funktionen. Die bekannteste ist die Aufgabe des Sauerstofftransportes. Es transportiert eingeatmeten Sauerstoff aus der Lunge durch den Kreislauf zu Organen und Gewebe und Kohlenstoffdioxid wieder zur Lunge, so dass dieses dort wieder abgeatmet werden kann. Es befördert Nährstoffe und Hormone zur Weiterverstoffwechslung bzw. an den Ort der Wirkung; Stoffwechselendprodukte werden zu Niere oder Leber transportiert. Außerdem spielt Blut bei der Temperaturregulation, als Puffer zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes, sowie bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle.

Seit der Erfindung des Mikroskops (angeblich ca. 1590 durch die beiden Holländer Hans Janssen und Zacharias Janssen (Kahl)) kann das Blut in seinen Bestandteilen betrachtet werden. Als zelluläre Bestandteile des Blutes unterscheidet man Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten.

Die meisten Zellen des Körpers unterliegen einem ständigen Kreislauf der Proliferation, Differenzierung und der Apoptose. Ohne Proliferation und Differenzierung wäre der Körper zum Beispiel nicht in der Lage, Wunden zu verschließen. Dahingegen gewährleistet die Apoptose unter anderem, dass Gewebe verjüngt, entartete Zellen kontrolliert und eliminiert, sowie Keimzellen selektiert werden können. Würde die Apoptose nicht existieren, empfangen entartete Zellen keine Signale zum suizidalen Zelltod und jede von ihnen könnte sich zu einem Tumor

entwickeln. Folglich spielt die Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Krebs (Bergmann and Steller 2010).

Für den Ablauf der Apoptose sind ein Zellkern sowie Mitochondrien notwendig. Da Erythrozyten jedoch weder einen Zellkern noch Mitochondrien besitzen, war man bis vor ungefähr fünfzehn Jahren der Meinung, dass alte Erythrozyten ausschließlich von Milz und Leber „aussortiert“ würden, jedoch nicht in der Lage zu einem mit der Apoptose vergleichbaren suizidalen, programmierten Zelltod seien. Diese Ansicht konnte jedoch in den vergangenen Jahren widerlegt werden (Bratosin, Estaquier et al. 2001). Bratosin et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Erythrozyten trotz eines fehlenden Zellkerns oder anderen für die Apoptose wichtigen Organellen in der Lage sind, eine eigene Art des suizidalen Zelltodes durchzuführen: die Eryptose. (Lang, Lang et al. 2005).

Um so verschiedene Krankheiten wie Anämien behandeln oder ihnen sogar vorbeugen zu können, muss untersucht werden, welche Stoffe in der Lage sind, Eryptose zu inhibieren oder zu verstärken. So ist unter anderem von Quecksilber (Lang, Gulbins et al. 2010), Monensin (Bhavsar, Eberhard et al. 2010), Benzethonium (Lang, Jilani et al. 2011) und Oridonin (Jilani, Qadri et al. 2011) bereits bekannt, dass sie die Eryptose stimulieren. Zu den bisher bekannten Inhibitoren der Eryptose gehören Blebbistatin (Lang, Qadri et al. 2011), Koffein (Lang, Gulbins et al. 2010) und Endothelin (Foller, Mahmud et al. 2010).

Diese Arbeit soll die Einflüsse von Phlorizin auf den Ablauf der Eryptose untersuchen, sowie dessen Angriffspunkte in den Signalwegen diskutieren.



## 2 Grundlagen

### 2.1 Erythrozyten

Als Erythrozyten bezeichnet man die roten Zellen des Blutes. Sie sind zuständig für Sauerstoff- und einen Teil des Kohlenstoffdioxidtransports sowie mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes des Blutes. Ein erwachsener Mensch hat je nach Geschlecht  $4,0 - 6,2 \times 10^6$  Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut. Sie besitzen eine bikonkave Form und haben einen Durchmesser von ca.  $7,5 \mu\text{m}$ . Die Form entsteht durch die Zusammensetzung des Membranskeletts, das aus einem Netz von Spektrin-Filamenten besteht. Diese werden durch Aktin-Filamente zusammengehalten und durch Adapterproteine wie  $\beta$ -Spektrin, Ankyrin, Bande 3-Protein und Glykophorin C an der Plasmamembran verankert. Das Membranskelett ist außerdem verantwortlich für die hohe passive Verformbarkeit der Erythrozyten, die es ihnen ermöglicht, auch kleinste Kapillaren mit einem geringeren Durchmesser als  $7 \mu\text{m}$  sowie die Endothelspalten der Milz zu passieren. Da die Elastizität des Membranskeletts altersbedingt abnimmt, bleiben alte Erythrozyten in den Endothelspalten stecken, um anschließend von Makrophagen entfernt zu werden. Dies geschieht nach ungefähr 120 Tagen Zirkulation im Blut.

Erythrozyten besitzen, anders als alle anderen Zellen des Körpers, ausgereift weder einen Zellkern noch ein endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien. Dies war unter anderem ein Grund für die Annahme, dass Erythrozyten nicht zum suizidalen Zelltod imstande sind. Daher fehlt ihnen die Möglichkeit zur Glukoseverwertung mittels Zitratzyklus und oxidativer Phosphorylierung, so dass sie ihren ATP-Bedarf ausschließlich über anaerobe Glykolyse decken müssen und auf Glukose angewiesen sind.

Die oben bereits erwähnten Bande 3-Proteine sind als Austauscher für intrazelluläres Bikarbonat gegen extrazelluläres Chlorid dafür verantwortlich, dass Erythrozytenmembranen für Anionen um ein vielfaches permeabler sind als für Kationen. Diese Tatsache und die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sorgen dafür, dass sich bei Erythrozyten ein Membranpotenzial von ca.  $-10\text{mV}$  einstellt.



Desweiteren beherbergen Erythrozyten das Coenzym Hämoglobin, das Sauerstoff mit Hilfe des zentralen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ions binden und so im Blut zu Organen und Geweben transportieren kann.

## 2.2 Apoptose

### 2.2.1 Definition des Wortes Apoptose

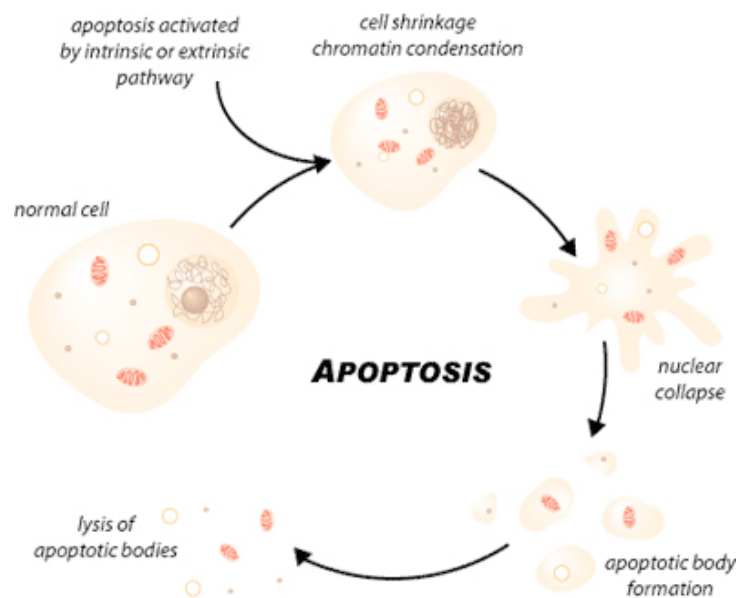
Das Wort Apoptose stammt aus dem Griechischen (απόπτωσης) und ist zusammengesetzt aus “apo” – dt.: weg und “ptosis” – dt.: Fall.

In der Biologie bezeichnet der Begriff den programmierten, suizidalen Zelltod. Dieser wird ausgelöst, wenn die Zelle infiziert, nicht richtig entwickelt oder beschädigt ist oder nicht mehr länger benötigt wird (Green 2003). Es sind aber auch einige andere physiologische sowie pathologische Stimuli der Apoptose bekannt.

### 2.2.2 Morphologie der Apoptose

Es ist für die Apoptose charakteristisch, dass die Zellkontakte der betroffenen Zelle gelöst werden und sie sich aus dem Zellverband herauslöst. Das Zellvolumen wird kontrahiert, anschließend kann eine Schrumpfung des Zellkerns sowie eine Chromatinverdichtung in Zellkernnähe beobachtet werden. Dieser Vorgang wird Karyopyknose genannt. Oftmals wird dies von einem irreparablen Zerfall der DNA in gleichmäßige Untereinheiten begleitet (Cohen 1993). Zellorganellen behalten jedoch ihre übliche Morphologie und chemische Struktur (Kataoka and Tsuruo 1996). Anschließend werden kleine ovale oder sphärische Zytoplasmafragmente ausgestülpt und dann abgeschnürt, sogenannte Apoptoskörperchen, von denen manche pyknotische Kernfragmente enthalten (Kerr, Wyllie et al. 1972). Die Verteilung der Kernfragmente in die Körperchen erfolgt im Abschnürungsvorgang zufällig. Das Ausstülpen nennt man Blebbing (Kataoka and Tsuruo 1996). Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das in erster Linie auf der Innenseite eukaryontischer Zellmembranen gefunden wird, wird bei apoptotischen Prozessen vermehrt auf der Außenseite exponiert und dient als eine Markierung für Phagozyten, denen so das Signal zur Phagozytose der

apoptotischen Zellen gegeben wird (Chaurio, Janko et al. 2009). Die sofortige Aufnahme der markierten Zelle durch Makrophagen induziert zum einen eine Freisetzung von Cytokinen wie zum Beispiel Interleukin-10 und Wachstumsfaktor- $\beta$ , die antiinflammatorisch wirken (Chaurio, Janko et al. 2009). Zum anderen wird hierdurch, sowie durch das Intaktbleiben der betroffenen Zellmembran, gewährleistet, dass keine intrazellulären Bestandteile der Zelle in den Extrazellulärraum gelangen können, was ebenfalls eine Entzündungsreaktion zur Folge hätte. Schließlich werden die Apoptosekörperchen vollständig von Makrophagen phagozytiert und lysosomal abgebaut.



**Abbildung 1:** Morphologie der Apoptose (Yau 2004)

### 2.2.3 Signalwege

Primär existieren zwei Hauptsignalwege der Apoptose: der extrinsische und der intrinsische Signalweg.

#### 2.2.3.1 Der extrinsische Signalweg

Todesrezeptoren und die Bindung derer Liganden lösen den extrinsischen oder auch Todesrezeptor-vermittelt genannten Signalweg aus.

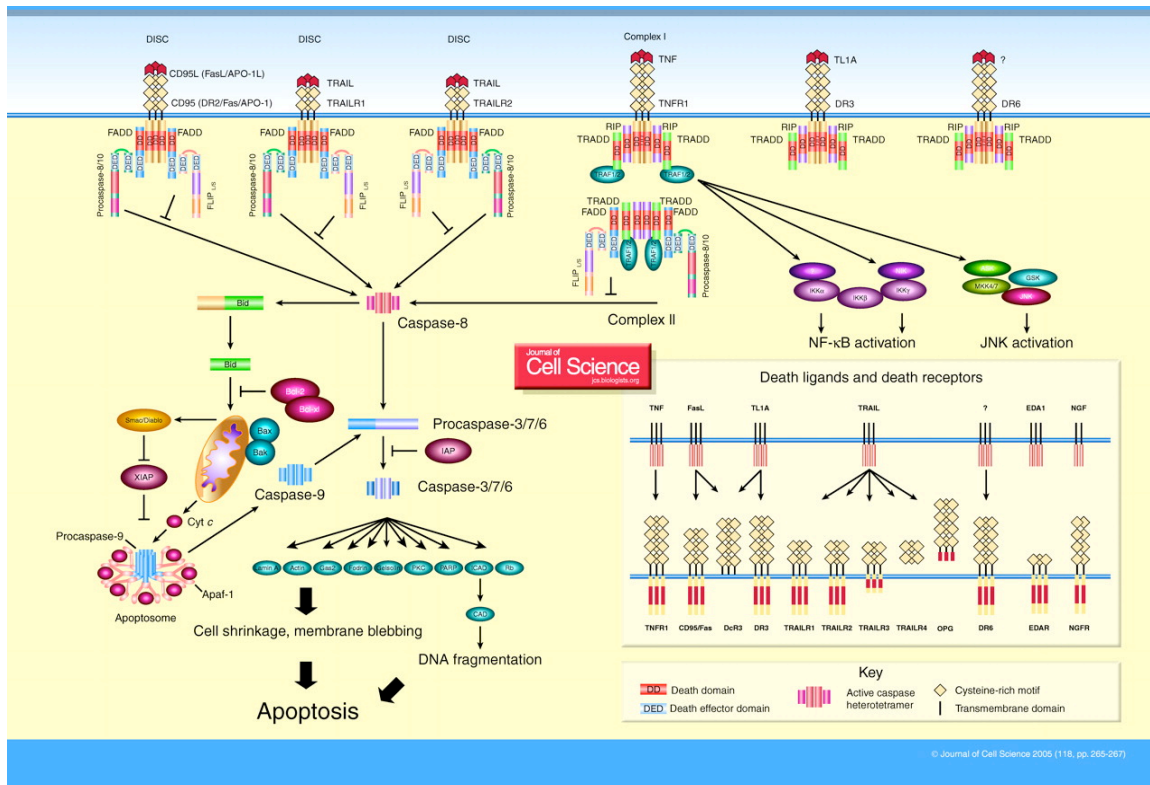
Die zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Rezeptoren, die zur Klasse der Todesrezeptoren gehören, sind CD95 (auch bekannt als DR2, APO-1 und Fas),

TRAILR1 und TRAILR2, TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor 1), DR3, DR6, EDAR (ectodysplasin A receptor) und NGFR (nerve growth factor receptor) (Lavrik, Golks et al. 2005). Diese Rezeptoren werden in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt.

Die erste ist nur in der Lage, Todessignale zu empfangen, die zweite kann zusätzlich Überlebenssignale empfangen und an die Zelle weiterleiten. Die Funktionsweise von CD95, TRAILR1 und TRAILR2, die zu ersten Gruppe gehören, soll am Beispiel des CD95- Rezeptors erläutert werden:

Beim Auftreten eines Apoptose-Stimulus bindet der CD95-Ligand (CD95-L) extrazellulär an den transmembranären CD95-Rezeptor, wodurch ein Todeskomplex entsteht. Anschließend wirkt FADD (Fas-associated death domain), das eine Todesdomäne enthält, intrazellulär als Verbindungsglied zwischen diesem Komplex und Prokaspase-8. Zusammen bilden sie den DISC (death inducing signaling complex). Innerhalb dieses Komplexes wiederum wird die Prokaspase-8 aktiviert. Daraufhin können entweder die dadurch aktivierten Prokaspasen-3/7/6 den Apoptoseprozess auslösen (Liu, Lin et al. 2011) oder, bei geringeren Konzentrationen an aktivierter Prokaspase-8, kann diese das zur Familie der Bcl-2-Proteine gehörende Bid spalten. Dieses führt zur Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, was wiederum Apoptose-Kaspasen auslöst. Zelluläre FLICE-inhibitorische Proteine (FLIP<sub>L</sub> und FLIP<sub>S</sub>) können die Aktivierung von Prokaspase-8 am DISC verhindern (Lavrik, Golks et al. 2005).

Die zweite Gruppe enthält TNFR-1, DR3, DR6 und EDAR. Diese Rezeptoren können nicht nur Todes-, sondern auch Überlebenssignale transduzieren. Der TNFR-1-Signalweg unterscheidet sich von dem oben beschriebenen durch die Bildung zweier Komplexe. Komplex 1 befindet sich an der Membran und beinhaltet unter anderem den Rezeptor sowie die Todesdomäne, jedoch weder FADD noch Prokaspase-8. Er kann sich allerdings ins Zytosol translozieren, wo FADD, Prokaspase-8/10 und FLIP<sub>LS</sub> den Komplex 2, auch Traddosom genannt, bilden. Dort kann die Prokaspase-8 aktiviert werden und daraufhin weitere Apoptosekaskaden auslösen (Micheau and Tschopp 2003). Die Signalwege von DR3, DR6 und EDAR sind noch nicht hinreichend untersucht.



**Abbildung 2:** Signalwege der Todesrezeptoren (Lavrik, Golks et al. 2005)

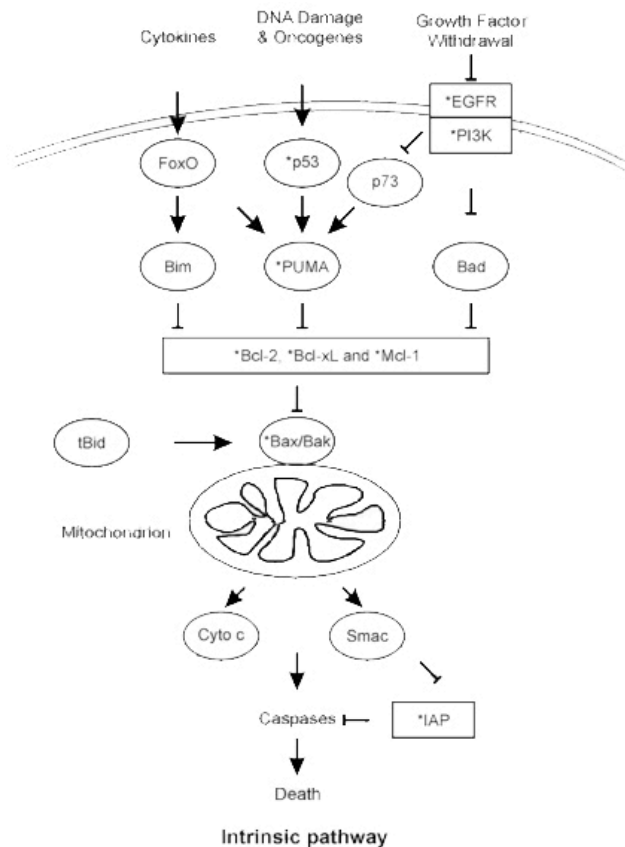
### 2.2.3.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Weg wird oft durch die Einwirkung von zytotoxischen Stoffen, Bestrahlung, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Hitze hervorgerufen (Labi, Erlacher et al. 2006), was die Zelle unter Stress setzen oder beschädigen kann. Wie in Kapitel 2.2.2.1 bereits kurz erwähnt, spielt hier die Interaktion von Stoffen der Bcl-2-Klasse mit den Mitochondrien die zentrale Rolle (Daugas, Cande et al. 2001). Ebenso wie der extrinsische Signalweg endet auch der intrinsische in der Aktivierung der Kaspasen-3 und -7, die im Folgenden die Proteolyse von für die Zelle lebenswichtigen Substanzen auslösen und sie so in den programmierten Zelltod leiten.

