

**Der Einfluss von Phloretin 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

Fischer, Salome Hannah

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Mörike

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Erythrozyten	3
2.2 Apoptose	5
2.2.1 Definition	5
2.2.2 Morphologie der Apoptose	6
2.2.3 Molekulare Mechanismen der Apoptose.....	8
2.2.3.1 Der extrinsische Signalweg	8
2.2.3.2 Der intrinsische Signalweg	10
2.2.3.3 Der alternative intrinsische Signalweg	13
2.2.3.4 Der Granzym B – Signalweg	15
2.2.4 Regulationsmechanismen der Apoptose	17
2.2.4.1 Angriffspunkt: extrinsischer Signalweg	17
2.2.4.2 Angriffspunkt: intrinsischer Signalweg.....	18
2.2.4.3 Apoptose-Inhibitoren, Smac/Diablo und Htr2A/Omi.....	19
2.2.4.4 Die Rolle von Ceramid in der Regulation der Apoptose	20
2.2.5 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus.....	22
2.3 Eryptose	23
2.3.1 Signalwege der Eryptose	24
2.3.2 Regulationsmöglichkeiten der Eryptose	27
2.3.3 Bedeutung der Eryptose	28
2.4 Phloretin	31
2.4.1 Flavonoide.....	31
2.4.2 Allgemeine Bedeutung von Flavonoiden für den Organismus	34
2.4.3 Phloretin	35
2.4.4 Der Einfluss von Phloretin auf den zellulären Glukosetransport	36
2.4.5 Spezielle Bedeutung von Phloretin für den Organismus und sein pharmakologisches Potential.....	37
3 Zielsetzung der Dissertation	38
4 Materialien und Methoden	39
4.1 Erythrozyten	39
4.2 Durchflusszytometrie – Die FACS-Analyse	40
4.3 Verwendete Substanzen und die mit ihnen durchgeführten Untersuchungen..	42
4.3.1 Phloretin	42
4.3.2 Annexin V FITC – Die Messung der Phosphatidylserinexposition	42
4.3.3 Fluo-3 AM Ester – Die Messung des intrazellulären Calciums	43
4.3.4 Monoklonale Antikörper - Die Messung von Ceramid.....	44
4.3.5 ATP – Die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration	44
4.3.6 Ionomycin	46
4.3.7 Amitriptylin und Zoledron-Säure	46
4.3.8 SB203580.....	48
4.3.9 Staurosporin	48
4.4 Verwendete Lösungen.....	49

4.4.1 Ringer Lösung	49
4.4.2 Glucose-freie Ringerlösung.....	50
4.4.3 Hypertone Lösung.....	51
4.4.4 Waschpuffer für Annexin und Fluo-3/AM	51
4.4.5 Phosphate Buffered Saline (PBS)	52
4.6 Statistik.....	53
5 Ergebnisse	54
5.1 Annexin V – Die Bindung von Phosphatidylserin	54
5.2 Forward Scatter – Ermittlung der Zellgröße	55
5.3 Messung des intrazellulären Calciums	56
5.4 Messung der Ceramid-Häufigkeit	58
5.5 Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase	61
5.6 Proteinkinase C	62
5.7 Messung des ATP-Gehalts	64
6 Diskussion.....	66
6.1 Methodendiskussion	66
6.2 Ergebnisdiskussion.....	67
7 Zusammenfassung	72
8 Literaturverzeichnis.....	74
9 Veröffentlichungen	89
Erklärung zum Eigenanteil.....	90
Danksagung	91
Lebenslauf.....	93

Abkürzungsverzeichnis

A1/Bfl1 - Bcl-2-related protein A1
AIF - apoptosis inducing factor
AMP - Adenosinmonophosphat
AMPK - AMP activated kinase
ANT - Adenine Nucleotide Translocator
Apaf-1 - apoptosis-activating factor- 1
APLT - Aminophospholipidtranslokase
ATF - Activating transcription factor
ATP - Adenosintri-phosphat
Bad - B-cell-associated death promoter
BAK - Bcl-2 homologous antagonist killer
Bap31 - B-cell receptor-associated protein 31
BAX - Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 - B-cell-lymphoma 2
Bcl-Xl - B-cell-lymphoma extra large
BID - BH3 interacting-domain death agonist
BIM - Bcl-2 like protein 11
BIK - Bcl-2-interacting killer
BiP - Binding immunoglobulin protein
BIR - Baculovirus IAP repeat
BH3 - Bcl-2 homology domain 3
BOK - Bcl-2 related ovarian killer
BRUCE - baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
 containing ubiquitin-conjugating enzyme
Ca - Calcium
CAD - caspaseaktivierte Desoxyribonuclease
CARD - caspase activation and recruitment domain
CD95 - Cluster of differentiation 95
cIAP - Baculoviral IAP repeat-containing protein
Cl - Chlor
CO₂ - Kohlendioxid
COX - Cyclooxygenasen

CrmA - cytokine response modifier A
DD - Death Domain
DED - Death effector domain
DIABLO - Direct IAP binding protein with Low PI
DISC - death inducing signaling complex
DMSO - Dimethylsulfoxid
DNA - Desoxyribonukleinsäure
DR - Death Receptor
EDAR - Ectodysplasin A receptor
EGCG - Epigallocatechingallat
EIPA - ethyl-isopropyl amiloride
EPO - Erythropoetin
ER - endoplasmatische Retikulum
FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD - Fas-associated death domain
Fe - Ferrum
FLIP - FLICE inhibitor protein
GLUT - Glucose transporter
GPDH - Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H - Hydrogenium
H₂CO₃ - Kohlensäure
Hepes - N-2- Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV - Human immunodeficiency virus
HRK - Activator of apoptosis harakiri
IAP - Inhibitor of apoptosis protein
ILP2 - insulin-like peptide 2
Ire-1 - Inositol-requiring Enzyme 1
JAK 3 - Janus kinase 3
JNK - cJUN NH₂-terminal-Kinase
K - Kalium
KH₂PO₄ - Kaliumdihydrogenphosphat
LPH - Lactat-Phlorizin-Hydrolase
MAP - mitogen-activated protein
Mcl-1 - Myeloid cell leukemia sequence 1

ML-IAP - Melanoma inhibitor of apoptosis
Na - Natrium
NAC - N-Acetylcystein
NADH - Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH - Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na₂HPO₄ - Dinatriumhydrogenphosphat
NAIP - Neuronal apoptosis inhibitor protein
NGFR - Nerve growth factor receptor
NF-κB - nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO - Stickoxid
O₂ - Sauerstoff
PAF - platelet activating factor
PARP - Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS - Phosphate buffered saline
PERK - Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PGE₂ - Prostaglandin₂
PKC - Proteinkinase C
PTP - permeability transition pores
Raf-1 - RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
SGLT - sodium-glucose linked transporter
Smac - second mitochondria-derived activator of caspases
SRPK - stress-activated protein kinases
tbid - truncated bid
TNFR - Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAF - TNF-receptor associated factor
UPR - unfolded protein response
VDAC - voltage-dependent anion channel
XIAP - X-linked Inhibitor of apoptosis protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie der Apoptose.....	7
Abbildung 2: Signalwege des programmierten Zelltodes	12
Abbildung 3: Mechanismen der Unfolded Protein Response	15
Abbildung 4: Granzym B - Signalkaskade	16
Abbildung 5: Allgemeine Struktur von Sphingosin und Ceramid	21
Abbildung 6: Signalwege der Eryptose.....	26
Abbildung 7: Struktur von Flavonoiden.....	31
Abbildung 8: Das Aglykon Phloretin und sein Glykosid Phlorizin	35
Abbildung 9: Die Funktion von GLUT2 und SGLT1 am Beispiel eines Erythrozyten	36
Abbildung 10: Strukturformel von ATP	44
Abbildung 11: Strukturformel von Ionomycin	46
Abbildung 12: Zoledronsäure.....	47
Abbildung 13: Amitriptylin	47
Abbildung 14: Strukturformel von SB203580.....	48
Abbildung 15: Strukturformel von Staurosporin	49
Abbildung 16: Effekt von Phloretin auf die Phosphatidylserin-Exposition.....	54
Abbildung 17: Effekt auf den erythrozytären Forward Scatter	55
Abbildung 18a: Effekt von Phloretin auf die erythrozytäre Ca-Aktivität	56
Abbildung 18b: Arithmetisches Mittel der Fluo3-Fluoreszenz.....	57
Abbildung 19: -Calcium/+Calcium.....	57
Abbildung 20: Effekt von Phloretin auf das Verhalten von Ceramid	58
Abbildung 21: Ceramid-Häufigkeit	59
Abbildung 22: Phosphatidylserin-Exposition mit Inhibitoren	60
Abbildung 23: Annexin-V-Bindung.....	61
Abbildung 24: Positivkontrolle hyperosmotischer Schock	62
Abbildung 25: Annexin-V-Bindung mit Staurosporin.....	63
Abbildung 26: Positivkontrolle Glucoseentzug.....	63
Abbildung 27: ATP-Standardkurve	64
Abbildung 28: Effekt von Phloretin auf die ATP-Konzentration von Erythrozyten	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Flavonoide (mod. nach Manach, 2004)	33
Tabelle 2: Zusammensetzung der Ringer-Lösung.....	50
Tabelle 3: Zusammensetzung Glucose-freie Ringer-Lösung	51
Tabelle 4: Zusammensetzung des Waschpuffers.....	52
Tabelle 5: Zusammensetzung PBS	52

1 Einleitung

Allen Kulturkreisen ist durch alle Jahrhunderte hindurch gemein, dass dem Blut eine hohe Bedeutung zugemessen wird. Dies spiegelte sich in Religion, Kunst und Kultur auf vielerlei Art und Weise wieder.

Dank des Fortschritts von Wissenschaft und Technik weiß man heute, dass Blut aus vielen verschiedenen Bestandteilen zusammen gesetzt ist. Als zelluläre Bestandteile des Blutes unterscheidet man Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Diese Blutzellen unterliegen einem ständigen Kreislauf aus Proliferation, Differenzierung und Apoptose, der die optimale Funktion jedes einzelnen Mitglieds der Zellgemeinschaft garantiert. So haben unterschiedliche Zellen eine unterschiedliche Lebensdauer. Hautzellen leben beispielsweise etwa zwanzig Tage, die Zotten der Darmwand erneuern alle drei bis fünf Tage ihre Zellen, manche weißen Blutkörperchen überstehen nur wenige Minuten. Durch Apoptose werden die verbrauchten Zellen kontrolliert abgebaut und durch Proliferation und Differenzierung werden sie ersetzt. Aber auch entartete Zellen werden ausgesondert und solche, die ihre Aufgaben unzureichend erfüllen. Dies beugt der Entstehung von Krebs und Autoimmunerkrankungen vor. Das Leben ist ohne die Abläufe des suizidalen Zelltods unmöglich. Denn schon die Grundlage des Lebens, die Embryonalentwicklung, wird unter anderem durch die Apoptose gesteuert.

Der programmierte Zelltod wurde 1962 zufällig von John Kerr entdeckt und 1972 veröffentlichte dieser zusammen mit Andrew Wyllie und Alastair Currie seine Beobachtungen erstmals. Sie prägten auch den Begriff der Apoptose. Der Begriff entstammt dem Griechischen („apo“ für „weg“ und „ptosis“ für „Fall“). Die Autoren dachten dabei an Blätter, die im Herbst von den Bäumen fallen.

Man erkannte die Bedeutung, die Zellorganellen wie der Zellkern oder das Mitochondrium für die Apoptose haben und ging deshalb lange Zeit davon aus, dass deren Vorhandensein eine Grundvoraussetzung für die Apoptose sei. Da Erythrozyten weder einen Zellkern noch ein Mitochondrium aufweisen, ging man bis vor wenigen Jahren davon aus, dass sie nicht zum Suizid in der Lage seien, sondern in Leber und Milz aussortiert würden. 2001 veröffentlichten Bratosin et al. aber Ergebnisse die belegten, dass auch Erythrozyten zum programmierten Zelltod in der Lage sind. Lang et al. prägten 2005 schließlich den Begriff der Eryptose.