Der Intermembranraum der Mitochondrien, im Speziellen die sogenannten Cristae der inneren Membran, ist der zentrale Speicherort für Cytochrom C. In gesunden Zellen binden antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie an die proapoptotischen Bax und Bak und inaktivieren diese dadurch (Labi, Erlacher et al. 2006). Ob die Zelle stirbt oder weiterlebt ist also vom Verhältnis zwischen pro-

und antiapoptotischen Proteinen abhängig. Werden unter Stress sogenannte BH3-only-Proteine, ebenfalls eine Untergruppe der Bcl-2-Familie, aktiviert, binden diese an die antiapoptotischen Effektoren und geben so Bax und Bak frei (Sheridan and Martin 2010). Durch diese Aktivierung bilden Bax und Bak Oligomere und erzeugen Poren (permeability transition pores (PTP)) in der äußeren Mitochondrienmembran. Die PTPs werden auch durch andere endogene Faktoren wie zum Beispiel den zytosolischen Kalziumspiegel, den Redox-Status, Ceramide oder amphiphatische Peptide reguliert (Decaudin, Marzo et al. 1998). Durch die erhöhte Permeabilität der äußeren Membran gelangt Cytochrom c ins Zytosol, wo es ATP-abhängig an monomeres Apaf-1 binden kann, was daraufhin oligomerisiert. Außerdem wird die sogenannte CARD-Region (caspase activation and recruitment domain) demaskiert, was die Bindung von Prokaspase-9 an den Komplex ermöglicht (Hill, Adrain et al. 2004). Diesen Komplex, der dem DISC im extrinsischen Signalweg entspricht, nennt man Apoptosom. Die Prokaspase-9 wird in diesem Komplex zur Kaspase-9 aktiviert, was die Aktivierung von Kaspase-3 und -7 und daraufhin wiederum die Fortsetzung der Kaspasenkaskade durch die Aktivierung von Kaspase-2, -6, -8 und -10 zur Folge hat (Slee, Harte et al. 1999). Letztendlich werden durch diese Kaspasen hunderte von Substanzen gespalten, was die für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen der Zelle ergeben (Fischer, Janicke et al. 2003).

Ebenfalls aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzter AIF (apoptosis inducing factor) sowie Endonuklease G verursachen im Zellkern eine DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation (Miramar, Costantini et al. 2001). Zuletzt soll das Protein Smac/DIABLO erwähnt werden, das ebenso aus den Mitochondrien freigegeben wird und ähnlich wie Cytochrom c im Zytosol weitere Schritte zur Einleitung der Apoptose auslöst.



**Abbildung 3:** Der intrinsische Signalweg (Leibowitz and Yu 2010)

### 2.2.3.3 Der alternative intrinsische Signalweg

Bei diesem Weg spielt das endoplasmatische Retikulum eine zentrale Rolle. Es ist zum Beispiel dafür verantwortlich, Membran- und Transportproteine, Steroide und Lipide zu synthetisieren und Kalzium zu speichern. Kommt es zu Inhomogenitäten bei der Kalzium-Homöostase oder zu einer Anhäufung von falsch gefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum wird dieses in Stress versetzt. Das Auslösen von Apoptose als Folge von Stress auf das endoplasmatische Retikulum bezeichnet man als den alternativen intrinsischen Signalweg.

Bei diesem Signalweg werden, anders als beim oben beschriebenen intrinsischen Weg, weder Cytochrom c noch Apaf-1 benötigt. Kaspase-12, die sich auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet, kann durch verschiedene Trigger aktiviert werden, was wiederum zur Aktivierung von Kaspase-7 und -9 führt. Stoffe, die ER-Stress hervorrufen können,

sind zum Beispiel Thapsigargin, ein Inhibitor der ER-Ca<sup>2+</sup>-ATPase und Brefeldin-A, was das Falten und den Export von Proteinen behindert (Rao, Poksay et al. 2004).

#### 2.2.3.4 Der Granzym B-Signalweg

Zuletzt soll noch der Granzym B-Signalweg genannt werden, der virusinfizierte oder kanzeröse Zellen eliminieren soll. Granzym B führt zur Spaltung von Prokaspase-3 und -7 (Sheridan and Martin 2010). Die aktive Kaspase-3 aktiviert anschließend die Exekutionskaspase-6, die intrazelluläre Proteine spaltet. Granzym B beeinflusst außerdem die Aktivierung von Bid und führt so zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und zum Ausstrom von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum. Anschließend folgen die bereits in den Kapiteln 2.2.3.1 – 2.2.3.2 beschriebenen Apoptosemechanismen, wie die Bildung des Apoptosoms, die Fragmentierung der DNA und das Blebbing der Membran (Rousalova and Krepela 2010).

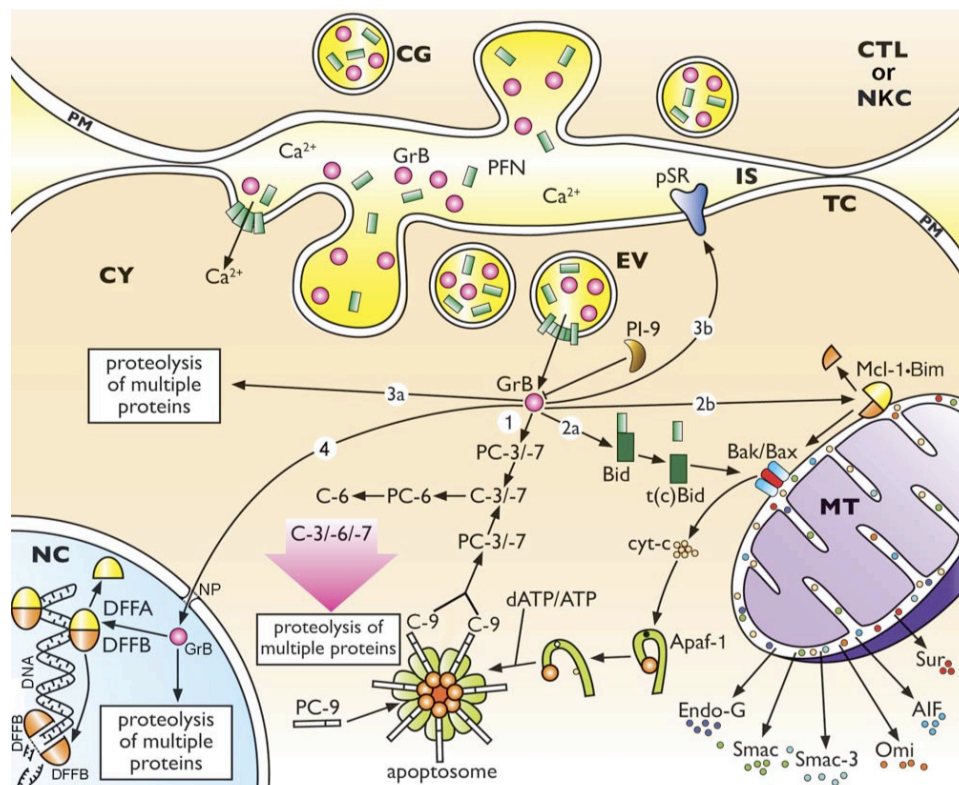


Abbildung 4: Der Granzym B-Signalweg (Rousalova and Krepela 2010)

#### 2.2.4 Regulation der Apoptose

Wie in den Kapiteln 2.2.3.1 – 2.2.3.4 dargestellt wurde, gibt es verschiedene Angriffsstellen für Regulatoren der Apoptose: den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg, sowie die Regulation durch Smac/DIABLO.

##### 2.2.4.1 Angriffsstelle: extrinsischer Signalweg

Da Wirtszellen sich am effektivsten durch Eryptose oder Apoptose gegen die Reproduktion von Viren wehren, verfügen Viren über einen Mechanismus, der Apoptose unterdrückt. So kann zum Beispiel das Virusprotein CrmA (cytokine response modifier A) des Cowpox Virus (CPXV, dt. Kuhpocken-Virus) von Kaspasen gespalten werden, löst sich aber anschließend nicht mehr von der entsprechenden Kaspase, blockiert also deren aktives Zentrum. Wie in der Darstellung des extrinsischen Signalwegs gezeigt werden konnte, ist für die erfolgreiche Durchführung der Apoptose ein ungestörter Reaktionsablauf und Bindungsaufbau nötig (Chang and Yang 2000). Dies wird unter anderem von Interaktionen zwischen Proteinen wie der CARD (caspase recruitment domain), der DD (death domain) und der DED (death effector domain) reguliert, wobei die DD und die DED proapoptotisch agieren. Inhibitor der Apoptose ist zum Beispiel das FLIP (FLICE-inhibitor protein), das im DISC mit der Bindung und Aktivierung der Kaspase-8 interferiert (Yu and Shi 2008).

##### 2.2.4.2 Angriffsstelle: intrinsischer Signalweg

Wie in Kapitel 2.2.3.2 bereits erwähnt, spielen die Bcl-2-Proteine beim intrinsischen Signalweg die zentrale Rolle, die man, je nach Funktion und Struktur, in drei verschiedene Untergruppen einteilen kann: Die antiapoptotische Untergruppe umfasst unter anderem Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w and A1/Bfl1. Die proapoptotische Untergruppe besteht aus den oben bereits genannten Proteinen Bak und Bax. Die dritte Gruppe enthält die BH3-only-Proteine, die Apoptosesignale erkennen und an die anderen Untergruppen weiterleiten können. So enthält Bid Signale des extrinsischen Signalwegs und leitet sie über sein Spaltprodukt, tBid (truncated Bid), an das Mitochondrium weiter. Ein anderes Mitglied der dritten Gruppe, Bad, reagiert auf Entzug von Wachstumsfaktoren, wobei



PUMA und Noxa auf Beschädigung der DNA reagieren (Leibowitz and Yu 2010). Der genaue Mechanismus der Wirkung der Bcl-2-Proteine ist noch nicht hinreichend geklärt; es wird vermutet (Zhang, Xing et al. 2009), dass bei Apoptoseinduktion BH3-only-Proteine antiapoptotische Bcl-2-Proteine kompetitiv binden und so proapoptotische Bcl-2-Proteine freigeben, so dass diese die weitere Apoptosekaskade einleiten können. Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass BH3-only-Proteine Bak und Bax auch direkt aktivieren können. Außerdem kann PUMA ebenfalls an Bax binden, es anschließend zum Mitochondrium translozieren und oligomerisieren (Zhang, Xing et al. 2009).

Regulation kann außerdem im Rahmen der Kaspasenaktivierung erfolgen. Jede Kaspase entsteht aus einer Prokaspase durch Abspaltung eines Peptids. Die Inaktivierung von Kaspasen erfolgt durch Proteolyse oder durch IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) in Form von Ubiquitylierung (Suzuki, Nakabayashi et al. 2001).

Zusätzlich besteht die Möglichkeit der transkriptionellen Regulation durch die Variierung der Expression bestimmter Gene, wie zum Beispiel durch den Transkriptionsfaktor p53. Dieser bewirkt die Induktion proapoptotischer Gene, sowie die Repression antiapoptotischer Gene (Leibowitz and Yu 2010). Ein weiterer Faktor, der zur transkriptionellen Regulation beiträgt, ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, welcher antiapoptotisch wirkt, indem er sowohl die Transkription von Proteinen der antiapoptotischen Untergruppe, als auch von PUMA, sowie DR4 und DR5 initiiert (Ravi, Bedi et al. 2001). Schließlich können FoxO-Proteine die Apoptose direkt oder indirekt begünstigen.

#### 2.2.4.3 IAPs und Smac/DIABLO

Jede Zelle verfügt über IAPs, die eine in der gesunden Zelle spontan ausgelöste Kaspaseaktivierung kontrollieren, jedoch nicht eine korrekt initiierte Apoptose unterdrücken. Dies funktioniert, indem sie die Kaspasen -3, -7 und -9 im aktiven Zentrum blockieren (Salvesen and Duckett 2002).

Wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben, wird bei der Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran auch Smac/DIABLO freigesetzt. Es blockiert bei Ablauf

der Apoptose die IAPs, so dass diese nicht mehr in der Lage sind, die einmal in Gang gekommene Apoptose zu verhindern (Hengartner 2000).

#### 2.2.5 Physiologische und pathologische Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose spielt nicht nur bei der Pathologie eine wichtige Rolle, sondern auch bei der regulären Entwicklung des Menschen. So wird z.B. sowohl im Nervensystem, als auch im Immunsystem zunächst eine übergroße Population an Zellen gebildet, von denen jedoch nur diejenigen überleben, welche über funktionstüchtige Synapsen verfügen, bzw. spezifische Antigen-Wirksamkeit aufweisen. Auch bei der Follikelatresie, der Mammainvolution nach der Entwöhnung des Kindes von der Muttermilch, der Plastizität im Gehirn, sowie der Verjüngung von Geweben ist die Apoptose essentiell, um nur einige Beispiele zu nennen.

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, kann es auch zu Entgleisungen in der Apoptoseregulation kommen. Übermäßige oder unzureichende Apoptose führt zum Beispiel zum Ausbruch von neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs.

So hat man zwar lange angenommen, dass Nekrose die Ursache für Herzversagen sei (Bartling, Holtz et al. 1998). Diese Vermutung wurde jedoch nach und nach widerlegt und eine außerordentliche Apoptose-Aktivität für Herzversagen verantwortlich gemacht. Diese kann zum Beispiel infolge von Hypoxie, oxidativem Stress, Kalziumüberschuss, Reperfusion nach Ischämie oder anderen Faktoren auftreten (Garg, Narula et al. 2005).

Weitere Krankheiten, bei denen exzessive Apoptose zur Entstehung beiträgt, sind AIDS, Alzheimer und Parkinson.

Die vermutlich bekannteste Krankheit, bei der die Disregulation von Apoptose eine Rolle spielt, ist Krebs. Er entsteht entweder durch überschießende Proliferation oder ungenügende Eliminierung von Zellen. Tumorzellen beeinflussen dies zum einen, indem sie antiapoptotische Bcl-2-Proteine überexprimieren oder proapoptotische herunterregulieren (Elmore 2007). Zum anderen sind sie in der Lage, T-Zellen und natürliche Killerzellen daran zu hindern, entartete Zellen zu beseitigen, indem sie in den extrinsischen Signalweg interferieren.

Zu wenig Apoptose ist außerdem das Problem beim Autoimmune Lyphoproliferative Syndrome (ALPS), bei dem T-Zellen, die den eigenen Körper angreifen, unzureichend apoptotisch eliminiert werden.

## 2.3 Eryptose

Bei  $4,0 - 6,2 \times 10^6$  Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut und 4 – 6 l Blut, sowie einer Lebensdauer der Erythrozyten von ca. 100 bis 120 Tagen müssen täglich mehr als 200 Milliarden Erythrozyten beseitigt und ersetzt werden. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, geht man davon aus, dass gealterte Erythrozyten in der Milz von Makrophagen entfernt werden. Nach Splenektomien kann deshalb ein erhöhter Gehalt an älteren Erythrozyten festgestellt werden (Daugas, Cande et al. 2001). Neue Untersuchungen haben zusätzlich ergeben, dass Erythrozyten ebenfalls zu suizidalem Zelltod in der Lage sind. Setzt man Erythrozyten der Kalziumionophore Ionomycin aus, kann man Zellschrumpfung, Blebbing der Membran und erhöhte Phosphatidylserinexposition an der Membranoberfläche beobachten (Berg, Engels et al. 2001). Dies sind alles Mechanismen, die ebenso bei apoptotischen Zellen auftreten. Für diese Art der Apoptose wurde durch Lang et al. 2005 der Begriff der Eryptose eingeführt.

### 2.3.1 Signalwege

Ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel führt zur Spaltung der Cystein-Endopeptidase Calpain, die so autokatalytisch aktiviert werden kann. Calpain ist die Kurzform für Kalzium-abhängige Papain-ähnliche cytosolische Protease. Durch die Aktivierung wird das aktive Zentrum freigelegt, außerdem wandert das Enzym an die Zellmembran. Dort ist es in der Lage, Spektrin und Ankyrin und somit das Zytoskelett der Erythrozyten zu zerstören (Daugas, Cande et al. 2001). Als Folge kommt es zum Blebbing der Membran (Foller, Huber et al. 2008). Des Weiteren wird sowohl die erythrozytäre Scramblase durch den erhöhten Kalziumspiegel aktiviert als auch die Translokase gehemmt, die für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie der Membranlipide verantwortlich ist, was

wiederum zu einer erhöhten Phosphatidylserinpräsentation an der Membranaußenseite führt (Lang, Kaiser et al. 2003).

Ein erhöhter Kalziumspiegel kann verschiedene Ursachen haben: Oxidativer Stress führt zur Aktivierung unselektiver Kationenkanäle, die den Einstrom von Kalzium ermöglichen. Hyperosmotischer Schock sowie Chloridentzug bewirken eine Ausschüttung von PGE<sub>2</sub>, das ebenfalls für die Öffnung der unselektiven Kationenkanäle verantwortlich ist (Foller, Huber et al. 2008), sowie eine erhöhte Phosphatidylserinpräsentation veranlasst (Lang, Lang et al. 2005). Amilorid und EIPA sind in der Lage, die unselektiven Kationenkanäle zu blockieren.

### 2.3.2 Zelluläre K<sup>+</sup> Verluste

In der Erythrozytenmembran gibt es kalziumsensitive Kalium-Kanäle, die „Gardos“-Kanäle. Werden diese durch erhöhtes intrazelluläres Kalzium aktiviert, kommt es zur Hypopolarisation der Zellmembran. Um den Kaliumverlust elektrisch auszugleichen, strömt gleichzeitig Chlorid in den Extrazellulärraum, was durch die hohe Permeabilität der Erythrozytenmembran für Chlorid möglich wird, gleichzeitig aber durch den Verlust osmotisch aktiver Teilchen zur Zellschrumpfung führt. Auch kommt es so zur Ausstülpung der Zellmembran und darauf folgender Phosphatidylserinpräsentation an der Zelloberfläche (Lang, Lang et al. 2005).

Blockiert man die Gardos-Kanäle pharmakologisch zum Beispiel mit Clotrimazol oder erhöht das extrazelluläre Kalium und wirkt so dem chemischen Gradienten entgegen, kann man den Kaliumverlust und die daraus resultierenden Folgen verhindern.

### 2.3.3 Kontrolle der Sphingomyelinase

Schrumpft ein Erythrozyt, führt dies durch die Phospholipase A<sub>2</sub> zu regulierter Freisetzung von PAF (platelet activating factor) und zu positiver Rückkopplung im Sinne der Schrumpfung, da PAF weitere Schrumpfung auslöst. Des Weiteren ist ein Erythrozyt in der Lage die Sphingomyelinase zu aktivieren. Diese spaltet Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. C6-Ceramide poten-

zieren die Wirkung von erhöhtem intrazellulärem Kalzium (Lang, Kempe et al. 2005), was eine noch größere Phosphatidylserinpräsentation an der Membranoberfläche zur Folge hat.

#### 2.3.4 Die Rolle der Kaspase-3 und -8

Mandal et al. haben 2005 herausgefunden, dass Erythrozyten trotz Mangel an den für die Apoptose der kernhaltigen Zellen erforderlichen Organellen über eine Art Kaspase-System verfügen. So wurde festgestellt, dass gealterte Erythrozyten einen höheren Gehalt an aktiver Kaspase-3 aufweisen (Mandal, Mazumder et al. 2005). Kaspase-3 ist in der Lage, die Aktivität der Aminophospholipidtranslokase APLT, die für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung der Sphingophospholipide in der Zellmembran verantwortlich ist, zu hemmen. Auch unter oxidativem Stress wird die Kaspase-3 aktiviert.

Kaspase-8, die eine Initiator-kaspase darstellt, ist ebenfalls in Erythrozyten vorhanden. Genau wie Kaspase-3 konnte auch Kaspase-8 in gealterten Erythrozyten in ihrer aktiven Form verstärkt nachgewiesen werden. Ebenso wird der Todesrezeptor Fas in der gesamten Reifung der Erythrozyten exprimiert und bietet so eine Angriffsstelle für FasL. Unter Mangel an Erythropoetin bindet FasL an Fas und initiiert so den programmierten Zelltod.

Studien haben gezeigt, dass der spezifisch auf Kaspase-3 und -8 reagierende Inhibitor N-Acetylcystein (NAC) unter oxidativem Stress die Hemmung von APLT verhindern kann, was erneut darauf hinweist, dass APLT Kaspase-gesteuert ist (Mandal, Mazumder et al. 2005).

#### 2.3.5 Einfluss durch Erythropoietin

Erythropoietin (EPO) ist ein Hormon, das für die Proliferation und Differenzierung von Erythrozyten von großer Bedeutung ist. So fördert es zum Beispiel mehrere Schritte in deren Reifung, indem es die Apoptose der Vorläuferzellen hemmt, bis ein „fertiger“ Erythrozyt entstanden ist. Herrscht im Gewebe Sauerstoffmangel, wird von der Niere vermehrt EPO ausgeschieden. Auch verminderte Nierendurchblutung hat diesen Effekt (Jelkmann 1992).

Myssina et al. haben 2003 herausgefunden, dass EPO nicht nur die Proliferation der Erythrozyten fördert, sondern auch deren suizidalen Zelltod hemmt. Es wurde eine kleine Zahl (135 – 250 pro Zelle (Broudy, Lin et al. 1991)) von EPO-Rezeptoren auf der Membranoberfläche der Erythrozyten nachgewiesen, die offensichtlich ausreicht, um den Einfluss von EPO auf die Eryptose zu gewährleisten. EPO ist in der Lage, den oben genannten Kationenkanal zu hemmen und folglich die Aktivierung der erythrozytären Scramblase durch osmotischen Schock zu verhindern. Dies bedeutet, dass ein osmotischer Schock nicht nur einen folgenden Signalweg aktiviert, sondern sogar zwei. Dabei lässt sich nur der Signalweg, der einen Kalziumeinstrom durch den Kationenkanal bewirkt, von EPO beeinflussen (Myssina, Huber et al. 2003). Zusätzlich ist Erythropoietin in der Lage, den oben geschilderten Signalweg, der durch Chloridentzug getriggert wird, vollständig zu inhibieren. Daraus folgt, dass die Aktivierung des Kationenkanals durch Chloridentzug vollständig durch EPO gehemmt werden kann (Myssina, Huber et al. 2003).

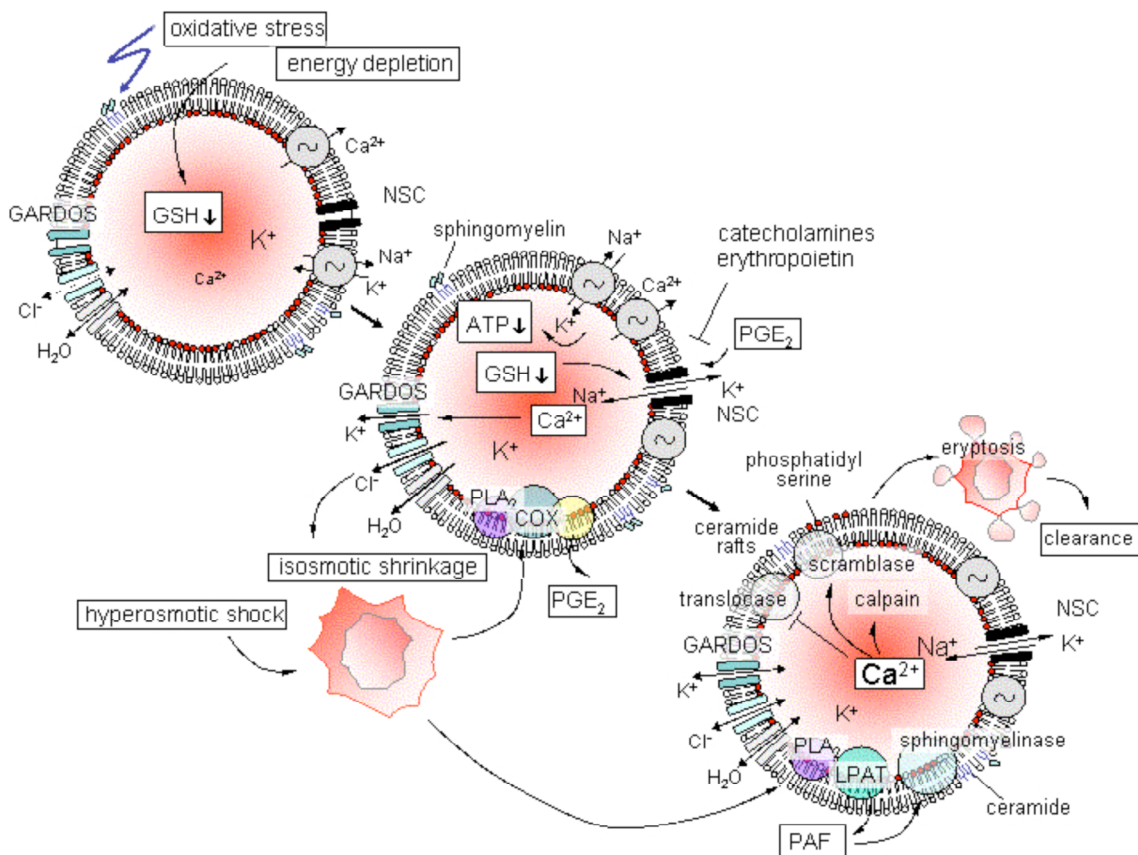


Abbildung 5: Signalwege der Eryptose (Lang)

### 2.3.6 Andere bisher bekannte Inhibitoren der Eryptose

Neben Erythropoietin sind die Katecholamine Dopamin, Epinephrin und Isoproterenol in der Lage, die kalziumpermeablen Kationenkanäle zu hemmen und so Eryptose zu unterbinden. Wie bereits in Kapitel 2.3.1 erwähnt, haben auch Amilorid und EIPA (Ethylisopropylamilorid) diese Wirkung (Lang et al, 2005). Stickoxid (NO) hat Auswirkungen auf die Eryptose. So schütten desoxygenierte Erythrozyten NO aus, was Vasodilatation zur Folge hat und so der Eryptose entgegenwirkt. Funktioniert dieser Mechanismus nicht, kann es zum Beispiel zu Bluthochdruck im Lungenkreislauf kommen (McMahon, Moon et al. 2002).

Andere Beispiele sind die in Kapitel bereits genannten Blebbistatin (Lang, Qadri et al. 2011), Koffein (Lang, Gulbins et al. 2010) und Endothelin (Foller, Mahmud et al. 2010).

### 2.3.7 Bisher bekannte Trigger der Eryptose

Neben osmotischem Schock, oxidativem Stress, Glukoseentzug und den in Kapitel 1 erwähnten Stimulatoren sind noch weitere Trigger der Eryptose bekannt: Prostaglandin E<sub>2</sub> (Lang, Kempe et al. 2005), Ceramide (Lang, Myssina et al. 2004), Gold (Sopjani, Foller et al. 2008), Aluminium (Niemoeller, Kiedaisch et al. 2006), Retinsäure (Niemoeller, Foller et al. 2008) oder Kupfer (Lang, Schenck et al. 2007), um ein paar Beispiele zu nennen.

### 2.3.8 Klinische Bedeutung

Wie die Apoptose spielt auch die Eryptose eine wichtige Rolle bei einigen Krankheiten. Die Erythrozyten von Menschen mit zum Beispiel Sichelzellanämie, Thalassämie oder Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel reagieren überempfindlich auf oxidativen Stress, Glukoseentzug oder osmotischen Schock. Dies bedeutet, dass die Lebensdauer solcher Erythrozyten deutlich verkürzt wird und durch die Stresssituation Eryptose ausgelöst wird.

Des Weiteren gibt es parasitäre Krankheitserreger, die sich in Erythrozyten einnisten können, wie zum Beispiel Plasmodium falciparum. Dabei erweist sich als problematisch, dass der normale Membrantransport an Nährstoffen für den

problematisch, dass der normale Membrantransport an Nährstoffen für den Keim nicht ausreichend ist. Deshalb versucht dieser neue Wege durch die Membran aufzubauen, um die Nährstoffaufnahme und damit sein Überleben zu sichern. Außerdem werden durch den Keim Systeme zur Entsorgung von Abfallprodukten gebildet (Kirk 2001).

Die Mengen an Natrium und Kalzium, die der Keim benötigt, werden über eine Aktivierung des Kationenkanals erreicht. Wie oben beschrieben, löst dies Eryptose aus, folglich auch die Phosphatidylserinpräsentation an der Außenseite der Membran, was den infizierten Erythrozyt wiederum für Makrophagen kenntlich macht.

Lang et al. vermuten, dass eine weitere wichtige Funktion der Eryptose sein könnte, Hämolyse zu verhindern. Kommt es zu intrazellulärer Anhäufung von Natrium und Chlorid, wird osmotisch Wasser in die Zelle „gezogen“. Dies hat eine Zellschwellung und letztendlich das Platzen der Zelle zur Folge. Das würde bedeuten, dass Zellbestandteile wie Hämoglobin intravasal freigesetzt werden. Die Mechanismen der Eryptose könnten das in gewissem Maße verhindern, indem die Zelle nicht platzt, sondern Zellbestandteile mit Membranhülle komplett von Makrophagen phagozytiert werden. Erhöhtes intrazelluläres Kalzium könnte ein Indikator dafür sein, dass der osmotische Gradient der Zelle nicht länger aufrecht erhalten werden konnte (Lang, Lang et al. 2005). Dies hätte wiederum die Stimulation der Scramblase, eine Phosphatidylserinpräsentation, sowie eine Verzögerung der Zellschwellung durch die Aktivierung des Gardos-Kanals und Kaliumausstrom zur Folge. So könnte verhindert werden, dass Erythrozyten zu schnell platzen und demnach bereits von Makrophagen beseitigt werden können, bevor es zur Hämolyse kommt (Lang, Lang et al. 2005).

## **2.4 Phlorizin**

### **2.4.1 Phlorizin – Geschichtliches und Vorkommen**

1835 wurde Phlorizin erstmals in Frankreich aus der Rinde des Apfelbaumes isoliert. Man stellte fest, dass es ähnlich bitter schmeckt wie die aus Weidenbäumen extrahierte Salicylsäure oder das aus Chinabäumen gewonnene Chi-



nin, das man früher bei der Behandlung von Malaria einsetzte. Deshalb vermutete man, Phlorizin könnte bei der Behandlung von Fieber und Malaria ähnliche Wirkungen besitzen. Von Mering entdeckte 1886, dass Phlorizin in höheren Dosen als 1 g Glukosurie und Polyurie verursacht (von Mering 1886). Später nutzte man die intravenöse Applikation von Phlorizin und die darauf folgende Glukos- und Polyurie zunächst als Anzeichen von gesunden, funktionstüchtigen Nieren. In den 1930er Jahren wurde Phlorizin auch als Messmethode für die glomeruläre Filtrationsrate und die Nierendurchblutung eingesetzt; in den 1970ern versuchte LaVeen, mit Hilfe von Phlorizin Tumorzellen Glukose zu entziehen.

Als man in den 1950er Jahren begann, die Wirkungen von Phlorizin auf molekularer Ebene zu erforschen, fand man heraus, dass Konzentrationen zwischen 0,1 bis 1 mM mitochondriale Schwellungen nach sich zogen (Keller and Lotspeich 1959), sowie die Glukoseaufnahme von Erythrozyten und der Glukosetransport in Niere und Dünndarm bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,001 mM inhibiert wurde (Alvarado and Crane 1962).

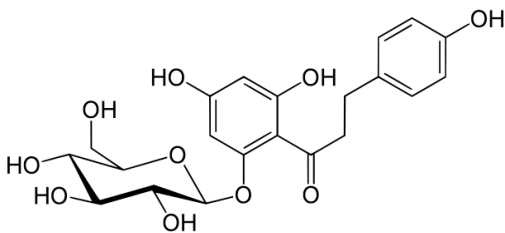
Bei dem Flavonoid Phlorizin handelt es sich um ein natürliches Produkt, das nicht nur in der Rinde von Apfelbäumen, sondern auch in deren Früchten, Ausrieben und Blättern vorkommt (Escarpa and Gonzalez 1998). Im Fruchtfleisch von Äpfeln befinden sich 4 bis 20 mg/kg Phlorizin, in der Rinde sogar 12 bis 418 mg/kg. Die Menge ist jeweils abhängig von der Sorte, wobei Reineta-Green-Äpfel die größte und Golden Delicious die geringste Menge aufweisen (Ehrenkranz, Lewis et al. 2005). Die Ergebnisse einiger Versuche lassen vermuten, dass Phlorizin in Bäumen eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung spielt, und dass das Aglukon – Phloretin – eine fungizide Wirkung besitzt (Ehrenkranz, Lewis et al. 2005). Das dimerisierte Oxidationsprodukt von Phlorizin spielt eine Rolle bei der Farbbildung von Apfelsaft und Cider. Cider enthält zwischen 3 und 16 mg/100 ml Phlorizin, ebenfalls abhängig von der Apfelsorte, aus der der Cider hergestellt wurde (Ridgway and Tucker 1997).

Auch andere Pflanzen beinhalten Flavonoide, zu deren Untergruppen die Chalkone gehören. Menschen nehmen die meisten Flavonoide über die Nahrung durch den Verzehr von Äpfeln, Tee, Rotwein und Zwiebeln auf (Hertog, Feskens et al. 1993). Sie wirken als Antioxidantien, beseitigen

Feskens et al. 1993). Sie wirken als Antioxidantien, beseitigen superoxide Anionen oder Fettperoxyradikale, binden Metallionen (Robak and Gryglewski 1988) und können Krankheiten der Koronararterien vorbeugen, verringern also das Herzinfarkttrisiko (Hertog, Kromhout et al. 1995).

#### 2.4.2 Struktur von Phlorizin

Phlorizin (andere Namen sind: Phloridzin; Phlorrhizin; Glucose, 1-[2-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-4,6-dihydroxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanon und 2'-( $\beta$ -D-Glucopyranosyloxy)-4', 6'-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-Propiophenon) gehört zur Gruppe der Chalkone und besteht aus einem Glukose-Rest und zwei aromatischen Ringen, die durch ein Alkylzwischenstück zusammengehalten werden.



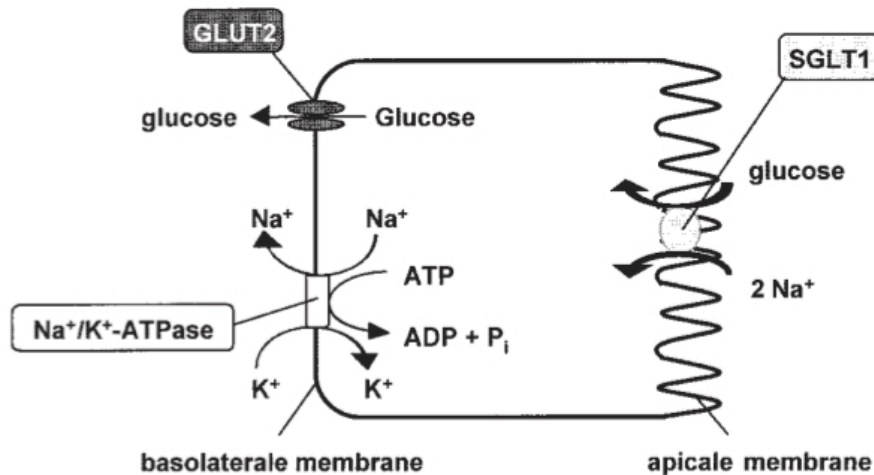
**Abbildung 6:** Strukturformel von Phlorizin

#### 2.4.3 Beeinflussung des zellulären Glukosetransportes durch Phlorizin

Da Glukose ein polarer Stoff ist und somit nicht durch die lipophile Zellmembran diffundieren kann, werden Transportsysteme benötigt um die Aufnahme oder Abgabe von Glukose durch die Zelle zu gewährleisten. Hierbei unterscheidet man zwei Arten von Glukose-Transportern: die GLUTs (Glucose transporters) und die SGLTs (sodium glucose linked transporters). GLUTs nutzen den Konzentrationsgradienten von Glukose um diese mit dem Gradienten über die Zellmembran zu transportieren. Es sind bisher 12 verschiedene GLUTs bekannt, wobei diese an verschiedenen Stellen im menschlichen Körper lokalisiert sind.

SGLTs sind sekundär aktive Glukosetransporter. Von einer ATP-abhängigen Pumpe, der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, wird Natrium entgegen seinem Gradienten basolateral aus der Zelle befördert. So kann auf der apikalen Seite der Natriumgra-

dient aufrecht erhalten werden. Diesen Gradienten können die SGLTs nutzen, indem sie Natrium mit ihrem Gradienten und gleichzeitig Glukose gegen ihren Gradienten in die Zelle transportieren.



**Abbildung 7:** Glucosetransport im Dünndarmepithel (Scheepers, Joost et al. 2004)

Bisher wurden sechs verschiedene Arten von SGLTs nachgewiesen: SGLT-1 bis -6. Im Folgenden sollen SGLT-1 und SGLT-2 genauer betrachtet werden.

Der SGLT-1 ist ein hochaffiner Glucosetransporter mit einer geringen Kapazität, da er zwei Natrium-Ionen für den Transport eines Glukose-Moleküls benötigt. Er ist vor allem im Darm, im Herzen und in der Niere lokalisiert und ist auch in der Lage Galaktose zu transportieren, weist dazu allerdings eine wesentlich geringere Affinität im Vergleich zu Glukose auf.

Im Gegensatz dazu hat der SGLT-2 Transporter zwar eine geringe Affinität zu Glukose, jedoch eine hohe Kapazität, da er Natrium und Glukose im Verhältnis 1:1 transportiert. Er ist für die Regulation der Glukoseresorption im gewundenen proximalen Tubulus der Niere zuständig.

Phlorizin hemmt sowohl SGLT-1 als auch SGLT-2 kompetitiv bei Konzentrationen zwischen 5 und 10  $\mu\text{M}$  (Panayotova-Heiermann, Loo et al. 1995), ohne dabei Einfluss auf den Natrium-Gradienten zu nehmen. Phloretin, das Aglukon von Phlorizin, ist hingegen in der Lage, den Zuckertransport durch GLUT 2 zu

hemmen (Kellett and Helliwell 2000). GLUT 2 transportiert auf der basolateralen Seite der Enterozyten Glukose, Galaktose und Fruktose in den Blutkreislauf.