Dies eröffnete die theoretische Möglichkeit der pharmakologischen Intervention bezüglich der Lebensdauer der roten Blutzellen und brachte der Eryptose großes Forschungsinteresse ein. Heute sind viele Inhibitoren und Verstärker bekannt, die an unterschiedlichen Punkten der Signalkaskade ihre Wirkung entfalten.

Die folgende Arbeit soll die Wirkung von Phloretin auf Erythrozyten untersuchen.

2 Grundlagen

2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten sind die roten Zellen des Blutes. Ein erwachsener Mensch hat abhängig von seinem Geschlecht $4,0 - 6,2 \times 10^6$ Erythrozyten pro μl Blut. Sie sind für den Transport von Blutgasen verantwortlich. Dabei transportieren sie vor allem Sauerstoff, aber auch ein Teil des Kohlendioxidtransports gehört zu ihren Aufgaben. Zudem sorgen sie auch die Aufrechterhaltung des pH-Wertes des Blutes.

Um die Erfüllung ihrer Aufgaben zu gewährleisten, verfügen Erythrozyten über einen speziellen Aufbau. Sie müssen den Sauerstoff selbst in die kleinsten Kapillaren unseres Körpers transportieren, die teilweise nur einen Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ aufweisen. Dies gelingt ihnen bei einer Größe von ca. $7,5 \mu\text{m}$ durch eine hohe passive Verformbarkeit. Sie sind normalerweise elliptisch und bikonkav. Dies bietet den Vorteil einer großen Oberfläche und einer kurzen Diffusionsstrecke der Blutgase zum Hämoglobin. Dieses macht ein Drittel des Feuchtgewichts von Erythrozyten aus und hat damit auch einen großen Einfluss auf dessen mechanische Eigenschaften. Ist sein Aufbau gestört, kann auch die Verformbarkeit der betroffenen roten Blutkörperchen beeinträchtigt sein (Basiswissen Physiologie, Lang+Lang).

Das Hämoglobin ist für den CO_2 - und Sauerstofftransport zuständig. Dabei wird Sauerstoff in der Lunge reversibel an das zentrale Fe^{2+} -Ion des Hämoglobins gebunden. Hämoglobin besitzt vier Häm-Moleküle mit reduziertem Eisen (Fe^{2+}). Im Zusammenspiel mit vier Globinproteinen ist es in der Lage, je nach Sauerstoffpartialdruck, bis zu vier Sauerstoffmoleküle aufzunehmen. Anschließend wird der Sauerstoff im übrigen Körpergewebe wieder abgegeben. Hier herrscht ein geringerer Sauerstoff-Partialdruck als im Blut (Perutz, 1969). Der Gasaustausch im Blut verläuft passiv durch Diffusion entlang bestehender Partialdruckgradienten. Von Bereichen mit hohem Partialdruck wandern die Gase zu Bereichen mit niedrigerem Partialdruck, im Bestreben ein Gleichgewicht herzustellen.

Die im Erythrozyten vorhandene Carbonanhydrase sorgt für eine schnelle Umwandlung des CO_2 in H_2CO_3 , weshalb CO_2 in erheblich größerem Maße als O_2 im Blutplasma gelöst und auf diesem Weg transportiert werden kann. H_2CO_3 dissoziiert rasch und da die Membran von Erythrozyten für Kationen, das heißt auch

für Protonen, wenig durchlässig ist, verbleibt H^+ in der Zelle und wird unter diesen Bedingungen verstärkt an das Hämoglobin gebunden und so gepuffert. Das gebildete HCO_3^- hingegen verlässt größtenteils im Austausch gegen Chlorid die Zelle. Nur ein kleiner Teil (10-20 %) wird an das Hämoglobin gebunden. Bei höherem Sauerstoffdruck kehren sich die Vorgänge um und auch das gebundene CO_2 wird wieder gelöst. Der Erythrozyt erfüllt so neben dem Transport der Atemgase auch die Funktion der pH-Regulation (Hermle, 2007).

Der strukturelle Aufbau der Erythrozyten bedingt dessen außergewöhnliche Eigenschaften. Das Membranskelett besteht aus einem Netz von Spektrin-Filamenten, die durch Aktin-Filamente zusammengehalten und durch Adapterproteine wie β -Spektrin, Ankyrin, Bande 3-Protein und Glykophorin C an der Plasmamembran verankert werden (Basiswissen Physiologie, Lang+Lang).

Dieser Aufbau spielt auch beim Aussortieren altersschwacher Erythrozyten eine Rolle. Das Membranskelett verliert mit steigendem Alter der Zelle an Elastizität. Gesunde, junge Erythrozyten sind beim Durchstrom durch die Milz in der Lage durch deren Endothelspalten zu gelangen. Gealterte Erythrozyten, mit herabgesetzter Verformbarkeit, bleiben hier stecken und werden anschließend von Makrophagen abgebaut. Weitere Abbauorte sind Knochenmark und Leber. Hier erfolgt die Eliminierung der altersschwachen Blutkörperchen durch eine Veränderung ihrer Stoffwechselforgänge (Basiswissen Physiologie, Lang+Lang).

Die überwiegende Energiequelle von Erythrozyten stellt die Glykolyse dar. Der Pentosephosphatzyklus stellt Redoxäquivalente in Form von NADPH zur Verfügung. Über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) und Glutathion kann sich der Erythrozyt so gegen oxidativen Stress schützen (Bossi und Giardina, 1996). Bei einer Zelle voll gebundenem Sauerstoff ohne die Fähigkeit zur Neubildung eventuell beschädigter Proteine hat dies wegen der Radikalentstehung besondere Bedeutung (Hermle, 2007). Die für diese Vorgänge vom Erythrozyten benötigten Enzyme können im alternden Erythrozyt aufgrund des Mangels von Zellkern und Zellorganellen nicht nachgebildet werden und so kommt es mit der Zeit zu einem Mangel an ATP, NADH und NADPH. Die dem Mangel nachfolgende Umstrukturierung von Membranproteinen führt zur Bindung von Autoantikörpern, die Makrophagen aktivieren und so die Phagozytose einleiten [Bosman et al., 2005]. Ein durchschnittlicher Erythrozyt lebt 100-120 Tage, bevor es auf diese Art zu einer Eliminierung kommt.

Die oben genannten Bande 3-Proteine sind als Austauscher für intrazelluläres Bikarbonat gegen extrazelluläres Chlorid dafür verantwortlich, dass die Erythrozytenmembran für Anionen um ein vielfaches permeabler ist als für Kationen. Dies, und die Aktivität der Na⁺ /K⁺ -ATPase, ist der Grund, weshalb sich bei Erythrozyten ein Membranpotenzial von ca. -10mV einstellt (Basiswissen Physiologie, Lang+Lang).

2.2 Apoptose

2.2.1 Definition

Der Begriff Apoptose bezeichnet den programmierten, suizidalen Zelltod. Ihm liegt ein genetisch fixiertes Programm zu Grunde. Es ist davon auszugehen, dass nahezu alle mehrzelligen Organismen zu programmiertem Zelltod in der Lage sind (Huettenbrenner et al., 2003). Dieser wird ausgelöst, wenn die Zelle infiziert, nicht richtig entwickelt, beschädigt ist oder nicht mehr länger benötigt wird (Green 2003). Als Auslöser können neben Altersschwäche und pathologischen Stimuli auch physiologische Vorgänge in Frage kommen.

Mit Hilfe des programmierten Zelltodes wird im Körper die Ausdehnung von Gewebe neben der Zellgröße auch über dessen Zellzahl gesteuert, es werden unerwünschte oder unnötige Zellen (zum Beispiel in der Embryonalentwicklung) sowie kranke Zellen (Tumorzellen, virusinfizierte oder Zellen mit irreparabel geschädigter DNA) entfernt (Jacobson, 1997).

2.2.2 Morphologie der Apoptose

Die Apoptose von kernhaltigen Zellen ist gekennzeichnet durch eine Reihe spezifischer Abläufe. Zuerst gliedert sich die Zelle aus dem Zellverband aus, sie schrumpft. Anschließend kommt es zu einer Zellkernschrumpfung mit Chromatinkondensation in Zellkernnähe. Dieser Vorgang wird als Karyopyknose bezeichnet. Es folgt eine Fragmentierung der DNA. Zellorganellen behalten bei diesen Vorgängen ihre Form bei (Kataoka and Tsuruo 1996).

Anschließend kommt es zu Veränderungen in der Zellmembran, die zur Ausstülpung von Zytoplasmafragmenten und deren Abschnürung führen. In Ihnen sind zum Teil pyknotische Kernfragmente zu finden. Diese Vesikel werden auch als Apoptosekörperchen oder apoptotic bodies bezeichnet, die Erscheinung wird „membrane blebbing“ genannt (Kataoka and Tsuruo 1996). Nach diesem Muster definierten Kerr et al. bereits 1972 die Abläufe der Apoptose. Die Apoptosekörperchen werden nun durch Makrophagen eliminiert. Diese erkennen apoptotische Zellen an deren Oberflächenmembran. Hier exponieren betroffene Zellen vermehrt Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das bei gesunden, eukaryontischen Zellen auf der Innenseite der Zellenmembran zu finden ist. Phosphatidylserinexposition dient so als Signal für Makrophagen, die Phagozytose und den lysosomalen Abbau einzuleiten (Chaurio, Janko et al. 2009).

Diese Art der Zelleliminierung hat den großen Vorteil, dass die Zellmembran der zu eliminierenden Zelle unversehrt bleibt. Hierdurch kommt es zu keinem Austritt von Zellbestandteilen in den Extrazellularraum, was eine Entzündungsreaktion zur Folge hätte. Zusätzlich setzen Makrophagen Cytokine wie beispielsweise Interleukin-10 und Wachstumsfaktor- β frei, die eine antiinflammatorische Wirkung haben (Suerbaum et al., 2012).