#### 2.4.4 Pharmakologisches Potenzial

##### 2.4.4.1 Diabetes

Diabetes Typ 2 entsteht durch eine dauerhafte Hyperglykämie, die eine Desensitivierung der Insulinrezeptoren zur Folge hat. 1987 haben Kahn et al. herausgefunden, dass dies durch Phlorizin wieder rückgängig gemacht werden kann. Es konnte damals jedoch keine Veränderung in der Expression von Glukosetransportern in der Membran von Adipozyten festgestellt werden. Des Weiteren zeigen Mäuse nach der oralen Gabe einer Glukoselösung unter dem Einfluss von Phlorizin einen geringeren Anstieg des Blutzuckerspiegels als ohne (Takii, Matsumoto et al. 1997). Dauerhafte Behandlung mit einem Phlorizin-Derivat (T-1095, entwickelt in Japan) führt zur Normalisierung der GLUT-4-Exprimierung in Muskeln und Körper nach einer Diabetes-verursachten Überexprimierung, senkt den Blutzuckerspiegel, sowie Insulin- und Triacylglyceridwerte und die hepatozytäre Glukoseproduktion (Oku, Ueta et al. 1999).

Phlorizin ist jedoch zur Behandlung von Diabetes eher ungeeignet, da es eine geringe orale Bioverfügbarkeit aufweist. Des Weiteren hemmt es nicht nur den SGLT-2 Transporter, sondern ebenfalls den SGLT-1 Transporter, was zu osmotischer Diarrhoe führen kann. Momentan werden neue Medikamente, Phlorizi- Analoga wie zum Beispiel Dapagliflozin oder Canagliflozin, klinisch getestet, die eine höhere Resorbierbarkeit im Darm aufweisen und selektiv SGLT-2 hemmen. (Perez Lopez, Gonzalez Albarran et al. 2010).

##### 2.4.4.2 Wirkungen auf den Glukosetransport in Gehirn und Gedächtnis

Der Glukosetransport in das Gehirn wird durch Phlorizin ebenfalls gehemmt, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist, da sich in der Blut-Hirn-Schranke keine SGLTs befinden (Betz, Drewes et al. 1975). Unter der Annahme, dass Glukose eine Voraussetzung für Gedächtnisbildung darstellt, wurden Versuche durchgeführt um herauszufinden, welchen Einfluss Phlorizin auf die

Gedächtnisbildung bei Mäusen hat. Paradoxerweise hat Phlorizin die Leistung beim Erlernen eines sogenannten „passive avoidance tests“ sogar erhöht. Dieser Effekt ist jedoch unabhängig von der Glukoseaufnahme ins Gehirn (Nishizaki, Kammesheidt et al. 1995). Zusätzlich erhöht Phlorizin die Nahrungsaufnahme von Ratten, wenn es in den vierten Ventrikel injiziert wird (Boccia, Kopf et al. 1999) und senkt die Aktivität des ventromedialen Hypothalamus unter Einfluss von Glukose.

#### 2.4.5 Die Rolle von Phloretin

Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase ist zumindest teilweise für die Umwandlung von Phlorizin zu Phloretin verantwortlich. Diese ist hauptsächlich in der Mikrovilli-Membran des Dünndarmepithels lokalisiert. Phloretin ist, wie in Kapitel 2.4.3 bereits erwähnt, in der Lage GLUTs zu blockieren. Außerdem hemmt es den Membrantransport von Chlorid, Bicarbonat- und Lithiumionen in den Erythrozyten von Säugetieren (Lefevre 1961). Es wurde beobachtet, dass Phloretin die zelluläre und nukleäre T3-Aufnahme inhibiert, indem es an die entsprechenden Rezeptoren bindet. Movius et al. vermuten, dass dies an der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Moleküle liegt (Movius, Phyllaier et al. 1989).

### 3 Ziel der Studie

Es ist bereits bekannt, dass Phlorizin mit dem Glukose-Transport interferiert (vgl. Kapitel 2.4.3). Das Ziel der Studie war herauszufinden, ob und wenn ja welchen Einfluss Phlorizin auf das Überleben sowie den programmierten Zelltod von Erythrozyten hat.

Dazu wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellgröße, das intrazelluläre Kalzium und die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten mit und ohne Einfluss von Phlorizin gemessen wurden. Unter verschiedenen Konzentrationen (vgl. Kapitel 4.2.1, Kapitel 5) wurde verglichen, wie sich die Erythrozyten in Ringer-Lösung, sprich unter Zugriff auf Glukose, und in glukosefreier Ringer-Lösung verhalten.

Da auch oxidativer Stress das Überleben von Erythrozyten beeinflusst (vgl. Kapitel 2.3.1), wurden zusätzlich Versuche durchgeführt, bei denen die Erythrozyten mit Hilfe von Tert-Butylhydroperoxid (t-BOOH) (Kapitel 4.3.7) unter oxidativen Stress gesetzt wurden. Anschließend wurden erneut die oben genannten Parameter mit und ohne Einfluss von Phlorizin gemessen.

Da Phlorizin einen Einfluss auf den zellulären Glukosetransport hat und die Glukoseversorgung eine große Rolle beim Überleben von Erythrozyten spielt, war zu erwarten, dass Phlorizin ebenso das Auftreten von Eryptose beeinflusst. Ähnliche Versuche wurden bereits mit verschiedenen Stoffen, unter anderem Oridonin, Eniatin A, Sphingosin und Monensin, durchgeführt und so deren Einfluss auf die Eryptose untersucht.

## **4 Materialien**

### **4.1 Erythrozyten**

Die Ethikkommission der Universität Tübingen überprüfte und genehmigte alle in der Studie durchgeführten Versuche (184/2003 V). Die Blutbank der Universitätsklinik stellte freundlicherweise die Erythrozytenkonzentrate gesunder, freiwilliger Patienten zur Verfügung. Von allen Patienten liegt eine unterschriebene Einverständniserklärung vor.

Die Aufbereitung der Erythrozyten erfolgte durch Mischen von 500 ml Vollblut mit 70 ml CPD-Puffer. Anschließend wurde bei Raumtemperatur (22 °C) und 4795g für 10 Minuten zentrifugiert. Die sich so trennenden Blutkomponenten (Erythrozyten, Plasma und Buffy Coat) wurden in unterschiedliche Beutel abgefüllt. Während des Abfüllvorgangs wurden die Erythrozyten durch Zugabe von SAG-M stabilisiert und durch einen Leukozyten-Depletionsfilter von übriggebliebenen Leukozyten befreit.

Für die Herstellung der Erythrozytenkonzentrate wurde das OptiPure RC quadruple blood back set sowie ein Filter der Firma Baxter (Unterschleißheim) verwendet.

Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Erythrozytenkonzentrate bei +4 °C gelagert.

### **4.2 Verwendete Substanzen**

#### **4.2.1 Phlorizin**

Für die Versuche wurde das Produkt Phloridizin Dihydrate der Firma Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg) verwendet und für die weitere Verwendung in Ethanol gelöst. Hierbei wurde durch die Zugabe von 0,0236 g zu 1 ml Ethanol eine Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mM hergestellt. Anschließend wurde eine zweite und dritte Stammlösung mit den Konzentrationen 10 mM und 1 mM angefertigt.

#### 4.2.2 Annexin V FITC

Bereits zu Beginn der Apoptose wird Phosphatidylserin, das sich sonst fast nur auf dem inneren Teil der Membran befindet, vermehrt auf der äußeren Seite exponiert. Dies dient Makrophagen als Signal, dass sich die Zelle in einem apoptotischem Zustand befindet, woraufhin die Phagozytose eingeleitet werden kann.

In diesem apoptotischen Zustand wird als Markierung das Protein Annexin V verwendet, das bevorzugt an anionische Phospholipide und Phosphatidylserin-gruppen bindet. Es besitzt eine besonders hohe Affinität zu Phosphatidylserin. Um eine Detektion im Durchflusszytometer möglich zu machen ist Annexin V mit dem Färbemittel Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert.

Das bei den Versuchen verwendete Annexin V FITC stammt von der Firma Firma Roche Applied Science (Mannheim). Bei den Versuchen wurde eine 1:500 Lösung verwendet.

#### 4.2.3 Fluo-3 AM Ester

Im Zuge der Eryptose kommt es zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel. Dieser kann mit Hilfe von Fluo-3 AM nachgewiesen werden.

Fluo-3 AM (Acetoxymethyl-) Ester ( $C_{51}H_{50}Cl_2N_2O_{23}$ ) ist ein membranpermeabler Stoff und kann problemlos in die meisten Zellen eindringen. Fluo-3 AM Ester besitzt die Eigenschaft an Kalzium binden zu können und anschließend im Vergleich zum Ausgangszustand mit der vierzigfachen Intensität zu fluoreszieren. Es dient daher als Färbemittel für intrazelluläres Kalzium.

Es reagiert selbst nicht mit Kalzium, kann jedoch in den Zellen durch unspezifische Esterasen zu freiem Fluo-3 hydrolysiert werden und dann mit Kalzium konjugieren. Gespalten ist es nicht mehr permeabel für die Membran. So wird sichergestellt, dass nur intrazelluläres Kalzium zum Messergebnis beiträgt. Da der Stoff ein Exzitationsmaximum von 506 nm Wellenlänge besitzt, ist er mit einem 488 nm-Argon-Ionen-Laser anregbar. Die Emmision von 526 nm ist im FL1-Kanal des FACSCalibur messbar. Wie oben bereits erwähnt fluoresziert Fluo-3 selbst kaum, der Effekt verstärkt sich jedoch nach Bindung an Kalzium und fluoresziert dann bei 526 nm, wobei die Kalziumkonzentration und die Fluo-



reszenz folgendermaßen voneinander abhängen:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$$

mit

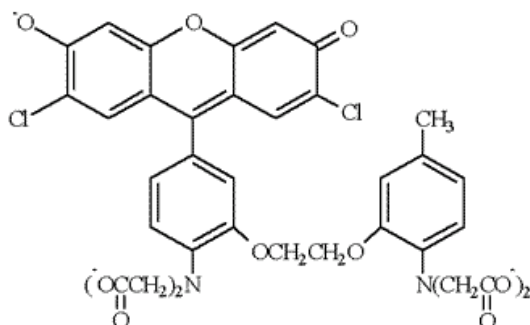
F = Fluoreszenz des Indikators bei der experimentellen Kalziumkonzentration,

F<sub>min</sub> = Fluoreszenz bei Abwesenheit von Kalzium und

F<sub>max</sub> = Fluoreszenz bei Kalziumsättigung.

Der Wert für K<sub>d</sub> wird in zellfreiem Medium mit 450 nm angegeben, abhängig von einer Vielzahl von Faktoren wie zum Beispiel dem pH Wert oder den Proteinkonzentrationen.

Der bei den Versuchen verwendete Farbstoff wird von der Firma Calbiochem (Bad Soden) hergestellt. Fluo-3 wird in Form von Pulver geliefert, bei Raumtemperatur mit Hilfe von DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.



**Abbildung 8:** Strukturformel Fluo-3 AM Ester

## 4.3 Verwendete Lösungen

### 4.3.1 CPD-Puffer

Zur Herstellung von Erythrozytenkonzentraten (vgl. Kapitel 4.1).

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des CPD-Puffers

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mg/ml]</i>
Dextrosemonohydrat	25,5
Natriumcitrat	26,3
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	2,5
Zitronensäure	3,27

#### 4.3.2 SAG-M-Lösung

Zur Stabilisierung der Erythrozyten wurde SAG-M-Lösung verwendet (vgl. Kapitel 4.1).

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der SAG-M-Lösung

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

#### 4.3.3 Ringer-Lösung

Die Ringer-Lösung weist die gleiche Elektrolytkonzentration, Osmolarität sowie den gleichen pH-Wert wie das menschliche Blutplasma auf und wurde daher als Basislösung für die Experimente genutzt. Den pH-Wert von 7,4 wird durch Titration mit 1M Natronlauge erreicht, die Osmolarität von 290 mosmol wurde mit Hilfe eines Dampfdruck-Osmometers überprüft.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der modifizierten Ringer-Lösung

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mM]</i>	<i>Menge für ca 1l [g]</i>
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO <sub>4</sub>	1	0,296

HEPES	32	7,674
Glucose	5	0,901
CaCl <sub>2</sub>	1	0,111
NaOH	13	0,541
H <sub>2</sub> O		982,798

#### 4.3.4 Glukosefreie Ringer-Lösung

Erythrozyten benötigen für die Bereitstellung von Energie, sprich für die ATP-Produktion, Glukose, da sie wegen des Mangels an Mitochondrien auf die anaerobe Glykolyse angewiesen sind. Entzieht man ihnen diesen Energielieferanten, tritt die Eryptose deutlich schneller ein. Für die Versuche wurde eine glukosefreie Ringer-Lösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der glukosefreien Ringer-Lösung

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mM]</i>	<i>Menge für ca 1l [g]</i>
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO <sub>4</sub>	1	0,296
HEPES	32	7,674
CaCl <sub>2</sub>	1	0,111
NaOH	13	0,541
H <sub>2</sub> O		982,798

Auch die glukosefreie Ringer-Lösung wurde nach der Herstellung auf pH-Wert und Osmolarität überprüft und ggf. korrigiert.

#### 4.3.5 Annexin Wash Buffer

Der Annexin Wash Buffer wurde verwendet, um die in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.3 beschriebenen Färbungen im Verhältnis 1:200 verdünnen.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des Annexin Wash Buffers

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mg/ml]</i>	<i>Menge für ca 1l [g]</i>
NaCl	140	7,305
HEPES	10	2,383
CaCl <sub>2</sub>	5	0,555
NaOH	4	0,168
H <sub>2</sub> O		990

#### 4.3.6 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Das in den Versuchen verwendete PBS wurde wie in Tabelle 6 dargestellt zusammengesetzt und auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

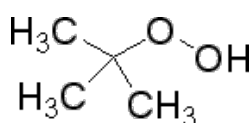
**Tabelle 6:** Zusammensetzung PBS

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mM]</i>	<i>Menge für 1l [g]</i>
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	8,1	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76	0,24

PBS ist isotonisch und nicht zytotoxisch und kann daher bei den Versuchen für das Waschen von Zellen verwendet werden.

#### 4.3.7 t-BOOH

Tert-Butylhydroperoxid (t-BOOH) wurde genutzt, um die Erythrozyten unter oxidativen Stress zu setzen. Für die Versuche wurde ein Produkt der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (München) verwendet.



**Abbildung 9:** t-BOOH

#### 4.3.8 Glutathione Assay Kit

Glutathion besteht aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat. Es ist in der Lage, Radikale zu oxidieren und somit unschädlich zu machen. Durch die Reduktion zweier Glutathion-Monomere (GSH) entsteht das Dimer GSSG. Daher gibt die GSH/GSSG-Rate Aufschluss über den oxidativen Stress, unter dem der Erythrozyt steht. Für die Versuche wurde das Glutathione Assay Kit der Firma Cayman Chemical (Tallinn) verwendet. Es basiert auf einer Reaktion von GSH mit DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoid Säure). GSTNB (aus GSH und TNB) wird von einer Glutathion-Reduktase reduziert, wobei GSH und TNB entstehen. Hierbei ist die TNB-Menge proportional zu der GSH-Menge. Die Bestimmung der TNB-Menge erfolgt durch eine Messung der Absorption bei 405 oder 412 nm und gibt direkt Aufschluss über den GSH-Gehalt (Cayman Booklet Glutathione Assay Kit Item No. 703002).

#### 4.3.9 Perchlorsäure-Lösung

Für die Versuche wurde eine 6-prozentige Perchlorsäure-Lösung angefertigt. Perchlorsäure verfügt über einen  $pK_S$ -Wert von -10, ist also eine sehr starke Säure. Sie ist in der Lage, ATP aus Zellen zu extrahieren und wird daher bei Messungen des intrazellulären ATP-Gehalts eingesetzt.

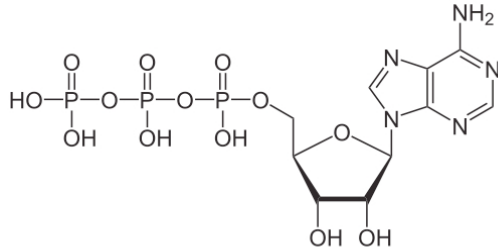
#### 4.3.10 Kaliumhydrogencarbonat-Lösung

Um den bei der ATP-Bestimmung durch die Perchlorsäurelösung entstandenen sauren pH-Wert wieder auszugleichen, wird eine gesättigte Kaliumhydrogencarbonatlösung verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Salz der Kohlensäure, die bei der Reaktion mit der Perchlorsäure im gasförmigen Zustand freigesetzt wird.

#### 4.3.11 ATP

Bei ATP (Adenosintriphosphat) handelt es sich um den wichtigsten Energieträger des menschlichen Körpers. Da die Phosphatgruppen ein sehr hohes Gruppenübertragungspotenzial haben, wird bei der Abspaltung einer Gruppe in et-

wa 32,3 kJ/mol Energie frei, bei der Spaltung beider Gruppen der doppelte Gehalt. ATP wird benötigt, um aktive Transportsysteme wie die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zu betreiben. Auch viele andere Enzymreaktionen sind ATP-abhängig.



**Abbildung 10:** Strukturformel von ATP

In den Versuchen wurde mit ATP eine Standardkurve definiert, um bei der intrazellulären ATP-Bestimmung Vergleichswerte bestimmen zu können.

#### 4.3.12 Luciferase

Luciferasen sind Enzyme mit der Eigenschaft, Luciferine oxidieren zu können. Die Firefly-Luciferase, die bei den Versuchen zur ATP-Bestimmung verwendet wurde, reagiert abhängig von ATP. Bei der Reaktion entstehen Kohlenstoffdioxid, Pyrophosphat, AMP und Licht. Die Lichtemission kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Das Emissionsmaximum des entstehenden Lichts liegt bei 562 nm.

Mit Hilfe der Michaelis-Gleichung kann man die Lichtintensität wie folgt berechnen:

$$\text{Lichtintensität} = (V_{\max} \times C_{\text{ATP}}) / (K_m + C_{\text{ATP}}).$$

Die Gleichung zeigt, dass sich die Lichtintensität direkt proportional zur ATP-Konzentration verhält. So kann der ATP-Gehalt der gemessenen Probe durch Verwendung einer Standardkurve bestimmt werden.

Das bei den Versuchen verwendete Luciferin-Luciferase Assay Kit stammt von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim).

#### 4.4 Durchflusszytometrie – FACS Analyse

Die Durchflusszytometrie und die FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) beruhen auf dem Prinzip, einzelne Zellen an einem Laserstrahl mit ei-

ner bestimmten Wellenlänge vorbeizuführen. Das geschieht durch Ansaugung der sich in einer Lösung befindlichen Zellen. Die Zellen werden hintereinander durch eine Kapillare geschleust und hydrodynamisch fokussiert. So wird gewährleistet, dass immer nur eine Zelle vom Laser angestrahlt wird und sich nicht verschiedene Messereignisse addieren. Die Größe und Gestalt der Zelle sowie deren Anfärbung, sind für die Erzeugung eines spezifischen Streulichts verantwortlich. Je nach Winkel, in dem das Streulicht gemessen wird, enthält man entweder das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter (SSC)) oder das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter (FSC)).

Der Forward Scatter (gemessen mit bis zu  $10^\circ$  im Vergleich zum einfallenden Lichtstrahl) gibt Informationen über die Größe der Zelle. Je kleiner die Zelle, desto kleiner das Vorwärtsstreulichtsignal. Das Seitwärtsstreulicht (ca.  $90^\circ$  im Vergleich zum einfallenden Lichtstrahl) ist nicht nur von der Größe der Zelle, sondern auch von der Membranfaltung und dem Zellinhalt, sprich der Granularität abhängig. Auch hier gilt: je höher die Granularität, desto höher das Streulicht.

Im Normalfall dienen ein oder mehrere Laser als Lichtquelle, da der Laser aufgrund seiner Eigenschaften – hohe Energiedichte, einfache Justierung, Kohärenz und Monochromasie – den Anforderungen entspricht.

Wie in Kapitel 4.4.2 und 4.4.3 bereits erwähnt, kann man Zellen, deren Bestandteile oder Inhalte mit bestimmten Fluoreszenzen anfärben, um so Informationen über funktionelle Zelleigenschaften wie Enzymaktivität zu erhalten oder Zellbestandteile direkt nachweisen zu können.

Fluorochrome sind in der Lage, Lichtenergie zu absorbieren. Dies geschieht in einem bestimmten Wellenlängenbereich, der sich in dem Bereich der Wellenlänge befinden muss, der vom Laser emittiert wird. Die aufgenommene Energie nutzen die Elektronen um auf ein höheres Energieniveau zu gelangen. Fallen sie auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, emittieren sie Licht mit einer anderen Wellenlänge (im Fall von Annexin V-FITC 530 nm) als das zuvor absorbierte Licht (488 nm). Ein Teil der Energie geht in Form von Wärme verloren. Das emittierte Licht wird von entsprechend justierten Detektoren erfasst.

Die Versuche wurden mit Hilfe des FACSCalibur® (BD, Heidelberg) durchgeführt.

#### **4.5 Luminometer**

Für den Versuch der Messung intrazellulären ATPs wird ein Luminometer benötigt. Im Kapitel 4.3.12 wird die Funktionsweise des Luciferin-Luciferase Assay Kits und des Luminometers dargestellt. Bei den Versuchen wurde das Luminometer Berthold Biolumat LB9500 (Bad Wildbad) verwendet.



## **5 Methoden**

### **5.1 Annexin V-Bindung und forward scatter**

Zunächst wurden 5  $\mu$ l Erythrozytenkonzentrat in 1 ml Ringer-Lösung resuspendiert und anschließend unter dem Einfluss von 10, 50 und 100  $\mu$ M Phlorizin für 48 h bei 37 °C inkubiert. Dasselbe wurde mit einer glukosefreien Ringer-Lösung durchgeführt. Für beide Versuchsaufbauten wurde eine Negativkontrolle (ohne Zusatz von Phlorizin) angefertigt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben bei 1600 rpm und Raumtemperatur (21 °C) für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Erythrozyten wurden im Dunkeln für 20 Minuten mit Annexin V gefärbt. Anschließend wurde mit Hilfe des FACS der forward scatter gemessen sowie die Intensität der Annexin V-Fluoreszenz ermittelt. Dies geschah im FL-1-Kanal mit einer Erregungswellenlänge von 488 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

### **5.2 Messung des intrazellulären Kalziums**

Zur Bestimmung des intrazellulären Kalziums wurden die Erythrozyten wie in Kapitel 5.1 beschrieben ebenfalls für 48 h inkubiert und nach Ablauf der Zeit zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit Fluo-3/AM gesättigt (Ringer-Lösung mit 5mM  $\text{CaCl}_2$  und 2  $\mu$ M Fluo-3/AM) und wiederum für 20 Minuten im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit 5mM  $\text{CaCl}_2$  enthaltender Ringer-Lösung gewaschen und nachfolgend in 200  $\mu$ l Ringer resuspendiert. Schließlich wurden die Proben im FL-1-Kanal des FACS gemessen.

### **5.3 Bestimmung der GSH/GSSG Rate**

Zur Bestimmung der GSH/GSSG Rate wurden humane Erythrozyten (Hämatokrit 5%) verwendet. Diese wurden für 30 Minuten bei 37 °C zum einen in reiner Ringer-Lösung, zum anderen in einer 0,3 mM t-BOOH enthaltenden Ringer-Lösung inkubiert. Beide Versuchsaufbauten wurden sowohl ohne als auch unter dem Einfluss von 100  $\mu$ M Phlorizin durchgeführt. Anschließend wurden die Zel-

len zweimal mit PBS gewaschen. Auf Eis wurden 50 µl der Erythrozyten mit Hilfe von 250 µl destilliertem Wasser lysiert und anschließend bei 14.000 rpm bei 0 °C zentrifugiert. Zu 150 µl des Überstandes wurde im Folgenden ebenfalls auf Eis 150 µl 10-prozentige Metaphosphorsäure hinzugegeben um den Überstand zu deproteinieren. Im Anschluss wurde mit Hilfe des Glutathion-Assay Kits GSH und GSSG nach Protokoll des Herstellers determiniert.

#### **5.4 Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration**

Für die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration wurden 90 µl Erythrozytenkonzentrat in Ringer-Lösung sowie in glukosefreier Ringer-Lösung resuspendiert (Hämatokrit 5%). Dies geschah in Anwesenheit und Abwesenheit von 100 µM Phlorizin. Die Proben wurden wie in Kapitel 5.1 und 5.2 beschrieben für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur intrazellulären ATP-Bestimmung wurden nach Ablauf der Inkubationszeit folgende Schritte durchgeführt:

##### 5.4.1 Vorbereitung der Proben

1. Zentrifugieren der Proben bei 4 °C bei 1.800 rpm für 3 min
2. Zweimaliges Waschen der Erythrozyten mit kaltem PBS (4 °C), ebenfalls bei 4 °C bei 1.800 rpm für 3 min
3. Hinzufügen von 50 µl des Erythrozytenpellets zu 700 µl destilliertem Wasser zur Lyse der Erythrozyten
4. Hinzufügen von 500 µl 6-prozentiger Perchlorsäure zum Ausfällen der Proteine. Gründliches Mischen der Proben mit anschließender Inkubation für 10 min bei 4 °C
5. 400 µl des Überstands werden zur Justierung des pH-Werts auf 7,7 mit 45 µl gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung vermengt, erneut gründlich gemischt und anschließend für 8 min mit 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.
6. 200 µl des Überstandes bilden die Proben für die anschließende Messung.

#### 5.4.2 Messen der Standardkurve

Die Standardkurve wurde mit den folgenden ATP-Konzentrationen (Verdünnung mittels destilliertem Wasser) gemessen: 125, 250, 500 und 1000 nmol/l.

#### 5.4.3 Messung der Proben

Die Verdünnung der Proben erfolgte durch Vermischung von 100 µl 0,1M Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,8, 98 µl destilliertem Wasser, 2 µl der Probe (siehe Kap. 5.4.1) und 40 µl Luciferase. Die Verzögerung des Luminometers wurde auf 20 s eingestellt, die Messdauer betrug 10 s.

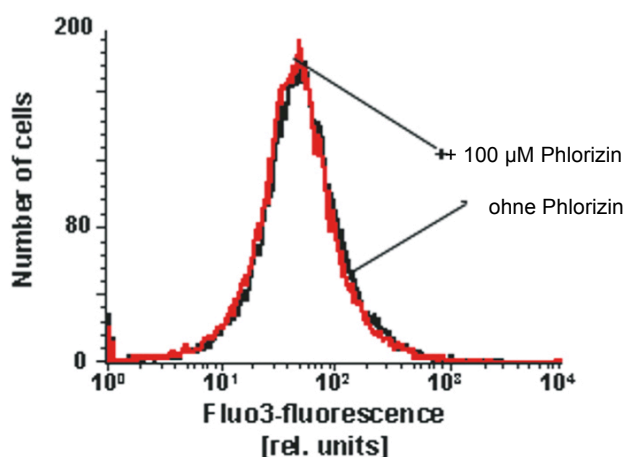
### 5.5 Statistik

Die Daten werden im arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Sowohl ANOVA als auch Tukey's Test wurden je nach Indikation als Test im Anschluss an die Experimente verwendet. Die Anzahl der Patienten entspricht den benutzten Erythrozytenkonzentraten und wird mit n beschrieben. Da jede Erythrozytenprobe unterschiedlich auf die Experimente reagiert, wurde für jeden Versuch ein Kontrollversuch mit der entsprechenden Erythrozytenprobe durchgeführt.

In Kapitel 6.5 wurden die Standardabweichungen mit Hilfe von Excel berechnet.

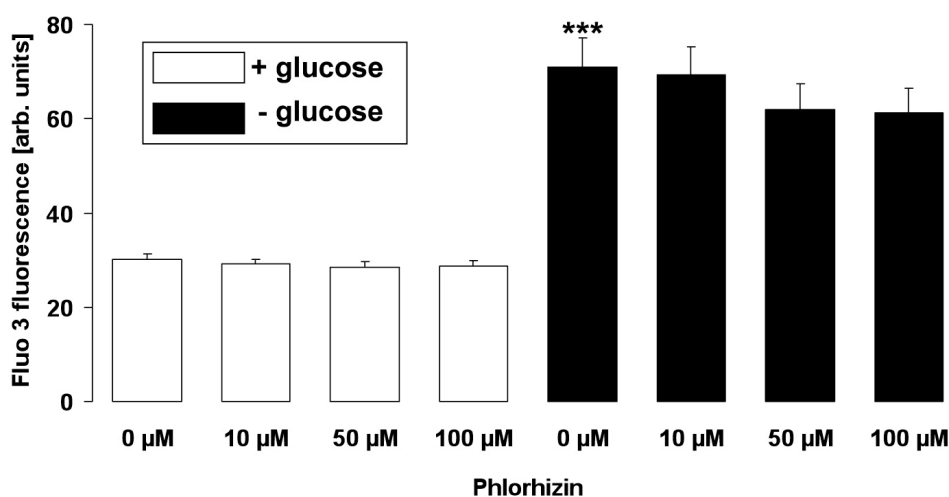
## 6 Ergebnisse

### 6.1 Messung des intrazellulären Kalziums



**Abbildung 11:** Original-Histogramm – Messung des intrazellulären Kalziums +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach der Inkubation der Erythrozyten für 48 h in glukosefreier Ringer-Lösung, mit (+, rote Linie) und ohne (-, schwarze Linie) den Einfluss von 100 µM Phlorizin.



**Abbildung 12:** Messung des intrazellulären Kalziums in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=32) der Fluo-3-Fluoreszenz nach der Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer (+Glukose, weiße Balken) und in glukosefreier Ringer-Lösung (-Glukose, schwarze Balken) unter dem Einfluss der angegebenen Phlorizin-Konzentrationen (0, 10, 50, 100 µM).

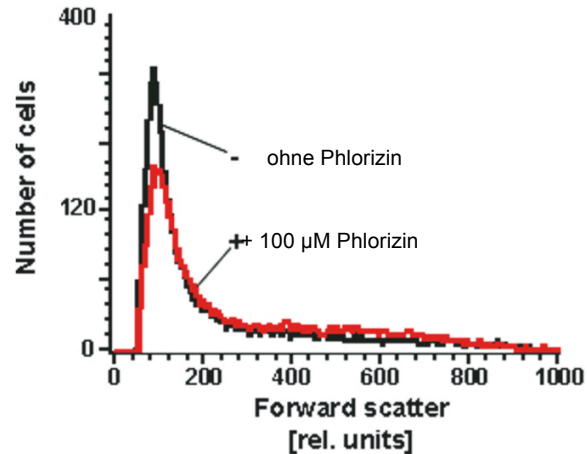
Abbildungen 11 und 12 zeigen zum einen den Unterschied der intrazellulären Kalzium-Konzentration nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h mit und ohne Zugriff auf Glukose und zum anderen die Beeinflussung der intrazellulären Kalzium-Konzentration durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Phlorizin. Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration wurde mit Hilfe des FACSCalibur und der Fluo-3-AM-Fluoreszenz gemessen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Fluo-3-Fluoreszenz unter dem Entzug von Glukose für 48 h um mehr als 100 % zunimmt (★★★,  $p < 0,001$ ).

Unter Zugriff der Erythrozyten auf Glukose (Abb. 12, weiße Balken) war der Einfluss von Phlorizin sehr klein. Phlorizin senkte zwar die Fluo-3-Fluoreszenz in geringem Maße, jedoch reichten die Werte nicht aus, um statistische Signifikanz zu erlangen.

Entzieht man den Erythrozyten jedoch die Glukose (Abb. 12, schwarze Balken), indem man sie für 48 h in glukosefreier Ringer-Lösung inkubiert, ist ein deutliches Sinken der Fluo-3-Fluoreszenz zu sehen, wenn Phlorizin hinzugegeben wird. Dies ist besonders auffällig bei der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin. Hier wurde die Fluo-3-Fluoreszenz um bis zu ca. 13 % gesenkt.

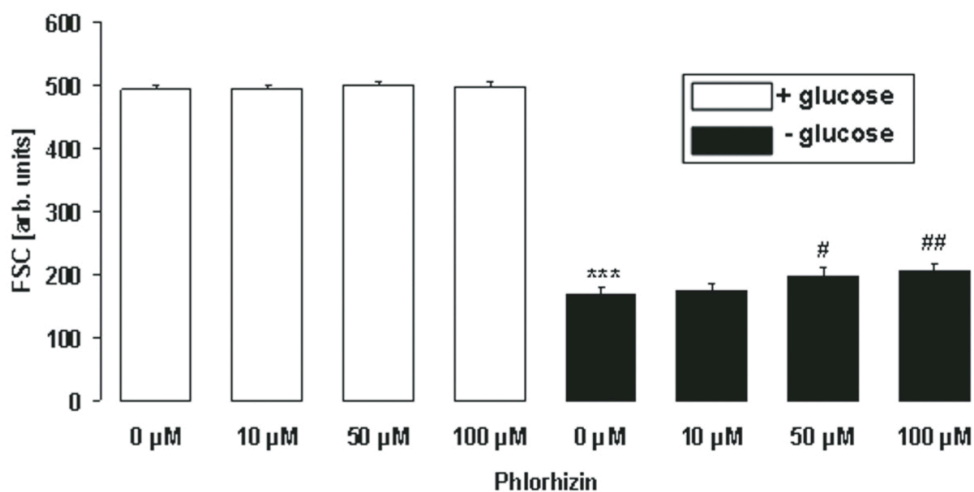
## **6.2 Forward Scatter**

Erhöht sich der intrazelluläre Kalziumspiegel, wie in Kapitel 6.1 beschrieben, kommt es zu einer kalziumabhängigen Aktivierung von Kaliumkanälen, was einen Austritt von Kalium zur Folge hat. Über den entstehenden elektrischen Gradienten folgen Chlorid-Ionen. Der Verlust von KCl verursacht wiederum die Entstehung eines osmotischen Gradienten, woraufhin Wasser aus der Zelle ausströmt. Im Ergebnis schrumpft die Zelle, was zu einer Änderung des Forward Scatters führt.



**Abbildung 13:** Original-Histogramm – Messung des Vorwärtsstreulichts +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Original-Histogramm des Vorwärtsstreulichts der Erythrozyten nach 48 h Inkubation in einer glukosefreien Ringer-Lösung mit (+, rote Linie) und ohne Einfluss (-, schwarze Linie) von 100 µM Phlorizin.



**Abbildung 14:** Messung des Vorwärtsstreulichts in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Arithmetisches Mittel ± SEM (n=32) des Vorwärtsstreulichts der Erythrozyten nach der Inkubation für 48 h in Ringer (+Glukose, weiße Balken) und in glukosefreier Ringer-Lösung (-Glukose, schwarze Balken) unter Einfluss der angegebenen Phlorizin-Konzentrationen (0, 10, 50, 100 µM).

In Abbildung 14 ist deutlich zu sehen, dass nach 48 h Inkubation der Erythrozyten in glukosefreier Ringer-Lösung der Forward Scatter signifikant kleiner ist als nach 48 h unter Zugriff auf Glukose (\*\*\*, p<0,001). Es besteht zwar die Möglichkeit, dass das Vorhandensein von Glukose eine osmotische Größenverän-

derung der Zellen induziert, jedoch entsprechen diese Daten, bezogen auf apoptotische Veränderungen der Erythrozyten, den Ergebnissen aus Kapitel 6.1, bei denen nach 48 h Glukose-Entzug eine deutlich erhöhte Fluo-3-Fluoreszenz gemessen wurde. Das wiederum lässt auf einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel schließen, was die oben beschriebenen Folgen und letztendlich die Schrumpfung der Zelle nach sich zieht.

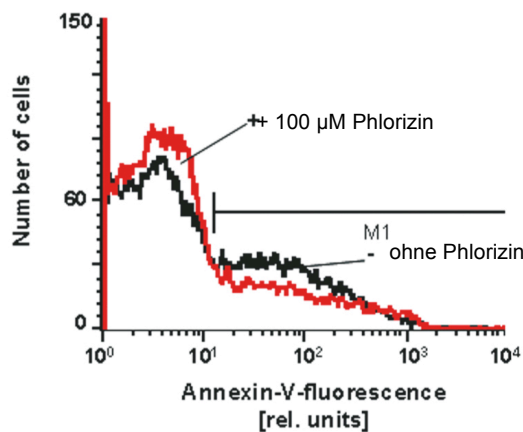
Die weißen Balken in Abbildung 14 beschreiben den Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Phlorizin auf das Überleben der Erythrozyten in Ringer-Lösung. Hier ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Entzieht man den Erythrozyten jedoch die Glukose (Abb. 14, schwarze Balken) erreicht der Effekt von 50  $\mu\text{M}$  (#,  $p < 0,05$ ) und 100  $\mu\text{M}$  (##,  $p < 0,01$ ) Phlorizin statistische Relevanz. Der gemessene Forward Scatter ist hier bedeutend höher als der Forward Scatter der Erythrozyten, die nicht unter dem Einfluss von Phlorizin standen.

### 6.3 Annexin V-Bindung

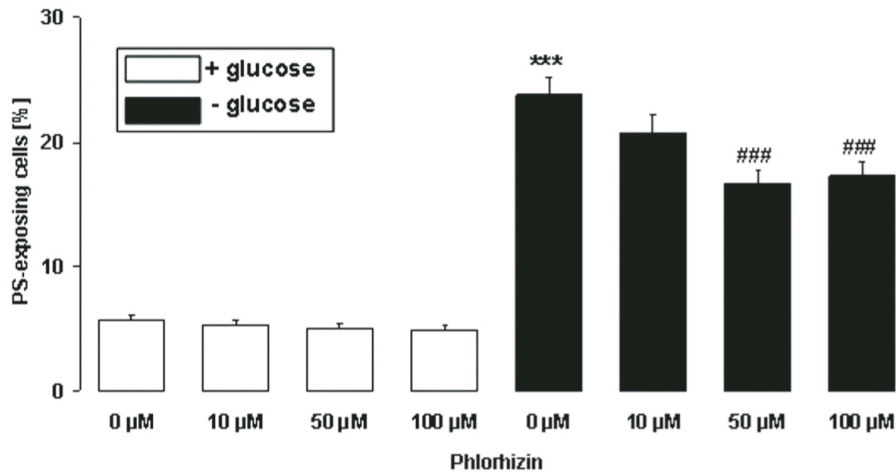
Die Annexin V-Bindung gibt Aufschluss über die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten. Annexin V kann wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben an Phosphatidylserin binden. Die Emission von an Annexin V konjugiertem FITC wurde im FL1 des FACSCalibur gemessen.