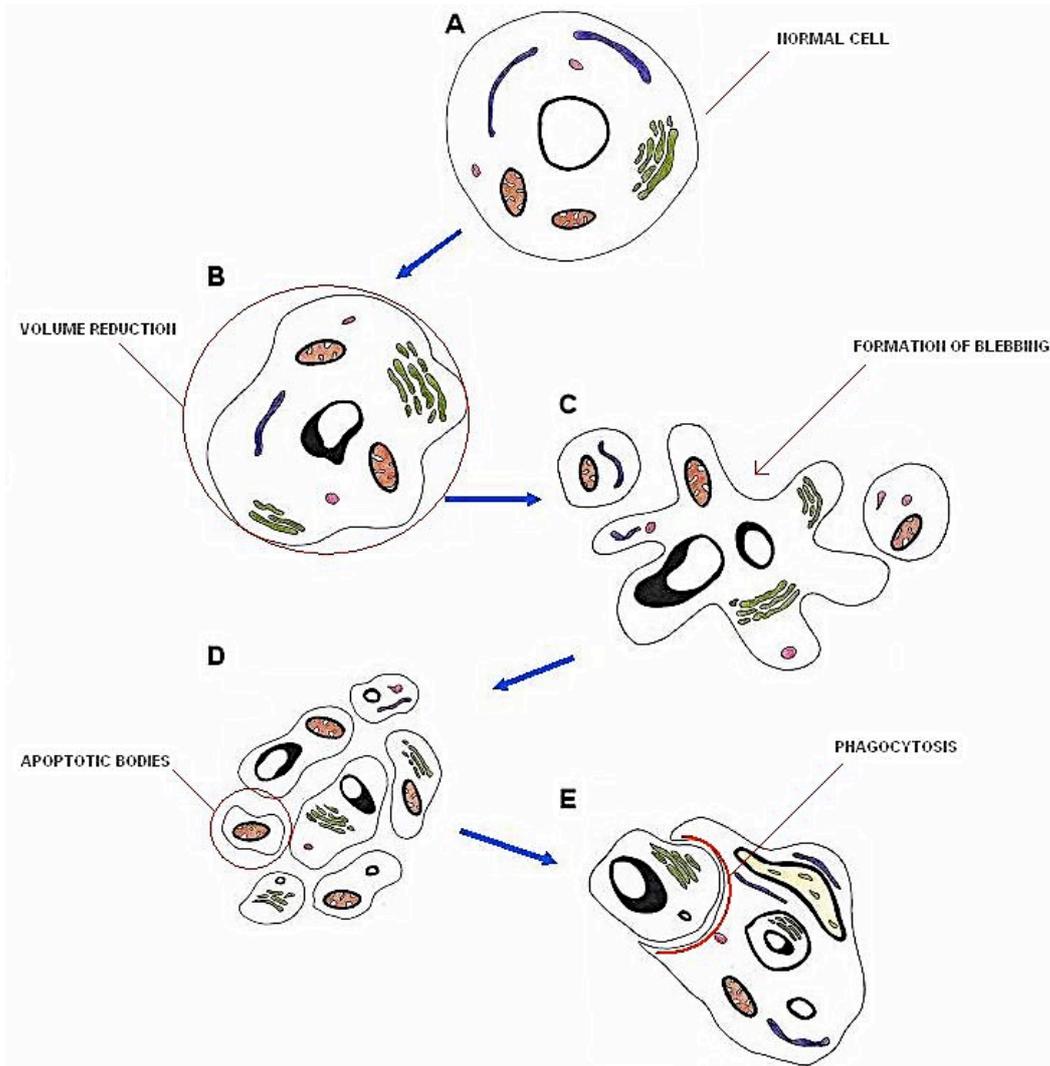


Abbildung 1: Morphologie der Apoptose (Cell Biology Wiki)

2.2.3 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Im Allgemeinen werden zwei Hauptwege unterschieden, die beide jeweils zur Aktivierung spezifischer Proteasen führen, den sogenannten Caspasen (Cysteiny-Aspartasen). Bis heute wurden 14 von diesen indentifiziert (Cohen, 1993), 12 davon beim Menschen. Der extrinsische Weg führt über Rezeptoren zur Einleitung des programmierten Zelltodes, der intrinsische über die Mitochondrien, die apoptotische Signale geben. Es existiert außerdem ein dritter Weg, bei dem das endoplasmatische Retikulum eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Apoptoseprogramms spielt, sowie ein vierter, bei dem Granzym B involviert ist.

Für alle vier Wege lässt sich sagen, dass sich drei Stadien im Ablauf des programmierten Zelltodes unterscheiden lassen. Zuerst erhält die Zelle ein apoptotisches Signal. Dieses kann unterschiedlichster Gestalt sein, wie beispielsweise die Bindung eines Liganden an einen sogenannten Todesrezeptor, der Kontakt mit Chemotherapeutika, UV-Strahlung, Veränderungen in der Osmolarität, Hitze oder der Entzug von Wachstumsfaktoren oder Energie. Stadium zwei besteht aus der Signalverarbeitung. Die Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Signaltransduktionswege entscheidet an dieser Stelle über Leben und Tod der Zelle. In Stadium drei kommt es zur Caspasenaktivierung. Bedeutungsvollerweise spricht man hier auch von der Spaltung der Todesenzyme. Dabei werden die morphologischen Veränderungen herbeigeführt, die bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben wurden.

2.2.3.1 Der extrinsische Signalweg

Beim extrinsischen Signalweg führt die Ligandenbindung an Rezeptoren auf der äußeren Zellmembran zur Einleitung der apoptotischen Vorgänge. Der extrinsische Signalweg wird deshalb auch Todesrezeptor-vermittelter Signalweg genannt.

Diese Todesrezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine intrazelluläre death domain (DD) besitzen. Die für die Apoptose zuständige Gruppe von Todesrezeptoren setzt sich aus sechs Mitgliedern zusammen. TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor 1), CD95 (auch bekannt als DR2, APO-1 und Fas), DR3

(death receptor 3), DR4 (Apo-2, TRAIL-1), DR5 (TRAIL-2) und death receptor 6 (DR6) (Schulze-Osthoff et al., 1998). Für die Apoptose wichtige Rezeptoren sind außerdem EDAR (ectodysplasin A receptor) und NGFR (nerve growth factor receptor). Die oben aufgezählten Rezeptoren lassen sich weiter in zwei Untergruppen aufteilen. Die erste reagiert lediglich auf Todessignale, die zweite ist zusätzlich in der Lage Überlebenssignale zu empfangen und an die Zelle weiter zu geben.

CD95 gehört gemeinsam mit DR4 und DR5 zur ersten Untergruppe. CD95 zählt zu den am besten erforschten Rezeptoren. Deshalb soll hier nun seine Funktion, beispielhaft für die anderen Mitglieder seiner Untergruppe, erläutert werden.

Um eine Zelle zur Apoptose zu stimulieren, muss ein CD95-Ligand (CD95-L) an den transmembranären CD95-Rezeptor binden. Es entsteht ein sogenannter Todeskomplex. Der zytoplasmatische Anteil des CD95-Rezeptors bildet nun einen Komplex mit dem Adaptorprotein FADD (fas-associated death domain). FADD enthält eine sogenannte death domain (DD), sowie eine Todeseffektordomäne (DED). Mit der DD bindet es an den Rezeptor und über die DED wird die Verbindung zu Procaspase-8 oder -10 vermittelt. So wird die Verbindung zwischen dem transmembranären Rezeptor und der intrazellulären Signalkette geschaffen (Grunert, 2011). In seiner Gesamtheit wird dieser oligomere Aktivatorkomplex auch death inducing signaling complex (DISC) genannt, bestehend aus Fas-Rezeptor, FADD und Pro-Form der Caspase-8 oder -10 (Sprick et al, 2002). Durch diese Komplexbildung wird die Caspase-8 aktiviert (Medema et al., 1997).

Von hier an lassen sich zwei Zelltypen unterscheiden. In Typ1-Zellen findet eine ausgeprägte Aktivierung von Caspase-8 statt. Diese ist in der Lage die Caspasen-3, -6 und -7 zu aktivieren. Caspase-3 führt über die Spaltung von Strukturproteinen (Laminin, Actin), die Spaltung von DNA-Reparaturenzymen (PARP) und Endonukleasen-vermittelter DNA-Fragmentierung zu der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Morphologie des programmierten Zelltods.

Typ2-Zellen verfügen über eine geringe Menge an aktivierter Caspase-8. Hier wird nun der mitochondriale Apoptoseweg eingeschlagen, das heißt es wird der intrinsische Signalweg aktiviert. Caspase-8 spaltet Bid (BH3 interacting-domain death agonist), welches ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteine ist. Gespaltenes Bid führt als tBid (truncated bid) am Mitochondrium zur Aggregation von Bax und Bak, ebenfalls Mitglieder der Bcl-2-Familie, und dadurch zur

Porenbildung in der Mitochondrienmembran. Es kommt zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren (Cytochrom C, Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein), AIF (apoptosis inducing factor), der Serinprotease Omi/Htr2A, Endonuklease-G und Procaspase-2, -3, -8, -9 (Nguyen et al., 1993)). Es wird diskutiert, ob Bid selbst ebenfalls über porenbildende Eigenschaften verfügt (Chou et al., 1999). Die ins Zytosol gelangten Proteine aktivieren im Anschluss wiederum Caspase-3, was schließlich zum Zelltod führt.

Es existiert auch eine ligandenunabhängige Aktivierung des CD95-Signalwegs, so zum Beispiel beobachtet in Keimzellen (Hennino et al., 2001).

Zur zweiten, oben erwähnten Untergruppe gehören TNFR-1, DR3, DR6 und EDAR. Sie können neben Todes- auch Überlebenssignale an die betroffene Zelle weitergeben. In dieser Untergruppe werden zwei Komplexe gebildet. Komplex 1 liegt an der Membran und beinhaltet Rezeptor und Todesdomäne. In ihm findet sich weder FADD noch Procaspase-8. Nach Translokation ins Zytosol erfolgt die Bildung von Komplex 2. Er wird auch Traddosom genannt und besteht aus FADD, Prokaspase-8/10 und FLIPL/S. Dieser ist nun wiederum in der Lage Procaspase-8 und somit auch weitere Apoptosekaskaden zu aktivieren (Micheau and Tschopp 2003).

Die Signalwege von DR3, DR6 und EDAR wurden bisher noch nicht ausreichend untersucht.

2.2.3.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Weg wird meist ausgelöst durch von außen schädigende Einwirkungen, so beispielsweise Bestrahlung mit einhergehendem DNA-Schaden, Mangel an Wachstumsfaktoren, Azidose, UV-Licht, Hitze, Entzug von Energie oder Wachstumsfaktoren oder auch osmotischer Stress. Wie in der Beschreibung der extrinsischen Signalwege in Kapitel 2.2.3.1 bereits erwähnt, gibt es Parallelen zwischen dem Ablauf der intrinsischen Apoptoseabläufe und der Signalkaskade von Typ2-Zellen.

Beim intrinsischen Weg zum programmierten Zelltod spielen die Interaktionen von Proteinen der Bcl-2-Familie und das Mitochondrium die zentrale Rolle. Innerhalb einer ungeschädigten Zelle liegen das proapoptotische Bax und Bak gebunden an antiapoptotische Bcl-2-Proteine vor und sind dadurch inaktiviert (Labi, Erlacher et al. 2006). Vom Verhältnis zwischen diesen inaktivierenden Proteinen und Bax und Bak ist abhängig, ob es zum Tod der Zelle kommt oder ob die Zelle das von außen kommende, schädigende Signal übersteht. Unter Stress werden in der Zelle BH3-only-Proteine aktiviert. Auch sie gehören zur Bcl-2-Familie. Sie können an die inaktivierenden Effektoren binden und somit werden Bax und Bak freigegeben und aktiviert (Sheridan und Martin 2010). Durch Proteine der Bcl-2-Familie wird die Öffnung oder Schließung verschieden großer Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (Zamzami und Kroemer, 2001) veranlasst. Außerdem kommt es zur Ausbildung neuer Poren (Korsmeyer et al., 2000). Bax und Bak im Speziellen bilden durch ihre Aktivierung Oligomere und bilden so Poren in der Mitochondrienmembran. Diese werden als „permeability transition pores (PTP)“ bezeichnet. Sie bilden sich aus Komplexen der VDAC-Kanäle (voltage-dependent anion channel) in der äußeren mit den ANT-Poren (Adenine Nucleotide Translocator) in der inneren Mitochondrienmembran (Shimizu et al., 1999). Diese PTPs können außerdem durch endogene Faktoren kontrolliert werden, wie beispielsweise durch Ceramid, den intrazellulären Kalziumspiegel, amphiphatische Peptide oder das Redoxpotential (Decaudin, Marzo et al. 1998). Durch diese Poren entweichen nun Cytochrom C und Ionen, sowie die schon in Kapitel 2.2.3.1 genannten proapoptotischen Faktoren. Die unkontrollierte Passage von Ionen durch diese PTPs führt zur Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials und damit zum Ausfall der oxidativen Phosphorylierung, zur Schwellung der Matrix und zum Zerreißen der äußeren Mitochondrienmembran (Vander Heiden et al. 1997). Der Hauptspeicherort von Cytochrom C liegt zwischen innerer und äußerer Membran, besonders in den sogenannten Cristae der inneren Membran. ATP-abhängig bindet es nach seinem Entweichen ins Zytosol an Apaf-1 (apoptosis-activating factor-1) und es kommt zur Oligomerisierung. Zeitgleich wird die sogenannte CARD-Region (caspase activation and recruitment domain) demaskiert, so dass Procaspase-9 hier binden kann. Es entsteht ein heptamerer Komplex mit radiärer Anordnung von Caspase-9 (Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Dieser Komplex wird auch Apoptosom genannt. Über die Aktivierung der

Procaspasen 3, 6 und 7 kommt es so zur Aktivierung der entsprechenden Effektorcaspasen, die wiederum die Caspasen-2, -6, -8 und -10 aktivieren. So kommt es, wie bereits in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, zur Einleitung der für die Apoptose typischen Zellveränderungen.