Es ist bekannt, dass eine erhöhte zytosolische Kalzium-Konzentration das Scrambling der Zellmembran sowie die Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Membran stimuliert (Kapitel 2.3).



**Abbildung 15:** Original-Histogramm – Annexin V-Bindung in glukosefreier Ringer-Lösung +/- 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Original-Histogramm der Annexin V-Bindung der Erythrozyten nach 48 h Inkubation in glukosefreier Ringer-Lösung mit (+, rote Linie) und ohne (-, schwarze Linie) Einfluss von 100 µM Phlorizin.



**Abbildung 16:** Messung der Annexin V-Bindung in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=32) der Annexin V-Bindung nach der Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer (+Glukose, weiße Balken) und in glukosefreier Ringer-Lösung (-Glukose, schwarze Balken) unter Einfluss der angegebenen Phlorizin-Konzentrationen (0, 10, 50, 100 µM).

Abbildung 16 zeigt, dass die Annexin V-Fluoreszenz der Erythrozyten, die Glukose zur Verfügung hatten, weniger als ein Viertel der Annexin V-Fluoreszenz beträgt, die bei Erythrozyten unter Glukoseentzug nach Ablauf der Inkubationszeit von 48 h gemessen wurde (\*\*\* p<0,001).

Bei dieser Versuchsanordnung kann gezeigt werden, dass Phlorizin keinen signifikanten Einfluss auf die Erythrozyten hatte, die in Ringer-Lösung (+Glukose) inkubiert wurden.

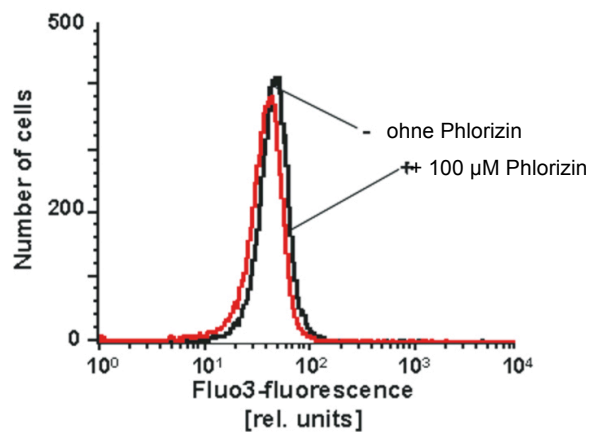
Die Erythrozyten, die in glukosefreier Ringer-Lösung inkubierten, zeigten allerdings eine deutlich verringerte Annexin V-Bindung unter dem Einfluss von Phlorizin. Die Zugabe von 50 µM Phlorizin (### p<0,001) erreicht statistische Relevanz.



## 6.4 Auswirkungen von Phlorizin unter oxidativem Stress

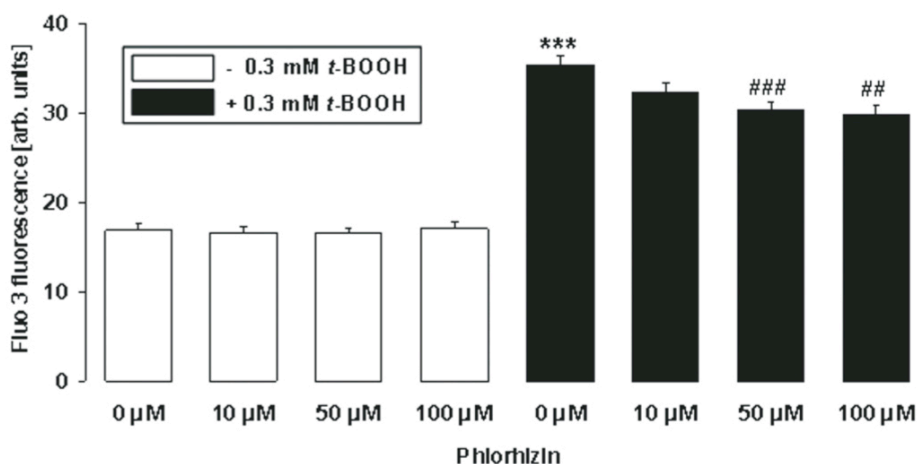
Bei diesem Versuch wurden die Erythrozyten unter oxidativen Stress gesetzt. Um dies zu erreichen wurden 0,3 mM t-BOOH hinzugefügt und die Erythrozyten für 30 min inkubiert. Anschließend wurden erneut die bereits in Kapitel 6.1 – 6.3 aufgeführten Parameter gemessen.

### 6.4.1 Bestimmung des intrazellulären Kalziums



**Abbildung 17:** Original-Histogramm – Messung des intrazellulären Kalziums in Ringer-Lösung unter oxidativem Stress +/- 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach der Inkubation der Erythrozyten für 30 min in Ringer-Lösung unter der Zugabe von 0,3 mM t-BOOH, mit (+, rote Linie) und ohne (-, schwarze Linie) den Einfluss von 100 µM Phlorizin.



**Abbildung 18:** Messung des intrazellulären Kalziums unter oxidativem Stress in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

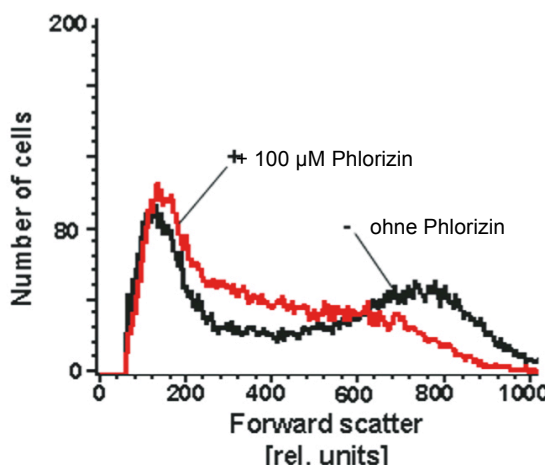
Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=28) der Fluo-3-Fluoreszenz nach der Inkubation der Erythrozyten für 30 min in Ringer-Lösung mit (+0,3mM t-BOOH, schwarze Balken) und ohne (-0,3mM t-BOOH, weiße Balken) 0,3mM tert-Butylhydroperoxid unter dem Einfluss der angegebenen Phlorizin-Konzentrationen (0, 10, 50, 100  $\mu$ M).

Abbildung 18 zeigt den Vergleich zwischen Erythrozyten, die nach der Inkubationszeit von 48 h in einer Ringer-Lösung mit entsprechenden Konzentrationen Phlorizin unter oxidativen Stress gesetzt wurden (Abb. 18, schwarze Balken) und denjenigen, die nicht unter oxidativen Stress gesetzt wurden (Abb. 18, weiße Balken). Die Fluo-3-Fluoreszenz ist bei den unter Stress gesetzten Erythrozyten ungefähr doppelt so hoch.

In Kapitel 6.1 wurde bereits dargestellt, dass Phlorizin keinen Einfluss auf Erythrozyten hat, die für 48 h in Ringer-Lösung (+Glukose) inkubiert wurden. Dies wurde in diesem Versuch erneut bestätigt.

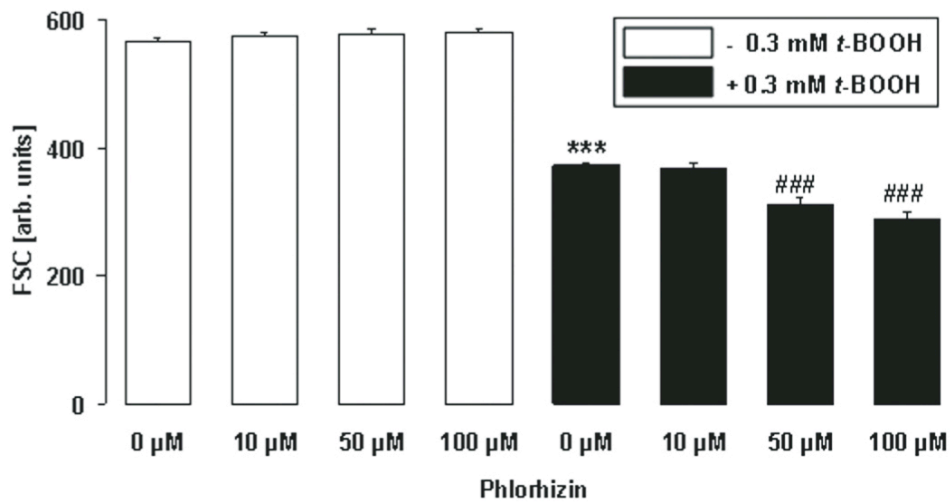
Bei den Erythrozyten, die nach der Inkubationszeit mit Hilfe von t-BOOH unter oxidativen Stress gesetzt wurden, wird unter dem Einfluss von Phlorizin die Fluo-3-Fluoreszenz deutlich geringer. Bei einer Phlorizinkonzentration von 50  $\mu$ M (###,  $p < 0,001$ ) und 100  $\mu$ M (##,  $p < 0,01$ ) erreicht der Effekt statistische Relevanz.

#### 6.4.2 Forward Scatter



**Abbildung 19:** Original-Histogramm – Messung des Vorwärtsstreulichts in Ringer-Lösung unter oxidativem Stress +/- 100  $\mu$ M Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Original-Histogramm des Vorwärtsstreulichts nach der Inkubation der Erythrozyten für 30 min in Ringer-Lösung unter der Zugabe von 0,3 mM t-BOOH, mit (+, rote Linie) und ohne (-, schwarze Linie) Einfluss von 100  $\mu$ M Phlorizin.



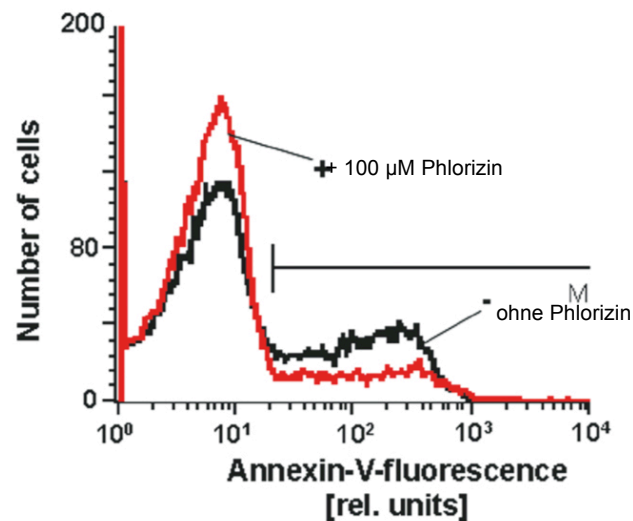
**Abbildung 20:** Messung des Vorwärtsstreulichts unter oxidativem Stress in glukosefreier/ Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=28) des Vorwärtsstreulichts nach der Inkubation der Erythrozyten für 30 min in Ringer-Lösung mit (+0,3 mM t-BOOH, schwarze Balken) und ohne (-0,3 mM t-BOOH, weiße Balken) 0,3 mM tert-Butylhydroperoxid unter dem Einfluss der angegebenen Phlorizin-Konzentrationen (0 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM).

Der durch t-BOOH erzeugte oxidative Stress hat nicht nur Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration, sondern auch auf den Forward Scatter. Die Zellen, die unter oxidativen Stress gesetzt wurden, weisen im Vergleich zu den anderen ein deutlich kleineres Zellvolumen auf (★★★,  $p < 0,001$ ).

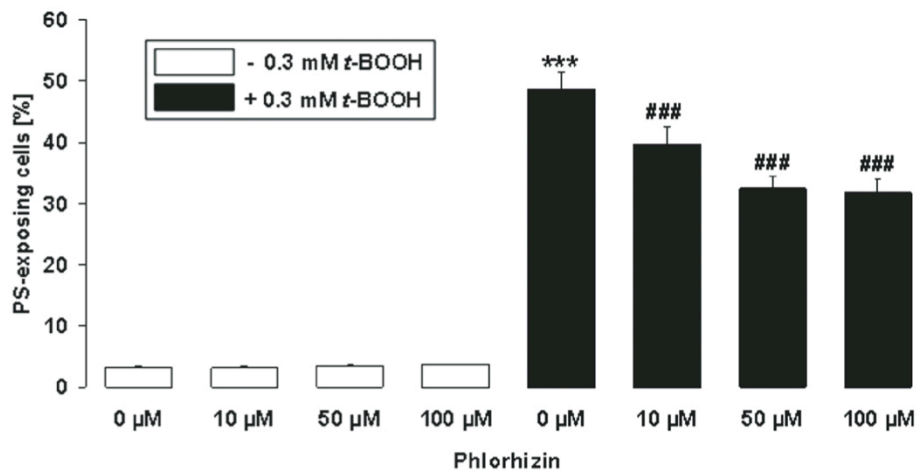
Abbildung 20 zeigt zusätzlich, dass die Zugabe von Phlorizin zu den unter oxidativen Stress gesetzten Zellen eine weitere deutliche Verringerung des Forward Scatters bewirkt, insbesondere in den Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  (###,  $p < 0,001$ ).

#### 6.4.3 Annexin V-Bindung



**Abbildung 21:** Original-Histogramm – Messung der Annexin V-Fluoreszenz in Ringer-Lösung unter oxidativem Stress +/- 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Original-Histogramm der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation der Erythrozyten für 30 min in Ringer-Lösung unter der Zugabe von 0,3 mM t-BOOH, mit (+, rote Linie) und ohne (-, schwarze Linie) Einfluss von 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin.



**Abbildung 22:** Messung der Annexin V-Fluoreszenz unter oxidativem Stress in glukosefreier/Ringer-Lösung +0, 10, 50, 100 µM Phlorizin (Gatidis, Meier et al. 2011)

Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=28) der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation der Erythrozyten für 30 min in Ringer-Lösung mit (+0,3 mM t-BOOH, schwarze Balken) und ohne (-0,3 mM t-BOOH, weiße Balken) 0,3 mM tert-butylhydroperoxid unter dem Einfluss der angegebenen Phlorizin-Konzentrationen (0 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM). Bestimmung der GSH/GSSG-Rate.

Betrachtet man die Annexin V-Bindung nach oxidativem Stress, ist diese im Vergleich zu den ungestressten Erythrozyten um ein Vielfaches erhöht (\*\*\*,  $p < 0,001$ ) (Abb. 22).

Ebenfalls signifikant ist der Effekt von Phlorizin, der die Annexin V-Fluoreszenz schon bei einer Konzentration von 10 µM deutlich senken konnte. Bei 50 µM nahm die Fluoreszenz nochmals um etwa den gleichen Wert ab, bei einer Phlorizin-Konzentration von 100 µM zeigte sich keine zusätzliche signifikante Senkung (###,  $p < 0,001$ ).

Es wurden weitere Experimente durchgeführt um herauszufinden, ob Phlorizin die GSH/GSSG-Rate in Erythrozyten beeinflusst.

Ohne den oxidativen Einfluss von t-BOOH und Phlorizin wurde eine GSH/GSSG-Rate von  $7,3 \pm 1,6$  (n=4) gemessen. Bei Hinzugabe von 100 µM Phlorizin betragen die Werte  $7,7 \pm 1,2$  (n=4).

Wurden die Erythrozyten mit Hilfe von 0,3 mM t-BOOH unter oxidativen Stress gesetzt, sank die GSH-GSSG-Rate ohne den Einfluss von Phlorizin auf  $3,1 \pm 0,7$  (n=4). Bei Zugabe von 100 µM Phlorizin sank die Rate ebenfalls:  $3,0 \pm 0,3$  (n=4).

An diesen Ergebnissen erkennt man, dass oxidativer Stress, verursacht durch 0,3 mM t-BOOH, die GSH/GSSG Rate um mehr als die Hälfte senkt. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von 100 µM Phlorizin nicht signifikant beeinflusst werden.

## 6.5 Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration

### 6.5.1 Erstellen der Standardkurve

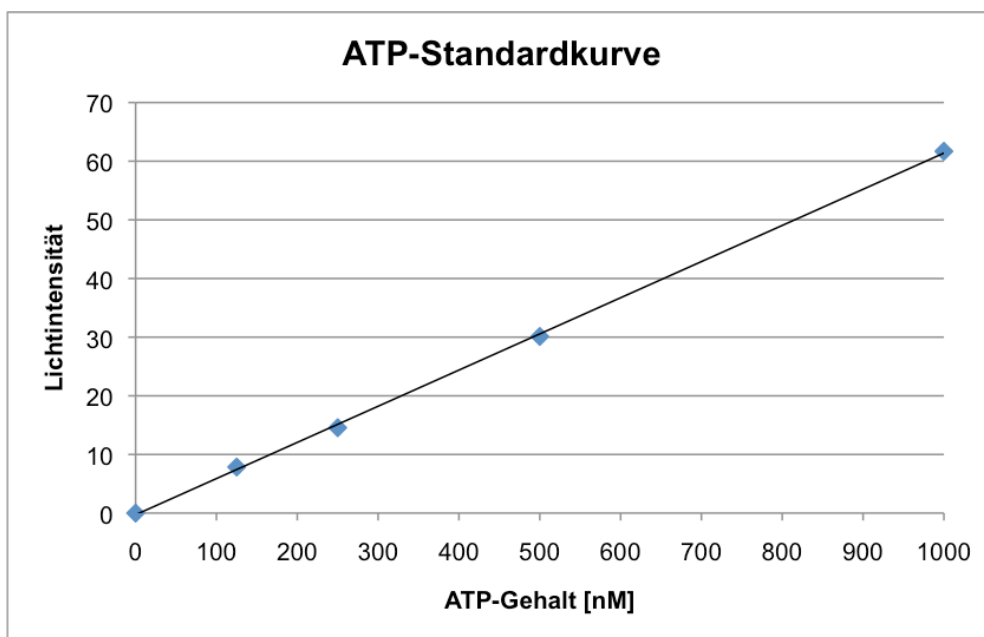


Abbildung 23: ATP-Standardkurve 1

Wie in Kapitel 5.4 beschrieben wurde mit Hilfe fünf verschiedener ATP-Konzentrationen eine Standardkurve erstellt, um für die aus den Versuchen erhaltenen Werte Vergleichswerte zu erzeugen.