Zuletzt soll erwähnt werden, wozu die in Kapitel 2.2.3.1 erwähnten Stoffe zuständig sind, die ebenfalls aus dem Intermembranraum des Mitochondriums freigesetzt werden:

AIF (apoptosis inducing factor) sowie Endonuklease G verursachen im Zellkern eine DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation (Miramar, Costantini et al. 2001). Das Protein Smac/DIABLO und Omi/Htr2A aktivieren weitere Caspasen in der Kaskade, ähnlich Cytochrom C.

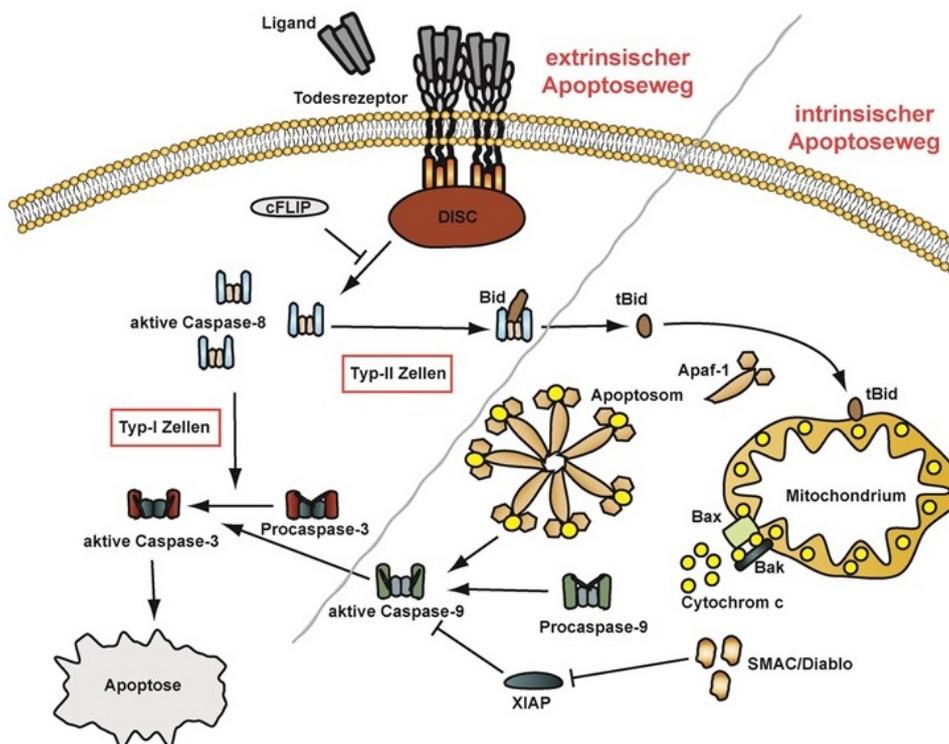


Abbildung 2: Signalwege des programmierten Zelltodes (Inst. für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg; veröffentlicht mit freundlicher Genehmigung der Universität Regensburg)

2.2.3.3 Der alternative intrinsische Signalweg

Beim alternativen intrinsischen Signalweg spielt das endoplasmatische Retikulum (ER) die Hauptrolle und es wird kein Cytochrom C und kein Apaf-1 benötigt. Das ER ist ein Zellorganell, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt, mit Ausnahme von Erythrozyten. Man unterscheidet ein raues ER, welches von Ribosomen besetzt ist, von einem glatten, welches keine Ribosomen aufweist. Ribosomen sind für die Translation während der Proteinbiosynthese erforderlich. So findet die Proteinbiosynthese an den Ribosomen statt und die Proteine werden anschließend im Inneren des ER gefaltet und modifiziert. Raues ER findet sich vorwiegend in Drüsenzellen, Leber- sowie in Nerven- und Embryonalzellen. Glattes ER spielt eine große Rolle in Stoffwechselprozessen und in der Lipidsynthese. Es ist ein Speicherort für Zellprodukte, wie beispielsweise Hormone, Glykogen oder auch Enzyme, die in Vesikeln darauf warten, freigegeben zu werden. Außerdem ist das glatte ER der Speicherort für intrazelluläres Calcium. Die Calcium-Konzentration im ER liegt zwischen 10^{-4} M und 10^{-3} M und ist damit 1000 bis 10.000 mal so hoch wie im Zytoplasma (Robert et al., 1998). Die Regulation der Calcium-Ionenhomöostase innerhalb der Zelle, sowie die regulierte Calcium-Freigabe aus dem ER zum Zwecke der Signaltransduktion, gehören zu den wichtigsten Aufgaben des ER. So ist zum Beispiel die korrekte Faltung von Proteinen von der hohen Calcium-Konzentration im ER abhängig. Die Calcium-Freigabe aus dem ER geschieht durch Ligand-gesteuerte Calcium-Kanäle, den IP_3 -Kanal und den Ryanodin-Kanal (Basiswissen Physiologie, F. Lang; Mengesdorf, 2002).

Kommt es nun zu Unregelmäßigkeiten in der Calcium-Ionenhomöostase oder erkennt die Zelle eine vermehrte Produktion falsch gefalteter Proteine, löst dies Stress innerhalb dieser Zelle aus. Eine zentrale Rolle bei der Erkennung fehlerhafter Proteinfaltung und der Reaktion hierauf spielt das ER-Chaperone BiP. Chaperone sind Proteine, die die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen gewährleisten. BiP dient als Messfühler und aktiviert, bei einer zu hohen Proteinlast (z.B. bei einem Virus) oder bei fehlerhafter Faltung der Proteine, die Proteinkinasen Ire1 (Inositol-requiring Enzyme 1) und PERK (Protein Kinase RNA - like Endoplasmic Reticulum Kinase). Beide sind Transmembran-Proteinkinasen. Außerdem wird der Transkriptionsfaktor ATF6 (Activating

Transcription Factor 6) aktiviert. BiP (Binding immunoglobulin protein) liegt normalerweise an PERK und Ire1 gebunden vor und inaktiviert diese. Kommt es zu Stress des endoplasmatischen Retikulums, löst sich BiP und gibt somit die beiden Proteinkinasen frei (Bertolotti, 2000). Eine weitere Theorie besagt, dass Ire1 auch direkt durch fehlgefaltete Proteine aktiviert werden kann (Bernales, 2006). PERK, Ire1 und ATF6 lösen so eine Stressantwort aus, die sogenannte UPR (unfolded protein response), die sich in einer Hemmung der gesamten Proteinsynthese dieser Zelle äußert (Prostko et al. 1992). Das Ziel der UPR ist es, die physiologischen Zustände wieder herzustellen. Neben der Verminderung der Proteinsynthese findet eine Erhöhung der Expression der ER-Chaperone statt, die für die Proteinfaltung zuständig sind, und eine Erhöhung der Protein-Translokation aus dem ER in das Zytoplasma (ERAD). Wenn die ER-Homöostase nicht wieder hergestellt werden kann, wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Durch diesen Ablauf wird die Proteinqualität sichergestellt.

Kommt es nicht zu einer Reduzierung von Stress auf das ER, kommt es zur Apoptose. Dies kann über 3 Wege erfolgen:

1. Erhöht sich der Calcium-Spiegel im Zytosol wird m-Calpain aktiviert. Dieses wiederum aktiviert Caspase-12. Caspase-12 führt, unabhängig von Apaf-1, zur Aktivierung von Caspase-9, welche schließlich wieder Caspase-3 aktiviert (Shiraishi et al., 2006).
2. Das Protein CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein) wird aktiviert.
3. Die cJUN NH2-terminal-Kinase (JNK) wird aktiviert.

Auch Wege 2 und 3 enden in der Aktivierung von Caspase-3 (Oyadomari, 2004).

Zur fehlerhaften Faltung von Proteinen kommt es zum Beispiel durch Mutation oder auch durch Zellgifte, wie beispielsweise Tunicamycin und Thapsigargin (Zhang et al., 2014).

Dauerhafter ER-Stress lässt sich mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang bringen, so beispielsweise mit Diabetes Mellitus einschließlich der Entwicklung von Insulinresistenz und Inselzelldepletion, mit Lebererkrankungen, mit neuroendokrinen Erkrankungen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

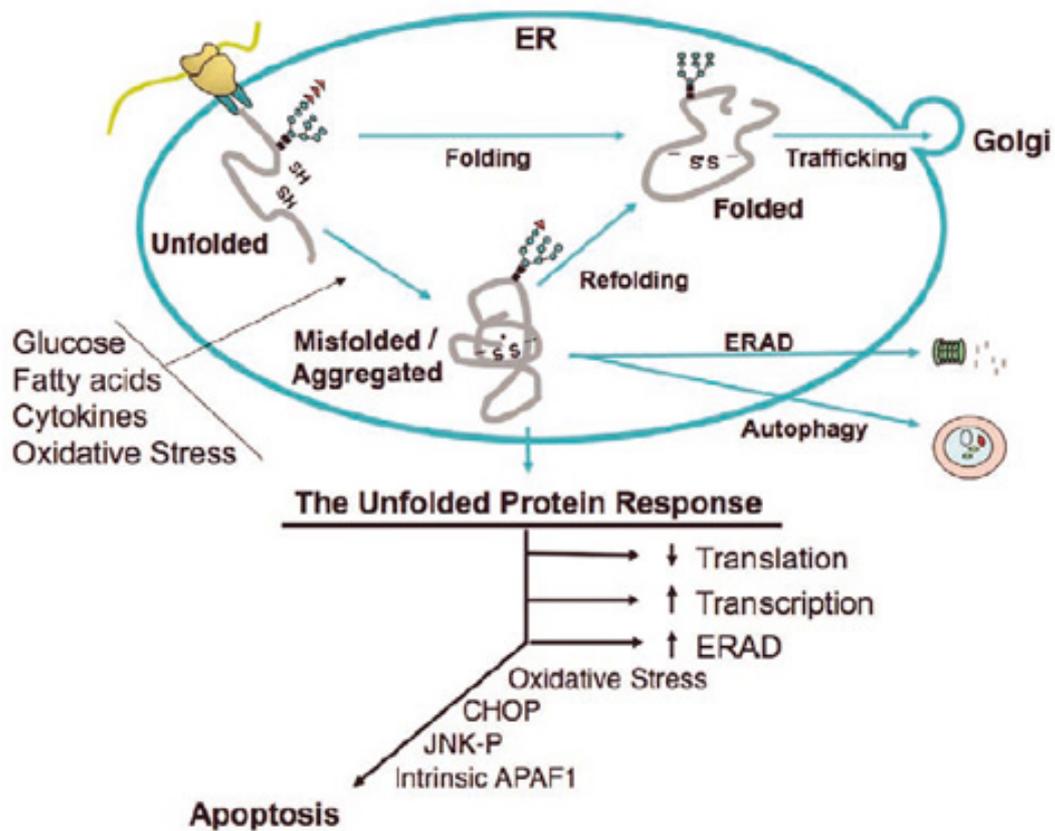


Abbildung 3: Mechanismen der Unfolded Protein Response (Kaufmann et al., 2010; Copyright © 2010 Blackwell Publishing Ltd, License Number: 3911501414348)

2.2.3.4 Der Granzym B – Signalweg

Diese Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Virusabwehr oder auch bei der Eliminierung von kanzerösen Zellen. Granzym B ist eine Serinprotease, die hauptsächlich in natürlichen Killerzellen oder zytotoxischen T-Zellen vorkommt. Sie liegt dort inaktiv in intrazellulärer Granula vor, zusammen mit Perforinen. Treffen beispielsweise eine zytotoxische Zelle und eine infizierte Zelle aufeinander, werden Perforin und Granzym B ausgeschüttet. Perforin bildet, wie sein Name bereits andeutet, Perforationen in der infizierten Zelle, durch die Granzym B in diese hinein gelangen kann. Alternativ besitzt Granzym B auch die Möglichkeit an bestimmte

Rezeptoren auf der Oberfläche der zu zerstörenden Zelle zu binden, wodurch es zur Endozytose kommt. Innerhalb der Zelle werden nun die Caspasen-3 und -7 aktiviert, wobei -7 sensibler auf Granzym B reagiert (Afonina, 2010). Außerdem wird BID (BH3 interacting-domain death agonist) aktiviert, und es kommt wie in den Kapiteln 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben zur Oligomerisierung von BAX und BAK, was zur Ausschüttung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und zur Aktivierung der Caspasen-3, -6, und -7 führt.

Sowohl Granzym B als auch Caspase 3 prozessieren iCAD, wodurch es seine aktive Form annimmt (CAD), welches zur DNA-Fragmentierung und Chromatin-kondensation führt. Granzym B spaltet außerdem Lamin B, wodurch die Zellmembran ihre Integrität verliert.

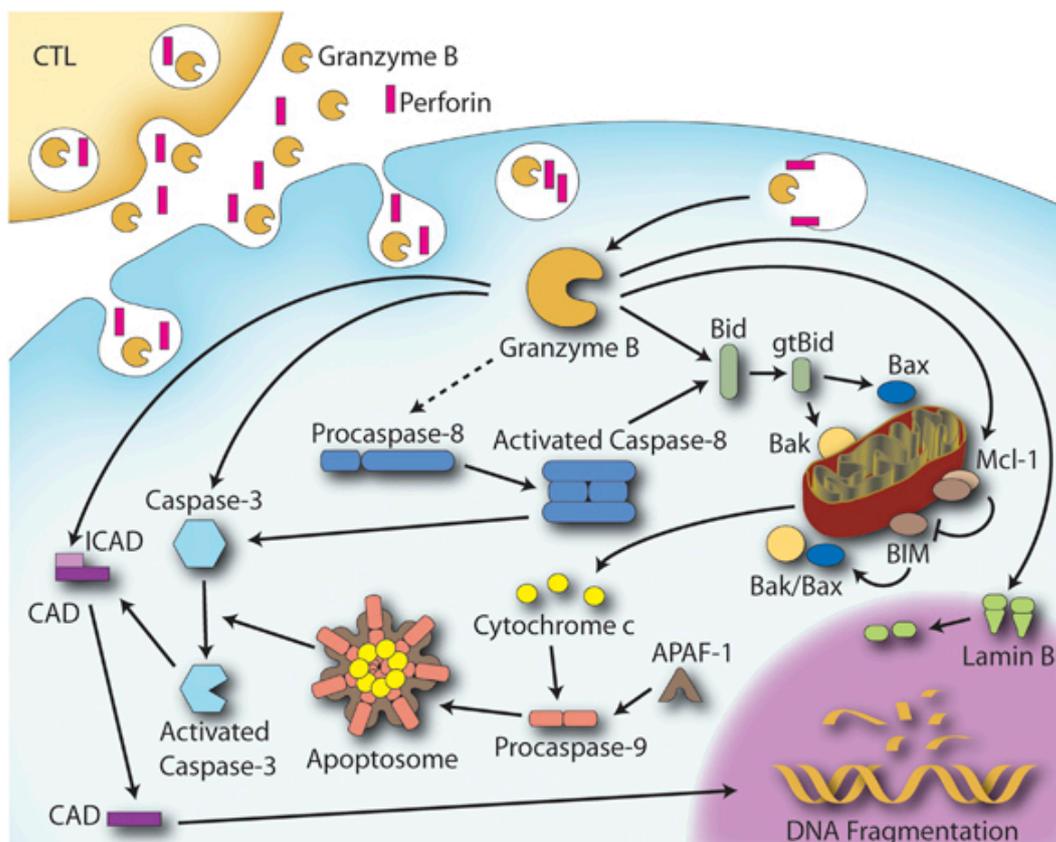


Abbildung 4: Granzym B - Signalkaskade (Wendy Anne Boivin, 2009; Copyright © 2009, Rights Managed by Nature Publishing Group, License Number: 3911510957838)

2.2.4 Regulationsmechanismen der Apoptose

Es gibt mehrere denkbare Angriffspunkte in der Signalkaskade, an denen eine Regulierung stattfinden kann. Im Folgenden sollen die wichtigsten Regulationsmechanismen angesprochen werden.

2.2.4.1 Angriffspunkt: extrinsischer Signalweg

Erster Angriffspunkt ist der DISC (death inducing signaling complex), der wie in Kapitel 2.2.3.1 bereits beschrieben, aus Fas-Rezeptor, FADD und Proform der Caspase-8 oder -10 besteht. Dieser Angriffspunkt ist von besonderer Bedeutung für Viren, da deren Überleben die Fähigkeit voraussetzt, die Wirtsmechanismen des programmierten Zelltodes umgehen zu können. Adenoviren inaktivieren beispielsweise das p53-Tumorsuppressor-Gen (Levine, 2009). Das Cowpox-Virus-Protein CrmA (cytokine response modifier A) lässt sich von Caspasen spalten, löst sich aber anschließend nicht mehr von ihnen und inaktiviert sie somit (Meier, 2013). Herpesviren ihrerseits können virale Analoga der humanen FLIP-Proteine (viral-FLICE-like inhibitory protein) bilden. V-FLIP ist ein viraler Apoptose-Inhibitor, der dem γ -Herpesvirus zugeordnet werden kann. Dieser besitzt die Fähigkeit, die über den CD95-Rezeptor initiierte Apoptose zu unterdrücken (Hu et al., 1997). V-FLIP besitzt zwei zelluläre Homologe, c-FLIPs (short) und c-FLIPI (long). Alle drei besitzen eine Tandem-DED (death effector domain). C-FLIPs ist über Interaktion mit FADD in der Lage, die Bindung von Caspase-8 an den DISC zu verhindern und unterbricht so die Signalkette (Kirchhoff et al., 2000). Die Wirkung von c-FLIPI ist abhängig von dessen Expressionslevel. Eine große Menge an c-FLIPI wirkt antiapoptotisch, in physiologischen Mengen kann es gegensätzlich dazu sogar Apoptose-verstärkend wirken, indem die Wirkung von Caspase-8 verstärkt wird (Chang et al., 2002).

2.2.4.2 Angriffspunkt: intrinsischer Signalweg

Beim intrinsischen Signalweg spielt, wie in Kapitel 2.2.3.2 erwähnt, die Gruppe der Bcl-2-Proteine die zentrale Rolle. Wie deren Namensgebung erahnen lässt, wurden sie erstmals in humanen B-Lymphozyten entdeckt (Tsujimoto, 1985). Die Bcl-2-Proteine lassen sich, abhängig von Struktur und Funktion, in drei Untergruppen unterteilen.

Die erste Gruppe zeichnet sich durch ihre antiapoptotische Wirkung aus. Zu ihr zählen Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-w und A1/Bfl1. Sie sind hauptsächlich im Mitochondrium, der Zellkernmembran oder dem endoplasmatischen Retikulum zu finden (Zhu et al, 1996). Die zweite Gruppe besteht aus den proapoptotisch wirkenden Proteinen Bax, Bak, Bok und Bcl-XS. Die dritte Gruppe ist die der BH3-only-Proteine. Zu ihnen zählen Bid, Bad, Bik, Hrk und Bim. Sie sind grundsätzlich proapoptotisch (Gross et al., 1999). Die proapoptotischen Proteine finden sich vorwiegend im Zytosol oder auch im Zytoskelett, wo sie auf apoptotische Signale warten.

Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier Bcl-2-Homologie-Domänen BH1-BH4. Die antiapoptotischen Familienmitglieder tragen jeweils alle vier Domänen, während den proapoptotischen entweder die BH4-Domäne oder die BH1- und BH2-Domäne fehlt. Einzig die BH3-Domäne ist in ihnen grundsätzlich vorhanden, weshalb diese auch Todesdomäne genannt wird. Die BH3-only-Proteine verfügen ausschließlich über die BH3-Domäne.

Das Mengenverhältnis zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen entscheidet über die Empfänglichkeit für Apoptosesignale.

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind in der Lage Homo- und Heterodimere mit anderen Mitgliedern der Familie zu formen und darüber ihre Wirkung zu entfalten. Bcl-Xs und Bad beispielsweise, beide proapoptotisch, dimerisieren kompetitiv mit antiapoptotischen Proteinen (Ayim, 2014).

Kommt es zu einer Anhäufung von Bcl-Xs werden bevorzugt Bcl- 2/Bcl-Xs-Heterodimere gebildet. So wird die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 untergraben. Kommt es beispielsweise zu einer vermehrten Expression von Bcl-2, werden Bcl-2-Homodimere gebildet, die die Apoptose hemmen. Das antiapoptotisch wirkende Bcl-XL dagegen ist in der Lage Apaf-1 zu binden, wodurch die Bildung des Apoptosoms verhindert werden kann. Andere Mitglieder der Bcl-2-Familie

wiederum, die stimulierend auf den Vorgang des programmierten Zelltodes wirken, können Apaf-1 wieder verdrängen und so befreien (Gross et al., 1999).

Es gibt außerdem Anzeichen für die Existenz von Bindungsproteinen, die sowohl Caspasen als auch Mitglieder der Bcl-2-Familie binden und so deren Aktivität koordinieren können. Ein solches ist beispielsweise Bap31, welches im ER lokalisiert ist (Ng et al., 1997).

Die Spaltung bestimmter Bcl-2-Proteine durch Caspasen kann eine Umkehr ihrer Funktion bewirken. So erhält das eigentlich proapoptotisch wirkende Bad durch eine Phosphorylierung durch Akt und Raf-1, zwei Proteinkinasen, die durch Caspase-3 aktiviert werden, eine antiapoptotische Funktion (Fischer et al., 2003).

Zuletzt soll der Transkriptionsfaktor p53 erwähnt werden. Er wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da er als Tumorsuppressor die Expression von Genen kontrolliert, die die DNA-Reparatur, Einleitung der Apoptose oder auch die Kontrolle des Zellzyklus kodieren (Kern et al., 1991). Kommt es zur Schädigung der DNA, so wird in der Zelle p53 akkumuliert. Dieses hemmt den Zellzyklus und verschafft der Zelle so Zeit für Selbstreparatur-Mechanismen. Gelingt dies, sinkt der p53-Spiegel wieder. Gelingt dies aber nicht, steigt er weiter an und schließlich wird BAX aktiviert (Vogelstein et al., 2000). Dieses aktiviert dann wiederum die apoptotische Signalkaskade. Gleichzeitig werden antiapoptotisch wirkende Proteine unterdrückt. Die Transkription von Bcl-2 wird durch p53 vermindert und die Expression von Bax induziert (Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995).

2.2.4.3 Apoptose-Inhibitoren, Smac/Diablo und Htr2A/Omi

Diese Proteinfamilie mit dem Namen inhibitors of apoptosis proteins (IAP), hemmt durch Bindung an aktivierte Caspase-3, -7, oder -9 die Caspasenaktivität. Diese Bindung erfolgt im aktiven Zentrum der jeweiligen Caspase (Deveraux und Reed; 1999; Salvesen und Duckett, 2002). Dadurch ist es für die IAPs möglich den mitochondrialen Apoptoseweg, den Granzym B-Signalweg sowie den Todesrezeptor-vermittelten Weg zu blockieren.