Mit Hilfe von Excel wurde folgende Gleichung für die Standardkurve erstellt:

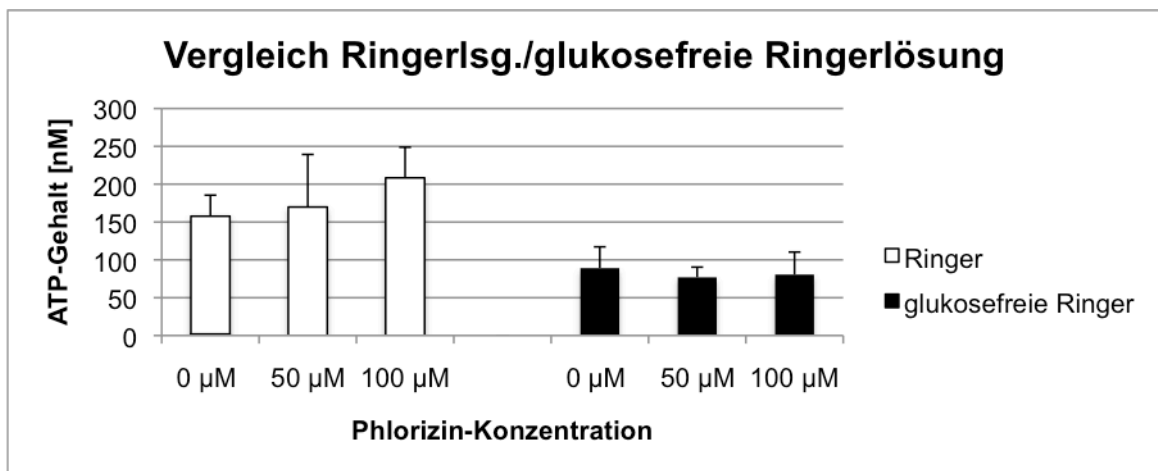
$$y = 0,0617x.$$

Daraus konnte der ATP-Gehalt der Proben errechnet werden, der in Abbildung 24 dargestellt ist.

## 6.5.2 Ergebnisse

### 6.5.2.1 Vergleich Ringer-Lösung und glukosefreie Ringer-Lösung

Zunächst wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der Erythrozyten nach 48 h in Ringer-Lösung (+Glukose) und glukosefreier Ringer-Lösung (-Glukose) unter dem Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Phlorizin (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24:** Messung des ATP-Gehalts in Ringer-Lsg./ glukosefreie Ringer-Lösung +0, 50, 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin

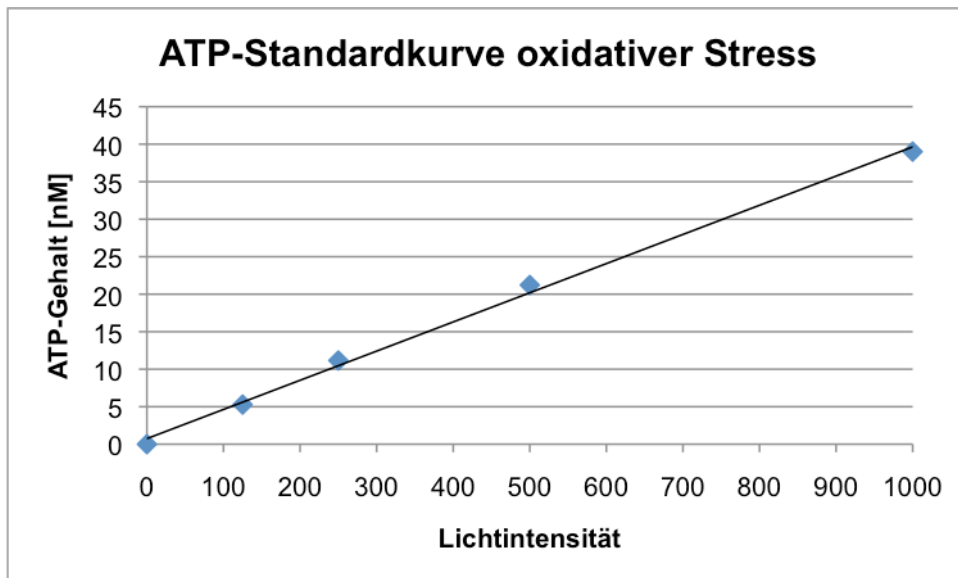
Vergleich des ATP-Gehalts nach 48 h der Inkubation in Ringer-Lösung (+Glukose, weiße Balken) und in glukosefreier Ringer-Lösung (-Glukose, schwarze Balken) unter Einfluss von 0, 50 und 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin (n=4). Die Werte beschreiben das arithmetische Mittel +/- SD.

Abbildung 24 zeigt deutlich, dass Erythrozyten nach 48 h Glukose-Entzug (schwarze Balken) einen weitaus geringeren ATP-Gehalt aufweisen als die Erythrozyten, die Zugriff auf Glukose hatten. Bei den in glukosefreier Ringer-Lösung inkubierten Erythrozyten zeigt die Zugabe von Phlorizin keinerlei signifikanten Einfluss auf den intrazellulären ATP-Gehalt.

Unter Zugriff auf Glukose (weiße Balken) lässt sich eine Tendenz zur Steigerung des ATP-Gehalts der Erythrozyten feststellen, wenn diese durch Phlorizin, vor allem in der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  beeinflusst werden. Diese Werte erreichen jedoch keine statistische Relevanz.

### 6.5.2.2 Vergleich Ringer-Lösung und Ringer-Lösung mit oxidativem Stress

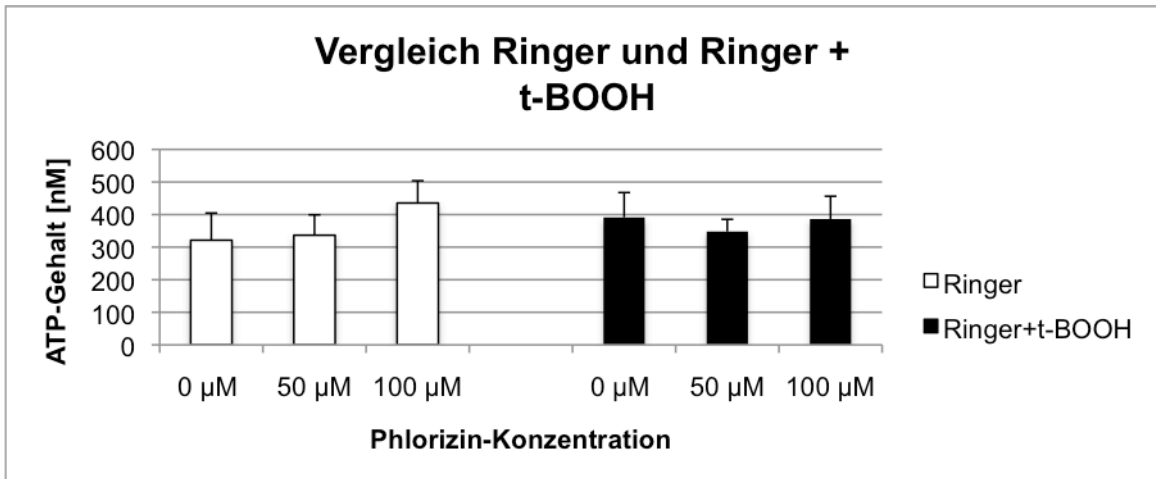
Für diesen Versuch wurde eine neue Standardkurve erstellt, welche in Abbildung 25 dargestellt ist.



**Abbildung 25:** Standardkurve oxidativer Stress

Die Erythrozyten-Konzentrate wurden, wie bei den vorherigen Versuchen auch, in Ringer-Lösung resuspendiert und unter den Einfluss von 0, 50 und 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin gestellt. Pro Erythrozytenkonzentrat wurden zwei Proben hergestellt. Anschließend wurden sie bei 37 °C für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeweils eine der Proben mit Hilfe von 0,3 mM t-BOOH 30 min unter oxidativen Stress gesetzt. Im Folgenden wurde das in Kapitel 5.4 beschriebene Protokoll zur intrazellulären ATP-Bestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.





**Abbildung 26:** Messung des ATP-Gehalts mit und ohne oxidativem Stress in Ringer-Lösung +0, 50, 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin

Vergleich Ringer und Ringer + t-BOOH. Die weißen Balken zeigen den intrazellulären ATP-Gehalt der Erythrozyten nach 48 h der Inkubation in Ringer-Lösung unter Einfluss von 0, 50 und 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin. Die schwarzen Balken zeigen den intrazellulären ATP-Gehalt der Erythrozyten nach 48 h der Inkubation in Ringer-Lösung unter Einfluss von 0, 50 und 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin mit anschließendem Versetzen unter oxidativen Stress mit Hilfe von 0,3 mM t-BOOH (n=4).

Wieder ist bei der intrazellulären ATP-Bestimmung der in Ringer-Lösung inkubierten Erythrozyten unter dem Einfluss von 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin eine Aufwärtstendenz zu erkennen, die jedoch erneut keine statistische Relevanz aufweist.

Auch oxidativer Stress nimmt keinen signifikanten Einfluss auf den intrazellulären ATP-Gehalt der Erythrozyten. Phlorizin zeigt keine signifikante Wirkung auf unter oxidativen Stress gesetzte Erythrozyten.

## 7 Diskussion

### 7.1 Methodendiskussion

Um möglichst physiologische Voraussetzungen für die Experimente zu schaffen, wurden die Lösungen auf einen pH von 7,4 titriert und im Verlauf der Studie jeweils vor den Versuchen erneut kontrolliert.

Dasselbe geschah mit der Osmolarität, die mit Hilfe des Osmometers und geeichten Stammlösungen auf 290 mosmol überprüft und gegebenenfalls korrigiert wurde. Die Proben wurden während der Inkubationszeit stets bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt. Die Herstellung der Proben geschah unter der Sterilbank. Trotzdem ist eine leichte Verunreinigung der Proben, Lösungen und Substanzen nie vollständig auszuschließen.

Die Erythrozytenkonzentrate wurden jeden Morgen frisch von der Tübinger Blutbank geliefert und bis zur Verwendung bei +4 °C gelagert.

Die verwendeten Chemikalien wurden entsprechend Herstellerangaben bei +4 °C oder -20 °C bis zur Verwendung in luftdichten, gegebenenfalls lichtgeschützten Behältnissen aufbewahrt.

Der Tisch, auf dem das FACSCalibur gelagert wird, ist speziell schwingungsarm, so dass Vibrationen, die Einflüsse auf die markierten Zellen und die Messareale hätten, minimiert wurden. Des Weiteren wurde der Raum abgedunkelt um Streulichteinflüsse zu vermeiden.

In den Histogrammen wurde zu Versuchsbeginn zunächst ein sogenanntes Gate festgelegt, womit einzelne Populationen abgegrenzt und so nur das Messen der relevanten Population gewährleistet werden konnte. Diese Abgrenzung beeinflusste das generierte Ergebnis, ist aber für die Bewertung als Fehlerquelle vernachlässigbar, da sie keinen systematischen Einfluss auf die absoluten Endergebnisse hatte.

## 7.2 Ergebnisdiskussion

Es ist bereits bekannt, dass Glukose-Entzug und oxidativer Stress, erzeugt durch t-BOOH, die zytosolische Kalzium-Konzentration erhöhen, das Zellvolumen verändern und das Scrambling der Zellmembran, das die vermehrte Phosphatidylserinexposition beinhaltet, begünstigen. Diese bereits bekannten Anzeichen für Eryptose (Lang, Gulbins et al. 2008) wurden durch die hier vorgelegten Ergebnisse dieser Studie erneut bestätigt.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Wirkungen von Phlorizin auf die genannten Parameter.

Um einen ähnlichen Effekt des Membran-Scramblings wie bei In-Vitro-Experimenten zu verursachen, musste bei In-Vivo-Versuchen jedoch ungefähr das Dreifache der in Kapitel 6 beschriebenen Konzentrationen eingesetzt werden. Bei Mäusen wurde mit Hilfe von Streptozotocin Diabetes induziert und anschließend mit einer 5-prozentigen Phlorizin-Ernährung behandelt. Diese Dosis hat sich als effektiv bezüglich des Entgegenwirkens der Hyperglykämie erwiesen (Masumoto, Akimoto et al. 2009). Allerdings hat sich als Folge dieser Diät herausgestellt, dass Metabolite von Phlorizin Konzentrationen erreichten, die bis zu 100 % höher lagen als die von Phlorizin selbst (Masumoto, Akimoto et al. 2009). Es wäre daher interessant, weitere Experimente durchzuführen, um zu untersuchen, ob beim Überleben von Erythrozyten ähnliche Konzentrationen dieser Metabolite erreicht werden können. Eventuell haben diese einen noch signifikanteren Effekt auf Eryptose als Phlorizin. Weitere In-Vivo-Versuche können zusätzliche Aufschlüsse über die benötigten Phlorizin-Konzentrationen erbringen, die einen ähnlichen Einfluss auf Eryptose haben.

Phlorizin beeinflusst den zytosolischen Kalziumspiegel augenscheinlich nur in Folge von oxidativem Stress. Bei Glukoseentzug ist der Effekt zu klein, um statistisch relevant zu sein. Oxidativer Stress aktiviert die kalziumpermeablen Kationenkanäle (Duranton, Huber et al. 2002). Glukoseentzug hat ähnliche Effekte (Klarl, Lang et al. 2006). Diese Kanäle beinhalten den spannungsabhängigen Kanal TRPC6 (Foller, Kasinathan et al. 2008). Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch nicht, wie und ob Phlorizin diese Kanäle beeinflusst. Bindungs-

Essays könnten Aufschluss darüber geben, ob Phlorizin durch direkte Bindung an die Kanäle Einfluss auf den Kationenstrom nimmt.

Wird der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht, werden Kalzium-sensitive Kaliumkanäle geöffnet (Bookchin, Ortiz et al. 1987; Brugnara, de Franceschi et al. 1993). Hierbei handelt es sich um die SK4-Kanäle (Hoffman, Joiner et al. 2003). Es kommt daraufhin zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle, der durch den dadurch erzeugten elektrischen Gradienten Chlorid mit sich aus der Zelle zieht. Wasser folgt osmotisch und erzeugt so eine Schrumpfung der Zelle, was sich in einem verringerten Forward Scatter in der Durchflusszytometrie widerspiegelt. Phlorizin könnte einen inhibitorischen Effekt auf den Kalziumeinstrom bewirken, was die unter dem Einfluss von 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin verringerte Zellschrumpfung infolge von Glukoseentzug erklären würde. Diese Beobachtung kann jedoch in keinem der Fälle durch einen Einfluss auf den erythrozytären Glukose-Transport erklärt werden.

Es ist interessant zu beobachten, dass im Vergleich hierzu die Anwesenheit von Phlorizin bei unter oxidativen Stress gesetzten Erythrozyten die Zellschrumpfung begünstigt. Allerdings spricht das Sinken der Phosphatidylserin-Exposition sowie die verringerte intrazelluläre Kalziumkonzentration unter dem Einfluss von oxidativem Stress und Phlorizin gegen apoptotische Vorgänge.

Da bekannt ist, dass unter oxidativem Stress der Kalziumspiegel in Erythrozyten steigt, und dies die Schrumpfung der Zelle zur Folge hat, ist der Effekt von t-BOOH auf den Forward Scatter der Erythrozyten leicht zu erklären. Warum Phlorizin diesen Effekt jedoch begünstigt, kann erst durch genauere Analysen der Einflüsse von Phlorizin und t-BOOH auf molekularer Ebene hinreichend geklärt werden. Man kann allerdings von einer additiven Wirkung von t-BOOH und Phlorizin bezüglich der Wirkung auf die Zellschrumpfung ausgehen. Eine potentielle Aktivierung von Kaliumkanälen könnte hierbei eine Rolle spielen.

Als Folge eines erhöhten zytosolischen Kalziumlevels kommt es außerdem zum Scrambling der Zellmembran. Dieser Effekt kann von Phlorizin gehemmt werden, wenn der Erythrozyt Glukoseentzug oder oxidativem Stress ausgesetzt war. Dies lässt sich zumindest teilweise dadurch erklären, dass Phlorizin eventuell den Kalziumeinstrom beeinflusst.

Oxidativer Stress aktiviert außerdem Kaspasen (Bratosin, Estaquier et al. 2001; Matarrese, Straface et al. 2005) in den Erythrozyten, die wiederum den Anionenaustauscher Bande 3 spalten und die Phosphatidylserinexposition auf der Außenseite der Erythrozytenmembran fördern (Mandal, Moitra et al. 2002). Der inhibitorische Effekt des Phlorizins auf das Scrambling der Zellmembran unter Glukoseentzug kann jedoch nicht durch die Inhibition der Kaspasen beschränkt sein, da andere Trigger des programmierten Zelltods der Erythrozyten nicht deren Aktivierung voraussetzen (Lang, Gulbins et al. 2008).

Die Ergebnisse geben Hinweise, dass eventuell mit Hilfe von Phlorizin oder ähnlichen Substanzen wie Derivaten, die mehr pharmakologisches Potential besitzen, Krankheiten behandelt werden können, die beschleunigte oder übermäßige Eryptose beinhalten. Zu diesen Krankheiten gehören zum Beispiel Eisenmangel (Kempe, Lang et al. 2006), Phosphatmangel (Birka, Lang et al. 2004), HUS (Hämolytisch-urämisches Syndrom) (Lang, Beringer et al. 2006), Sepsis (Kempe, Akel et al. 2007), Sichelzellanämie (Lang, Kasinathan et al. 2009), Malaria (Foller, Bobbala et al. 2009) und Wilson's Disease (Lang, Schenck et al. 2007).

Außerdem können Erythrozyten, die Phosphatidylserin an der Außenseite ihrer Membran vermehrt exponieren, leichter an der Gefäßwand anhaften (Andrews and Low 1999) und so das Verklumpen des Blutes akzelerieren (Chung, Bae et al. 2007). Folglich nimmt vermehrte Eryptose Einfluss auf die Mikrozirkulation des Blutes und begünstigt Schäden der Gefäßwand, die durch das Metabolische Syndrom verursacht werden (Zappulla 2008).

Da es sich bei Phlorizin um einen Stoff handelt, der in der westlichen Ernährung häufig vorkommt, bleibt zu hoffen, dass durch gezielte Ernährung zumindest einem Teil der Krankheiten, die durch übermäßige Eryptose entstehen können, vorgebeugt und sie zu einem gewissen Grad sogar behandelt werden können. Nicht umsonst heißt es: "An apple a day keeps the doctor away".

## 8 Zusammenfassung

Erythrozyten sind, wie andere Zellen auch, in der Lage, einen suizidalen Zelltod zu betreiben. Von einigen Substanzen ist bereits bekannt, dass sie die sogenannte Eryptose beeinflussen. Einige Beispiele dafür sind Quecksilber, Monensin, Benzethonium und Oridonin, welche zu den Stimulatoren der Eryptose gehören, sowie Blebbistatin, Koffein und Endothelin, welche einen inhibitorischen Effekt auf die Eryptose haben. Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, welchen Einfluss Phlorizin auf den Ablauf des suizidalen Zelltodes von Erythrozyten hat. Es wurde belegt, dass sich Phlorizin unter bestimmten Umständen ebenfalls inhibitorisch auf die Eryptose auswirkt.

Reife Erythrozyten weisen im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen des menschlichen Körpers keinen Zellkern auf. Daher gibt es einige morphologische Unterschiede im Ablauf des suizidalen Zelltods. Typische und für die Nachweisbarkeit einer ablaufenden Eryptose wichtige Merkmale sind die erhöhte Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Membran, eine erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration sowie die daraus resultierende Zellschrumpfung.

Die Phosphatidylserinexposition, und somit die Aktivität der erythrozytären Scramblase, kann mit Hilfe von FITC-konjugiertem Annexin V durchflusszytometrisch gemessen und verglichen werden. Steht die Zelle unter Energieentzug durch Glukosemangel oder oxidativem Stress, führt dies durch die Bildung von  $\text{PGE}_2$  zu einer erhöhten Kationenleitfähigkeit, was wiederum einen erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle zur Folge hat. Die dadurch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration kann mittels Fluo-3-AM nachgewiesen werden.

Die Anhäufung an intrazellulärem Kalzium führt zu einer Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle, was einen Kaliumausstrom zur Folge hat. Der dadurch entstehende elektrische Gradient zieht einen Chloridausstrom nach sich, wodurch wiederum ein osmotischer Gradient entsteht. Dementsprechend strömt Wasser dem Gradienten folgend aus der Zelle, die Zelle schrumpft. Das ver-

minderte Zellvolumen kann durch das Messen des Forward Scatters (FSC) mit dem Durchflusszytometer ermittelt werden.

Um den Einfluss von Phlorizin auf den suizidalen Zelltod von Erythrozyten zu überprüfen, wurden folgende Versuche durchgeführt: Zunächst wurden Erythrozyten für 48 h alternativ in Ringer-Lösung (+Glukose) oder glukosefreier Ringerlösung inkubiert. Anschließend wurden die oben genannten Parameter durchflusszytometrisch gemessen. Zusätzlich wurde der Einfluss von Phlorizin auf oxidativ gestresste Erythrozyten untersucht, indem nach 48 h der Inkubation in den genannten Lösungen 0,3 mM t-BOOH hinzugefügt wurde. Außerdem wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der Erythrozyten in den genannten Lösungen bestimmt. Die Versuche wurden jeweils unter dem Einfluss von 0, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in glukosehaltiger Ringerlösung sowohl die zytosolische Kalziumkonzentration, also auch die Phosphatidylserinexposition und der FSC der inkubierten Erythrozyten unabhängig von der hinzu gegebenen Phlorizin-Konzentration sind.

Erythrozyten unter Glukoseentzug zeigten nach 48 h der Inkubation deutlich erhöhte Werte für den intrazellulären Kalziumgehalt und die Phosphatidylserinexposition sowie einen deutlich verringerten FSC. Diese Effekte wurden teilweise durch die Zugabe von Phlorizin abgeschwächt (Annexin V-Bindung bei Phlorizinkonzentrationen von  $\geq 10 \mu\text{M}$ , FSC bei Konzentrationen von  $\geq 50 \mu\text{M}$ ). Auch oxidativer Stress erzeugte bei Erythrozyten einen deutlich erhöhten zytosolischen Kalziumspiegel sowie eine erhöhte Phosphatidylserinexposition. Auch diese Effekte wurden bei der Zugabe von Phlorizin verringert (Fluo-3-AM-Fluoreszenz bei Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$ , Annexin V-Bindung bei Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$ ). Der FSC wurde hier durch die Zugabe von Phlorizin nochmals signifikant gesenkt, insbesondere in den Konzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{M}$ . Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde nach 48 h der Inkubation in den o.g. Lösungen durch Phlorizin nicht signifikant beeinflusst.

Die Beobachtungen lassen sich teilweise durch die Hypothese erklären, dass Phlorizin einen inhibitorischen Effekt auf den apoptotisch bedingten Kalziumeinstrom aufweisen könnte. Dafür spricht die verringerte Zellschrumpfung infolge von Glukoseentzug oder oxidativem Stress unter dem Einfluss von Phlorizin. Eine potentielle Aktivierung von Kaliumkanälen durch Phlorizin könnte erklären, warum es den Effekt von t-BOOH auf das Zellvolumen begünstigt.

Das Ergebnis der Studie belegt, dass Phlorizin einen inhibitorischen Effekt auf den suizidalen Zelltod unter Glukoseentzug stehender und oxidativ gestresster Erythrozyten hat; es nimmt jedoch keinen signifikanten Einfluss auf deren intrazellulären Energiegehalt.

Um genaueren Aufschluss über die Interaktionen Phlorizins mit erythrozytären Membrantransportern zu geben, wäre es notwendig, Bindungs-Essays und weitere Versuche auf molekularer Ebene durchzuführen.

Für weitere Untersuchungen wäre interessant, den Einfluss von Substanzen mit höherem pharmakologischem Potenzial und höherer Bioverfügbarkeit auf Eryptose zu testen. In Frage kommen zum Beispiel Phloretin – das Aglukon von Phlorizin – oder Phlorizin-Derivate.



## 9 Literaturverzeichnis

- Alvarado, F. and R. K. Crane (1962). "Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, in vitro." *Biochimica et biophysica acta* **56**: 170-172.
- Andrews, D. A. and P. S. Low (1999). "Role of red blood cells in thrombosis." *Current opinion in hematology* **6**(2): 76-82.
- Bartling, B., J. Holtz, et al. (1998). "Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction?" *Basic research in cardiology* **93**(2): 71-84.
- Berg, C. P., I. H. Engels, et al. (2001). "Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis." *Cell death and differentiation* **8**(12): 1197-1206.
- Bergmann, A. and H. Steller (2010). "Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration." *Science signaling* **3**(145): re8.
- Betz, A. L., L. R. Drewes, et al. (1975). "Inhibition of glucose transport into brain by phlorizin, phloretin and glucose analogues." *Biochimica et biophysica acta* **406**(4): 505-515.
- Bhavsar, S. K., M. Eberhard, et al. (2010). "Monensin induced suicidal erythrocyte death." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **25**(6): 745-752.
- Birka, C., P. A. Lang, et al. (2004). "Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion." *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **448**(5): 471-477.
- Boccia, M. M., S. R. Kopf, et al. (1999). "Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, facilitates memory storage in mice." *Neurobiology of learning and memory* **71**(1): 104-112.
- Bookchin, R. M., O. E. Ortiz, et al. (1987). "Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells." *Progress in clinical and biological research* **240**: 193-200.
- Bratosin, D., J. Estaquier, et al. (2001). "Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria." *Cell death and differentiation* **8**(12): 1143-1156.
- Broudy, V. C., N. Lin, et al. (1991). "Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells." *Blood* **77**(12): 2583-2590.

- Brugnara, C., L. de Franceschi, et al. (1993). "Inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives." *The Journal of clinical investigation* **92**(1): 520-526.
- Chang, H. Y. and X. Yang (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **64**(4): 821-846.
- Chaurio, R. A., C. Janko, et al. (2009). "Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation." *Molecules* **14**(12): 4892-4914.
- Chung, S. M., O. N. Bae, et al. (2007). "Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(2): 414-421.
- Cohen, J. J. (1993). "Apoptosis." *Immunology today* **14**(3): 126-130.
- Daugas, E., C. Cande, et al. (2001). "Erythrocytes: death of a mummy." *Cell death and differentiation* **8**(12): 1131-1133.
- Decaudin, D., I. Marzo, et al. (1998). "Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review)." *International journal of oncology* **12**(1): 141-152.
- Durantou, C., S. M. Huber, et al. (2002). "Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells." *The Journal of physiology* **539**(Pt 3): 847-855.
- Ehrenkranz, J. R., N. G. Lewis, et al. (2005). "Phlorizin: a review." *Diabetes/metabolism research and reviews* **21**(1): 31-38.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology* **35**(4): 495-516.
- Escarpa, A. and M. C. Gonzalez (1998). "High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties." *Journal of chromatography. A* **823**(1-2): 331-337.
- Fischer, U., R. U. Janicke, et al. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell death and differentiation* **10**(1): 76-100.
- Foller, M., D. Bobbala, et al. (2009). "Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **24**(3-4): 133-140.

- Foller, M., S. M. Huber, et al. (2008). "Erythrocyte programmed cell death." *IUBMB life* **60**(10): 661-668.
- Foller, M., R. S. Kasinathan, et al. (2008). "TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **21**(1-3): 183-192.
- Foller, M., H. Mahmud, et al. (2010). "Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**(9): 3351-3359.
- Garg, S., J. Narula, et al. (2005). "Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target." *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**(1): 73-79.
- Gatidis, S., A. Meier, et al. (2011). "Phlorhizin protects against erythrocyte cell membrane scrambling." *Journal of agricultural and food chemistry* **59**(15): 8524-8530.
- Green, D. R. (2003). "Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system." *Immunological reviews* **193**: 5-9.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-776.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, et al. (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study." *Lancet* **342**(8878): 1007-1011.
- Hertog, M. G., D. Kromhout, et al. (1995). "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study." *Archives of internal medicine* **155**(4): 381-386.
- Hill, M. M., C. Adrain, et al. (2004). "Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes." *The EMBO journal* **23**(10): 2134-2145.
- Hoffman, J. F., W. Joiner, et al. (2003). "The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca2+-activated K+ channel (Gardos channel) in human red blood cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(12): 7366-7371.
- Jelkmann, W. (1992). "Erythropoietin: structure, control of production, and function." *Physiological reviews* **72**(2): 449-489.
- Jilani, K., S. M. Qadri, et al. (2011). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by oridonin." *Archives of biochemistry and biophysics* **511**(1-2): 14-20.

- Kahl, H. "Geschichte des Mikroskops." Retrieved 27.03.2012, from [http://www.mikroskop-museum.de/geschichte\\_17jh.htm](http://www.mikroskop-museum.de/geschichte_17jh.htm).
- Kataoka, S. and T. Tsuruo (1996). "Physician Education: Apoptosis." *The oncologist* **1**(6): 399-401.
- Keller, D. M. and W. D. Lotspeich (1959). "Effect of phlorizin on the osmotic behavior of mitochondria in isotonic sucrose." *The Journal of biological chemistry* **234**(4): 991-994.
- Kellett, G. L. and P. A. Helliwell (2000). "The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane." *The Biochemical journal* **350 Pt 1**: 155-162.
- Kempe, D. S., A. Akel, et al. (2007). "Suicidal erythrocyte death in sepsis." *Journal of molecular medicine* **85**(3): 273-281.
- Kempe, D. S., P. A. Lang, et al. (2006). "Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**(2): 368-370.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer* **26**(4): 239-257.
- Kirk, K. (2001). "Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte." *Physiological reviews* **81**(2): 495-537.
- Klarl, B. A., P. A. Lang, et al. (2006). "Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion." *American journal of physiology. Cell physiology* **290**(1): C244-253.
- Labi, V., M. Erlacher, et al. (2006). "BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy." *Cell death and differentiation* **13**(8): 1325-1338.
- Lang, E., K. Jilani, et al. (2011). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by benzethonium." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **28**(2): 347-354.
- Lang, E., S. M. Qadri, et al. (2011). "Inhibition of suicidal erythrocyte death by blebbistatin." *American journal of physiology. Cell physiology* **301**(2): C490-498.
- Lang, F. (02.04.2009). "Synopsis of Eryptosis Signaling." <http://www.physiologie.uni->

tuebingen.de/\_media/dep1/interests/eryptosis\_signaling.gif Retrieved 27.03.2012.

- Lang, F., E. Gulbins, et al. (2010). "Ceramide in suicidal death of erythrocytes." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **26**(1): 21-28.
- Lang, F., E. Gulbins, et al. (2008). "Eryptosis, a window to systemic disease." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **22**(5-6): 373-380.
- Lang, K. S., P. A. Lang, et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **15**(5): 195-202.
- Lang, K. S., S. Myssina, et al. (2004). "Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes." *Cell death and differentiation* **11**(2): 231-243.
- Lang, P. A., O. Beringer, et al. (2006). "Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome." *Journal of molecular medicine* **84**(5): 378-388.
- Lang, P. A., S. Kaiser, et al. (2003). "Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis." *American journal of physiology. Cell physiology* **285**(6): C1553-1560.
- Lang, P. A., R. S. Kasinathan, et al. (2009). "Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **24**(5-6): 415-428.
- Lang, P. A., D. S. Kempe, et al. (2005). "Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **372**(3): 228-235.
- Lang, P. A., D. S. Kempe, et al. (2005). "PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death." *Cell death and differentiation* **12**(5): 415-428.
- Lang, P. A., M. Schenck, et al. (2007). "Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide." *Nature medicine* **13**(2): 164-170.
- Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." *Journal of cell science* **118**(Pt 2): 265-267.

- Lefevre, P. G. (1961). "Sugar transport in the red blood cell: structure-activity relationships in substrates and antagonists." *Pharmacological reviews* **13**: 39-70.
- Leibowitz, B. and J. Yu (2010). "Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family." *Cancer biology & therapy* **9**(6): 417-422.
- Liu, J. J., M. Lin, et al. (2011). "Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics." *Cancer letters* **300**(2): 105-114.
- Mandal, D., A. Mazumder, et al. (2005). "Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes." *The Journal of biological chemistry* **280**(47): 39460-39467.
- Mandal, D., P. K. Moitra, et al. (2002). "Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes." *FEBS letters* **513**(2-3): 184-188.
- Masumoto, S., Y. Akimoto, et al. (2009). "Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice." *Journal of agricultural and food chemistry* **57**(11): 4651-4656.
- Matarrese, P., E. Straface, et al. (2005). "Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**(3): 416-418.
- McMahon, T. J., R. E. Moon, et al. (2002). "Nitric oxide in the human respiratory cycle." *Nature medicine* **8**(7): 711-717.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* **114**(2): 181-190.
- Miramar, M. D., P. Costantini, et al. (2001). "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *The Journal of biological chemistry* **276**(19): 16391-16398.
- Movius, E. G., M. M. Phyllaier, et al. (1989). "Phloretin inhibits cellular uptake and nuclear receptor binding of triiodothyronine in human hep G2 hepatocarcinoma cells." *Endocrinology* **124**(4): 1988-1997.
- Myssina, S., S. M. Huber, et al. (2003). "Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **14**(11): 2750-2757.
- Niemoeller, O. M., M. Foller, et al. (2008). "Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death." *Cellular physiology and biochemistry : international*

journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology **21**(1-3): 193-202.

Niemoeller, O. M., V. Kiedaisch, et al. (2006). "Stimulation of eryptosis by aluminium ions." *Toxicology and applied pharmacology* **217**(2): 168-175.

Nishizaki, T., A. Kammesheidt, et al. (1995). "A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels." *Neuroscience research* **22**(1): 13-22.

Oku, A., K. Ueta, et al. (1999). "T-1095, an inhibitor of renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes." *Diabetes* **48**(9): 1794-1800.

Panayotova-Heiermann, M., D. D. Loo, et al. (1995). "Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter." *The Journal of biological chemistry* **270**(45): 27099-27105.

Perez Lopez, G., O. Gonzalez Albarran, et al. (2010). "[Sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors (SGLT2): from familial renal glucosuria to the treatment of type 2 diabetes mellitus]." *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **30**(6): 618-625.

Rao, R. V., K. S. Poksay, et al. (2004). "Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress." *The Journal of biological chemistry* **279**(1): 177-187.

Ravi, R., G. C. Bedi, et al. (2001). "Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB." *Nature cell biology* **3**(4): 409-416.

Ridgway, T. and G. Tucker (1997). "Phloridzin derivatives; food additives/chemopreventative drugs of the future." *Biochemical Society transactions* **25**(1): 109S.

Robak, J. and R. J. Gryglewski (1988). "Flavonoids are scavengers of superoxide anions." *Biochemical pharmacology* **37**(5): 837-841.

Rousalova, I. and E. Krepela (2010). "Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review)." *International journal of oncology* **37**(6): 1361-1378.

Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**(6): 401-410.

Scheepers, A., H. G. Joost, et al. (2004). "The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function." *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* **28**(5): 364-371.

- Sheridan, C. and S. J. Martin (2010). "Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis." *Mitochondrion* **10**(6): 640-648.
- Slee, E. A., M. T. Harte, et al. (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *The Journal of cell biology* **144**(2): 281-292.
- Sopjani, M., M. Foller, et al. (2008). "Gold stimulates Ca<sup>2+</sup> entry into and subsequent suicidal death of erythrocytes." *Toxicology* **244**(2-3): 271-279.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, et al. (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(15): 8662-8667.
- Takii, H., K. Matsumoto, et al. (1997). "Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **61**(9): 1531-1535.
- von Mering, J. (1886). "Über künstlichen Diabetes." *Centralblatt f. Medizinische Wissenschaft* **xxii**(531).
- Yau, P. (2004). Apoptosis. *The Science Creative Quarterly*.
- Yu, J. W. and Y. Shi (2008). "FLIP and the death effector domain family." *Oncogene* **27**(48): 6216-6227.
- Zappulla, D. (2008). "Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO<sub>2</sub> increases?" *Journal of the cardiometabolic syndrome* **3**(1): 30-34.
- Zhang, Y., D. Xing, et al. (2009). "PUMA promotes Bax translocation by both directly interacting with Bax and by competitive binding to Bcl-X L during UV-induced apoptosis." *Molecular biology of the cell* **20**(13): 3077-3087.



## 10 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Gatidis, S., **A. Meier**, et al. (2011). "Phlorhizin Protects against Erythrocyte Cell Membrane Scrambling." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(15): 8524-8530.

## Danksagung

Ich möchte mich zuletzt bei den Personen bedanken, die es mir ermöglicht haben, über dieses interessante Thema zu promovieren.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Florian Lang, der mir die Möglichkeit gegeben hat, im Physiologischen Institut der Universität Tübingen in einem tollen Team zu promovieren, und mir bereitwillig das Thema zur Verfügung gestellt hat.

I would like to thank Syed M. Qadri very much, who never got tired of explaining and who made my time in the institute truly interesting.

Außerdem möchte ich mich bei Elisabeth Lang bedanken, die sich viel Zeit für mich genommen und mich im Labor willkommen geheißen hat.

Ein besonderer Dank geht an Doris Schneider, die mir trotz eigener chronischer Zeitknappheit so viel Zeit geschenkt und mich stets kritisch bewertet hat.

Ebenso gilt meine Dankbarkeit Hans-Guido Holl, der nie die Geduld verloren hat. Danke für deine Kritik, deine Ermutigung und deine Unterstützung.

Ohne die Hilfe von Sibylle von Schneider-Holl, Christoph Grabenbauer und Lucas Bettac wäre meine Dissertation heute nicht das, was sie ist. Vielen Dank für die Unterstützung.

Furthermore thanks to my colleagues and friends of the physiological institute: Christine Zelenak, Kawsif Jilani, Carlos Muñoz, Michael Föllner, Patrick Münzer, Majed Abed, Syeda Tasneem Towhid and Oliver Borst.

Danke auch an meine Freundinnen Jennifer Rapp, Maria Fischer, Maria Suchy und Salome Fischer die mir den nötigen Ausgleich geben.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Robert und Brigitte Meier, und meiner Schwester Angela Meier bedanken, dass sie immer für mich da sind, immer an mich glauben. Ohne sie wäre all das nicht möglich gewesen. Ich kann mir keine bessere Familie vorstellen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Anja Doris Meier
Geburtsdatum	24.05.1988
Geburtsort	Sonthofen

## Schulische Ausbildung

1994 - 1998	Pestalozzischule Gerlingen
1998 - 2004	Gymnasium Gerlingen
2004 - 2007	Deutsche Schule London
Juni 2007	Abitur an der Deutschen Schule London

## Akademische Ausbildung

April 2008	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
17.03.2009	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Note: 1,3)
06.10.2010	Zahnärztliche Vorprüfung (Note: 1,75)
Dezember 2010 – April 2011	Wissenschaftliche Tätigkeit im Erythrozytenlabor des Physiologischen Instituts der Universität Tübingen unter der Leitung von Professor Dr. F. Lang
29.11.2013	Zahnärztliche Prüfung (Note: sehr gut)