Die IAPs wurden 1993 erstmals in Baculoviren entdeckt. Ihnen allen gemein ist das Vorhandensein von mindestens einer BIR-Domäne (Baculovirus IAP repeat), die aus etwa 70 Aminosäuren besteht und für die antiapoptotische Wirkung

verantwortlich ist (Müller, 2004). Bis heute sind acht humane IAP-Proteine bekannt. Die drei IAPs XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 inhibieren direkt die Caspasen-3, -7 und die Procaspase-9, dasselbe gilt für Survivin (Tamm et al., 1998). Überwiegend wirken IAPs in den distalen Anteilen der Signalkette, c-IAP-1 und c-IAP-2 sind aber in der Lage an TRAFs (Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptor-assoziierte Faktoren) zu binden. Dies brachte Müller et al. zu der Annahme, dass die IAPs die Caspasenkaskade bereits auf Rezeptorebene blockieren können (Müller M., 2004). ILP2, ML-IAP, NAIP und BRUCE gehören ebenfalls zur Familie der IAPs (Deveraux und Reed, 1999).

Apoptose-inhibierende Proteine dieser Familie besitzen eine große Bedeutung als Tumormarker. Dies gilt vor allem für Survivin und ML-IAP, welches von transformierten Zellen exprimiert wird (Vucic, 2000; Li F., 1999). Durch Blockierung der Caspasen 3, 6 und 7, und damit des programmierten Zelltodes, erhöhen Tumorzellen ihre Vitalität.

Smac/Diablo und Htr2A/Omi, die, wie in Kapitel 2.2.3.1 erwähnt, gleichzeitig mit Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt werden, verdrängen beziehungsweise prozessieren IAPs. So können diese die einmal in Gang gesetzte Apoptose nicht mehr aufhalten (Hengartner, 2000).

2.2.4.4 Die Rolle von Ceramid in der Regulation der Apoptose

Ceramid gehört zur Gruppe der Sphingolipide. In gesunden Zellen findet sich Ceramid meist in der äußeren Plasmamembran. Es liegt hier als Sphingomyelin vor, welches aus Ceramid und Sphingosin besteht. Gerät die Zelle unter Stress, z.B. durch ionisierende Strahlung, Hitze oder oxidativen Stress, so wird Sphingomyelin abgebaut und es kommt zu einem Ceramid- und Sphingosinanstieg. Dieser Vorgang wird beispielsweise über den TNFR-1 oder CD95-Rezeptor vermittelt (Haimowitz-Friedmann et al., 1997).

Ceramid bewirkt innerhalb der Zelle nun die Aktivierung von SAPKs (stress-activated protein kinases) wie beispielsweise JNK (c-jun kinase) oder p38. Diese gehören zur MAP-Kinase-Familie und dienen der proapoptotischen

Signalweiterleitung. Für aktiviertes JNK konnte gezeigt werden, dass es zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien führt, wie z.B. SMAC/Diablo und Cytochrom C (Wada und Penninger, 2004).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Ceramid über die Dephosphorylierung von Bad den mitochondrialen Apoptoseweg aktivieren kann. Eine Überexpression von Bcl-2 schützt wiederum vor Ceramid-induzierter Perforierung der Mitochondrienmembran (Woodcock, 2006). Andererseits ist Ceramid aber auch in der Lage die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von Bcl-2 zu induzieren (Ruvolo, 1999). Diskutiert wird außerdem, ob Ceramid in der Lage ist selbst die Porenbildung in der mitochondrialen Membran zu induzieren (Siskind, 2005). Anhand von Neuroblastomzellen konnte für kurzkettiges C2-Ceramid eine Beteiligung an der Aktivierung von Caspase-2, Caspase-9 und Caspase-3, sowie an der Induktion der DNA-Fragmentierung und letztlich der Apoptose gezeigt werden. Diese erfolgte über den mitochondrialen Weg (Ito, 1999).

Gezeigt werden konnte außerdem, dass eine verringerte, intrazelluläre Ceramid-Konzentration eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Stimuli bewirkt, bis hin zur Resistenz (Paris, 2000; Sawada, 2000).

Zudem konnte bewiesen werden, dass Ceramid einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirkt (Nickels, 1996; Kishikawa, 1999).

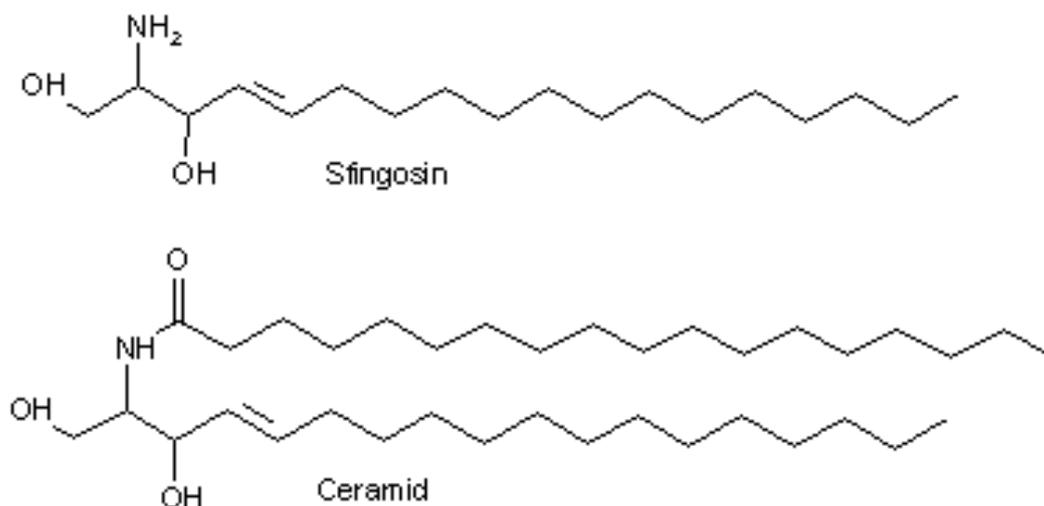


Abbildung 5: Allgemeine Struktur von Sphingosin und Ceramid

2.2.5 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Für die gesunde Entwicklung und die Existenz höherer Lebensformen ist der programmierte Zelltod eine obligate Voraussetzung. Durch die Apoptose können gezielt geschädigte, alte oder nicht mehr benötigte Zellen entfernt werden ohne das umgebende Gewebe zu schädigen. Dabei wird im gesunden Organismus immer das Gleichgewicht zwischen Neubildung und Eliminierung eingehalten. Ungefähr 100.000 Zellen werden jede Sekunde im menschlichen Körper durch Mitose produziert und ungefähr genauso viele sterben durch Apoptose (Jacobson et al., 1997).

Schon in der Embryonalentwicklung spielt der programmierte Zelltod eine wesentliche Rolle. Dabei werden Zellen mit genomischer beziehungsweise chromosomaler Aberration aussortiert (Pellestor, 1995), Gewebe werden um- und abgebaut, um Zellzahl und Gewebegröße zu kontrollieren. So besitzen Embryonen anfangs beispielsweise Interdigitalhäute, die gezielt durch Apoptose abgebaut werden. Durch apoptotischen Zelltod wird die Lichtdurchlässigkeit von Glaskörper und Linse gewährleistet und im Nerven- und Immunsystem wird primär eine übergroße Zellpopulation gebildet, die mittels Apoptose anschließend aussortiert wird. Der programmierte Zelltod spielt außerdem eine Rolle bei der Mammainvolution nach dem Abstillen, der Plastizität im zentralen Nervensystem, der Verjüngung von Geweben, wie beispielsweise dem Riechepithel der Nase, sowie der Follikelatresie. Damit seien hier nur stellvertretend einige Beispiele für die physiologische Bedeutung der Apoptose genannt.

Der suizidale Zelltod hat jedoch auch pathologische Bedeutung. Reed und Hermle et al. statuierten, dass gestörte Apoptoseregulation für die Hälfte jener Erkrankungen zumindest mitverantwortlich ist, für die es bisher keine oder nur unzureichende Therapieansätze gibt (Reed, 2002; Hermle, 2007). Sowohl eine gesteigerte Apoptoserate als auch eine verringerte können großen Schaden für den Organismus nach sich ziehen. Eine Fehlregulation zugunsten der Apoptose spielt zum Beispiel bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson) oder HIV eine Rolle (Thompson 1995, Shimohama 2000; Kayßer 2002). Aber auch bei pathologischen Erscheinungen wie Osteoporose, Rheumatismus oder bei Herzinfarkten sind apoptotische Vorgänge involviert (Eefting et al., 2004). Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise

Rheuma entstehen, wenn autoreaktive Immunzellen während ihrer Reifung nicht ausgesondert werden (Collatz, 1999).

Eine bedeutende Rolle spielt der programmierte Zelltod auch bei der Entstehung von Krebs. Dieser entsteht entweder durch unzureichende Eliminierung oder aber durch überschießende Proliferation. Beispielsweise können Tumorzellen antiapoptotische Bcl-2-Proteine überexprimieren oder aber proapoptotische herunterregulieren (Elmore, 2007). Zudem können sie in den extrinsischen Signalweg eingreifen und so T-Zellen und natürliche Killerzellen daran hindern die betroffenen Zellen zu zerstören.

In Anbetracht der Vielzahl an Prozessen, in denen der suizidale Zelltod eine Rolle spielt, ist es nicht verwunderlich, dass versucht wird pharmakologisch in diese Prozesse einzugreifen, um die Genesung von Patienten zu erreichen. So wird bei pathologisch gesteigerter Apoptose zum Beispiel versucht durch passende synthetische Substrate die Proteasen im aktiven Zentrum zu blockieren. In Tierversuchen konnten so Mäuse vor akutem Leberversagen geschützt werden (Rouquet et al., 1996). Der Inhibitor IDN6556 konnte die Apoptoserate in Leberzellen von Hepatitis-C-Patienten erfolgreich verringern (Pockros et al., 2007).

2.3 Eryptose

Mit der in Kapitel 2.1 angegebenen Anzahl von Erythrozyten im Blut und einer durchschnittlichen Lebenserwartung dieser von 100-120 Tagen lässt sich die enorme Zahl von 200 Milliarden Erythrozyten errechnen, welche jeden Tag eliminiert werden müssen. Wie in Kapitel 2.1 ebenfalls erwähnt, erfolgt diese Eliminierung über Phagozytose in Milz, Leber und Knochenmark. Seit neuestem weiß man aber, dass auch rote Blutkörperchen in der Lage sind, programmierten Zelltod einzuleiten. Zuvor war man davon ausgegangen, dass Erythrozyten, aufgrund ihres Mangels an Zellkern und Zellorganellen, zu suizidalem Zelltod nicht in der Lage seien.

Berg et al. beschrieben 2001, dass wenn man die Kalziumionophore Ionomycin zu Erythrozyten gibt, ein der Apoptose sehr ähnlicher Ablauf eingeleitet wird. Es

konnten Zellschrumpfung, Blebbing der Membran und erhöhte Phosphatidylserinexposition an der Membranoberfläche beobachtet werden. Anschließend wurden die Zellreste von Makrophagen aufgenommen. Ionomycin bewirkt einen maximalen Calcium-Einstrom in die Zelle. Dieser aktiviert calciumabhängige Proteasen, die, analog zu den Caspasen, unter anderem das Zytoskelett zerlegen (Miyoshi et al, 1996).

Für diese Art des programmierten Zelltodes wurde 2005 von Lang et al. der Begriff „Eryptose“ geprägt.

2.3.1 Signalwege der Eryptose

Die Eryptose nimmt morphologisch einen der Apoptose sehr ähnlichen Verlauf. Allerdings spielt hier ein anderer Signalweg eine Rolle.

Erhält der Erythrozyt ein proapoptotisches Stresssignal, so kommt es zum Calciumeinstrom. Solch ein Signal kann beispielsweise ein osmotischer Schock sein, oxidativer Stress, der wie man weiß durch Glucosemangel zusätzlich verstärkt werden könnte, Chloridentzug oder die Bindung bestimmter Zellmembran-Antigene. Dies bewirkt über die Aktivierung der Cyclooxygenase die Bildung von Prostaglandin₂ (PGE₂), welches die Öffnung unselektiver Kationenkanäle in der Membran veranlasst (Föller, 2008). Calcium strömt ein. Eine andere Möglichkeit zur Öffnung dieser Kanäle bietet die Proteinkinase C. Durch ein Stresssignal aktiviert, zum Beispiel durch Energiemangel, phosphoryliert sie den Kationenkanal auf direktem Weg (Klarl, 2007).

Der Calciumeinstrom aktiviert das Enzym Scramblase und inaktiviert gleichzeitig die Translokase (Dekkers et al., 2002). Die ATP-abhängige Translokase ALT stellt in gesunden Erythrozyten die Asymmetrie der Membranlipide sicher, fixiert also Phosphatidylserin am inneren Blatt der Membran (Seigneuret und Devaux, 1984). Die Scramblase externalisiert Phosphatidylserin vom inneren Blatt der Zellmembran auf das äußere [Zhou et al., 2002]. So kommt es zur Phosphatidylserin-Exposition und hierdurch letztlich zur Phagozytose durch auf diesem Weg aktivierte Makrophagen.

PGE₂ bewirkt über den Calcium-Einstrom außerdem die Aktivierung der Cystein-Endopeptidase Calpain, die auch Calcium-abhängige Papain-ähnliche cytosolische

Protease genannt wird. Dieses Enzym wandert zur Zellmembran, wo es in der Lage ist Spektrin und Ankyrin abzubauen. So wird das Zytoskelett des betroffenen Erythrozyten zerstört (Daugas, 2001). Dies bewirkt das Membranblebbing, welches bereits in Kapitel 2.2.2 erwähnt wurde (Föller und Huber, 2008).

Ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel sorgt für die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Kalium-Kanäle (Gardos-Kanäle). Es kommt zur Hyperpolarisation der Zellmembran, was die Zelle durch den Ausstrom von Chlorid-Ionen auszugleichen versucht. Dies verursacht aber eine extrazelluläre Hyperosmolarität und führt so zu einem Wasserverlust der Zelle, was wiederum in einer Abnahme des Zellvolumens resultiert (Lang et al., 2003). Schrumpft ein Erythrozyt, führt dies durch die Phospholipase A2 zur Freisetzung von PAF (platelet activating factor). Dieser wird von der Zelle selbst bei Hyperosmolarität ausgeschüttet, unabhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. PAF wiederum aktiviert eine Sphingomyelinase, die Sphingomyelin spaltet. So entsteht, wie schon in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben, Ceramid. Ceramid sensitiviert möglicherweise die Scramblase für intrazelluläres Calcium (Lang et al. 2004). C6-Ceramid potenziert den Effekt von erhöhtem, intrazellulärem Calcium, was wiederum die Phosphatidylserin-Exposition verstärkt und damit die Phagozytose durch Makrophagen (Lang et al., 2006).

Erythrozyten besitzen wie kernhaltige Zellen ebenfalls p38-Kinase. Diese wird bevorzugt bei osmotischem Schock aktiviert und führt zur Eryptose. Ebenso ist die JNK zu finden. Desweiteren findet man Janus kinase 3 (JAK3), welche in Folge von Glucosemangel phosphoryliert wird und proapoptotische Wirkung zeigt.

Zuletzt soll erwähnt werden, dass gezeigt werden konnte, dass Erythrozyten, trotz des Mangels an Zellorganellen, Caspasen besitzen. In gealterten Erythrozyten sowie in solchen, die man oxidativem Stress ausgesetzt hatte, konnte aktive Caspase-3 sowie aktive Caspase-8 nachgewiesen werden. Caspase-8 dient wie bei der Apoptose als Initiatorcaspase für Caspase-3. Bei der Eryptose erfüllt diese jedoch einen anderen Zweck. Sie blockiert die (Aminophospholipid-) Translokase ALT, die, wie bereits oben erwähnt, für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung der Sphingophospholipide in der Zellmembran verantwortlich ist. Auch der Todesrezeptor Fas ist in Erythrozyten vorhanden. Unter Mangel von Erythropoetin während der Zellreifung kommt es zur Bindung von FasL und so zum suizidalen Zelltod (Mandal, Mazumder et al. 2005).

Erythropoetin (EPO) spielt in der Entwicklung der roten Blutkörperchen eine wichtige Rolle, da es mehrere Schritte in deren Proliferation fördert und die Apoptose in den Vorläuferzellen hemmt.

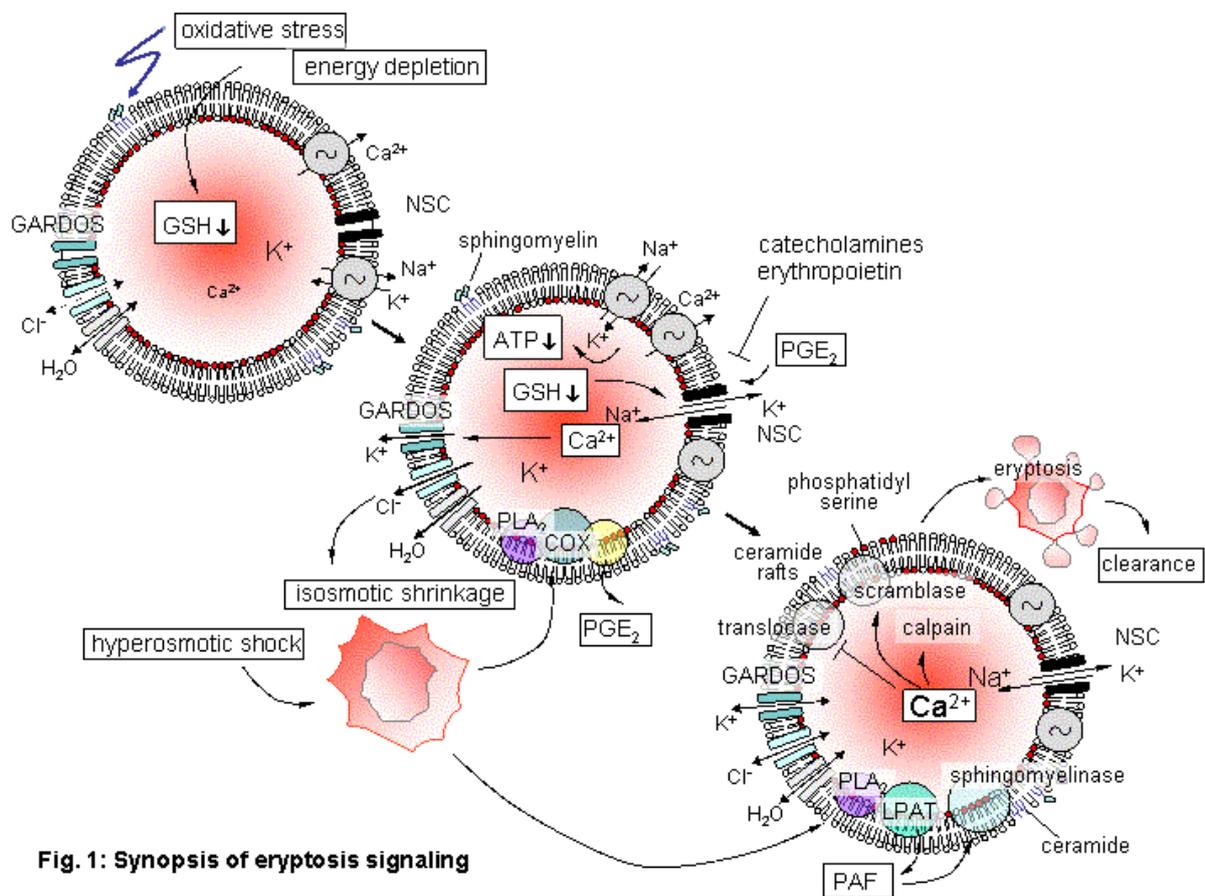


Fig. 1: Synopsis of eryptosis signaling

Abbildung 6: Signalwege der Eryptose (Föller, 2008; veröffentlicht mit freundlicher Genehmigung des physiologischen Instituts der Universität Tübingen)

2.3.2 Regulationsmöglichkeiten der Eryptose

Wie auch schon bei der Apoptose kernhaltiger Zellen, gibt es auch bei der Eryptose mehrere Angriffspunkte für Inhibitoren beziehungsweise für Verstärker.

Die unspezifischen Kationenkanäle, die den Einstrom von Calcium ermöglichen, sind der erste Angriffspunkt für mögliche Inhibitoren. Amilorid, beziehungsweise sein Analogon EIPA, ist in der Lage diese zu blockieren (Lang et al., 2003c). Das im vorherigen Kapitel erwähnte EPO ist ein physiologischer Inhibitor dieser Kanäle und spielt so nicht nur in der Erythropoese eine Rolle, sondern dient auch den ausgereiften Erythrozyten als Schutz vor Eryptose (Myssina et al., 2003). EPO ist zudem in der Lage, die Chlorid-induzierte Öffnung der unselektiven Kationenkanäle zu blockieren. Desweiteren können Catecholamine, wie beispielsweise Dopamin, Epinephrin und Isoproterenol, die unselektiven Kationenkanäle blockieren (Lang et al., 2005b). Sie erreichen allerdings nur in unphysiologischen Dosen eine signifikante Wirkung. Chlorid fungiert ebenfalls als Inhibitor.

In den Ceramid-gesteuerten Signalweg kann inhibitorisch eingegriffen werden, indem die Sphingomyelinase gehemmt wird. Dies ist durch Harnstoff zu erreichen (Lang et al., 2004b).

Die Gardos-Kanäle sind durch Clotrimazol zu blockieren. So wird der Kalium-Verlust verhindert und die daraus resultierenden Folgen.

Wie in Kapitel 2.3.1 erwähnt, sind die Caspasen 3 und 8 dafür zuständig, die ALT zu hemmen. Dieser Mechanismus wird beispielsweise durch oxidativen Stress eingeleitet. N-Acetylcystein (NAC) kann beide Caspasen blockieren und sorgt so dafür, dass Phosphatidylserin am inneren Blatt der Membran fixiert bleibt (Mandal, Mazumder et al. 2005).

Stickoxid (NO) besitzt ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Eryptose. Es wird von desoxygenierten Erythrozyten ausgeschüttet und bewirkt eine Vasodilatation. Funktioniert dieser Ablauf nicht reibungslos, kann es zu Bluthochdruck im Lungenkreislauf kommen (McMahon, Moon et al. 2002).

Andere Beispiele für inhibitorisch wirkende Substanzen sind Blebbistatin (Lang, Qadri et al. 2011), Koffein (Lang, Gulbins et al. 2010), Endothelin (Foller, Mahmud et al. 2010), Vitamin E (Jain, 1983), Xanthohumol (Qadri, 2009) und Zidovudine (Kucherenko et al., 2008).

Durch fortschreitende Forschung werden außerdem immer mehr Trigger der Eryptose bekannt.

Eine gestörte Funktion der AMP activated kinase (AMPK) löst Eryptose aus. Die AMPK ist dafür zuständig aufwändige Vorgänge zu hemmen, wie beispielsweise die Fettsäuresynthese und die Gluconeogenese, und stimuliert Glycolyse und Glucoseaufnahme. Aktiviert wird sie durch eine gehäufte Menge an AMP, das heißt durch einen Energiemangel, durch einen intrazellulären Calcium-Anstieg oder durch NO. So soll die AMPK der Zelle helfen Energiemangel zu überleben und wirkt dementsprechend unter normalen Umständen antiapoptotisch. Ihre ungestörte Funktion ist deshalb wichtig für das Überleben der Zelle (Kim, 2009). Auch eine gestörte Regulation der JNK und der p38 kinase, die beide Teil der MAP-Kinase-Signalwege sind und auch in der Apoptose von kernhaltigen Zellen eine Rolle spielen, führt zu gesteigerter Eryptose.

Neben den in den Kapiteln 2.3 und 2.3.1 bereits erwähnten Stimulatoren des erythrozytären, suizidalen Zelltodes sind mittlerweile viele weitere bekannt. Um nur einige wenige Beispiele zu nennen: Retinsäure (Niemoeller, Foller et al. 2008), Kupfer (Lang, Schenck et al. 2007), Aluminium (Niemoeller, Kiedaisch et al. 2006), Paclitaxel (Lang et al., 2006a), Gold (Sopjani, Foller et al. 2008), Novobiocin (Lupescu et al., 2014), Chlorpromazine (Akel 2006), Thioridazine (Lang, E., 2013) und Mefloquine (Bissinger, R. 2015).

2.3.3 Bedeutung der Eryptose

Eryptose spielt, wie man heute weiß, bei mehreren Krankheiten eine Rolle.

Bei Thalassämie, Sichelzellenanämie und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Mangel ist eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer zu beobachten. Diese wird zumindest zum Teil durch Eryptose verursacht (Lang et al., 2002). Dasselbe lässt sich für die Eisenmangelanämie sagen, denn auch hier kann eine erhöhte Eryptoserate beobachtet werden (Kempe et al., 2006), wie auch bei Phosphatmangel (Birka et al., 2004). Auch die Anämien bei verschiedenen Schwermetallvergiftungen könnten durch die beobachtete, gesteigerte Rate an erythrozytärem, suizidalen Zelltod bedingt sein (Kempe et al., 2005; Eisele et al.,

2006; Niemoeller et al., 2006). Zu einer Anämie kommt es immer dann, wenn die gesteigerte Beseitigung der erkrankten Erythrozyten nicht durch eine gesteigerte Bildung neuer Erythrozyten ausgeglichen wird (Lang et al., 2012).

Weiterhin wurde für einige Medikamente eine höhere Eryptoserate nachgewiesen. Beispielhaft genannt seien hier erneut Chlorpromazin, Cyclosporin und Paclitaxel (Akel et al., 2006; Niemoeller et al., 2006a; Lang et al., 2006a).

Desweiteren begünstigen Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten die Blutgerinnung und so die Entstehung von Thrombosen (Andrews, 1999; Chung et al., 2007; Zwaal 2005). Sie binden an das CXCL16/SR-PSO an der apikalen Membran von Endothelzellen in der Gefäßwand (Borst et al., 2012). So kann die Stimulierung der Phosphatidylserin-Translokation zu Beeinträchtigungen in der Mikrozirkulation führen (Abed et al. 2012; Closse 1999; Gallagher 2003].

Die Phosphatidylserin-Exposition an der Zelloberfläche dient der Beseitigung von defekten Erythrozyten und so dem Schutz des Organismus vor Hämolyse. Hämolyse von kranken Erythrozyten führt zur Freisetzung von Hämoglobin, welches durch die Nierentubuli ausgesiebt werden kann und dort im sauren Lumen ausfällt und sich ablagert. Dies kann zur Verengung oder sogar zur Okklusion der betroffenen Nephronen führen (Harrison, 1947).

Oxidativer Stress, der, wie bereits erwähnt, zu Eryptose führt, spielt ebenfalls eine Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, so beispielsweise bei HIV (Repetto et al., 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Eryptose bei komplexen Abläufen wie dem Hämolytisch-urämischem-Syndrom oder der Sepsis eine Rolle spielt (Lang et al., 2006b).

Es lässt sich jedoch auch zeigen, dass der Ablauf der Eryptose eine für den Organismus protektive Funktion ausübt. So fand man heraus, dass von Malaria infizierte Erythrozyten Phosphatidylserin exponieren und so schneller aus der Blutbahn entfernt werden können (Brand et al., 2003). Der Keim aktiviert selbst die unselektiven Kationenkanäle, da er mehr Natrium und Calcium benötigt, als die Zelle unter normalen Umständen aufnehmen würde. Diese Aktivierung löst jedoch gleichzeitig auf die in Kapitel 2.3.1 beschriebene Weise die Eryptose aus (Kirk, 2001).

Lang et al. formulierten 2006 die Vermutung, dass die Hauptaufgabe der Eryptose in der Vermeidung von Hämolyse besteht. Bei der Hämolyse wird Hämoglobin intravasal freigesetzt, was zu einer systemischen Entzündungsreaktion führen kann. So schreibt man beispielsweise der Hämolyse eine große Rolle bei der Entstehung von Gefäßverschlüssen bei Patienten mit Sichelzellenanämie zu. Das frei werdende Hämoglobin sorgt für eine verminderte Verfügbarkeit von NO. Endotheliales NO erfüllt viele wichtige Aufgaben. So ist es unter anderem gefäßerweiternd, senkt die Thrombozytenaggregation und vermindert die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen an den Gefäßoberflächen. Kommt es nun zur Hämolyse, sorgt dies für eine intravasale Entzündungsreaktion durch freigesetzte Zellbestandteile, sowie für die Anhaftung von Leukozyten und roten Blutkörperchen an den Gefäßwänden. Dies kann nun durch NO nicht gehemmt werden, da seine Bioverfügbarkeit aufgrund der Bindung an Hämoglobin herab gesetzt ist (Almeida et al., 2013; Schaer et al., 2012; Naseem 2005; Gallagher 2003). So kann man der Eryptose auch eine protektive Rolle im Bezug auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Arteriosklerose zuschreiben. Sie übt eine Schutzfunktion aus, indem sie ermöglicht, dass Zellbestandteile mit Membranhülle phagozytiert werden können und nicht freigesetzt werden.

2.4 Phloretin

2.4.1 Flavonoide

Flavonoide sind Pflanzenstoffe und werden deshalb auch als Phytochemicals bezeichnet. Sie kommen in nahezu allen Pflanzen vor. Gemeinsam mit den Phenolsäuren zählen sie zur Gruppe der Polyphenole. Flavonoide werden größtenteils lichtabhängig in den peripheren Randbereichen der Pflanze gebildet, das heißt zum Beispiel in der Schale von Früchten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sie der Pflanze als Schutz dienen vor schädigenden Umwelteinflüssen und UV-Licht. Bei einer Infektion oder aber auch bei extremen Witterungsbedingungen kann eine verstärkte Produktion der Flavonoide festgestellt werden (Manach et al, 2004).

Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen Ringen und einem O-heterozyklischen Ring.

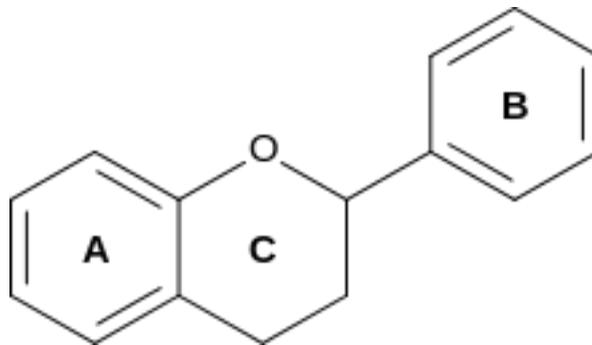


Abbildung 7: Struktur von Flavonoiden

Anhand des Aufbaus des O-heterozyklischen C-Rings und dessen Verbindung zum aromatischen B-Ring lassen sich die Flavonoide in sechs Gruppen unterteilen: Flavone, Flavonole, Isoflavonoide, Anthocyanidine, Flavanole und Flavanone. Außerdem existieren kleinere Gruppen, wie zum Beispiel die der Dihydrochalcone, zu denen auch Phloretin gezählt wird (Manach et al, 2004).

In der Natur kommen Flavonoide kaum ungebunden vor, sondern bilden meist ein Glykosid, das heißt sie sind an Zucker gebunden. Dabei entstehen unterschiedlichste Glykosidierungsmuster. An das Aglykon, das heißt das zuckerfreie Flavonoid, binden dabei Mono-, Di- und Oligosaccharide aus Glucose, Rhamnose, Galaktose, Xylose oder Arabinose (Watzl, 2001).

Die Aglykone der Flavonoide können aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften durch passive Diffusion über die Zellmembran im Dünndarm absorbiert werden. In der Leber erfolgt eine Metabolisierung, unter anderem durch Sulfatierung, Glukoronidierung und Methylierung. Anschließend werden die so modifizierten Flavonoide über den Urin oder Gallensaft ausgeschieden (Yang, 2001). Die unkonjugierte Form der Polyphenole kann deshalb nur selten im Plasma nachgewiesen werden. Nach einmaliger Fütterung von Ratten, mit einem Anteil von 0,157% Phloretin, konnten im Plasma lediglich 5% der aufgenommenen Menge als unkonjugierte Form detektiert werden (Crespy, 2002).

Da Flavonoide Teil unserer Nahrung sind, werden sie größtenteils in unserem Dünndarm über Enterozyten aufgenommen. Fast immer liegen sie gebunden vor als Ester, Glykoside oder Polymere, die erst gespalten werden müssen.

Die genauen Mechanismen sind noch nicht genau geklärt und lassen sich nicht für alle Flavonoide vereinheitlichen. So spielt es beispielsweise eine Rolle, welcher Zuckerrest an das Aglykon gebunden ist. Einige können bereits im Dünndarm resorbiert werden, während andere erst im Dickdarm enzymatisch gespalten und dann resorbiert werden können. Vom Resorptionsort ist auch die Zeit abhängig, nach der das zugeführte Flavonoid beziehungsweise sein Metabolit im Blut nachweisbar ist.

Hollman et al. beschrieben 1995 und Day et al. 1998, dass Glykoside teilweise aktiv über den natriumabhängigen D-Glukose-Cotransporter SGLT1 in Enterozyten aufgenommen werden und über zytosolische β -Glukosidasen gespalten werden können. 2003 veröffentlichten Day et al. zudem eine Studie, die eine weitere Möglichkeit aufzeigte. Quercetin-3-glucoside wurde dabei extrazellulär an der

apikalen Seite der Enterozyten durch die Lactat-Phlorizin-Hydrolase (LPH) gespalten und anschließend resorbiert. Unterschiedliche Flavonoide weisen dabei eine unterschiedliche Affinität zu der jeweiligen Glukosidase auf. Die einzelnen Flavonoide haben eine unterschiedliche Verweildauer im Organismus. Phloretin und Phlorizin können schon 24 Stunden nach Fütterung nicht mehr im Plasma der Versuchsratten nachgewiesen werden (Crespy, 2002). Zusammenfassend kann man aber sagen, dass nur ein geringer Anteil der aufgenommenen Flavonoide tatsächlich im Plasma ankommen und damit im peripheren Gewebe.

Es gibt verschiedene Untersuchungen dazu, wieviel Flavonoide täglich aufgenommen werden. Dies ist deshalb schwer zu ermitteln, da der Gehalt in den Obstsorten stark schwankt und zusätzlich von äußeren Umständen wie Bodenqualität und Wetterbedingungen abhängig ist (Andersen und Markham, 2006). Gleichzeitig unterscheiden sich die Essgewohnheiten regional sehr stark und damit die Flavonidaufnahme. Die veröffentlichten Studien schwanken zwischen Aufnahme-Werten von 12 mg und 1 g pro Tag (Watzl, 2001; Scalbert, 2005).

Tabelle 1 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Flavonoid-Untergruppen, deren Hauptvertreter und Vorkommen.

Klassen	Beispiele	Vorkommen
Flavonole	Quercetin, Kampferol	Zwiebeln, Tee, Äpfel
Flavone	Apigenin, Luteolin	Petersilie, Sellerie
Flavanole	Catechine	Tee, Rotwein, Schokolade
Flavanone	Naringenin, Hesperidin	Grapefruit, Orangen
Anthocyanidine	Malvidin, Cyanidin	Brombeeren, Kirschen
Isoflavonoide	Genistein, Daidzein	Sojabohnen
Dihydrochalcone	Phloretin, Phlorizin	Äpfel, Erdbeeren, Tomaten

Tabelle 1: Flavonoide (mod. nach Manach, 2004; Copyright © 2004, American Society for Nutrition, License Number: 3911520600151)

2.4.2 Allgemeine Bedeutung von Flavonoiden für den Organismus

Flavonoide entfalten vielfältige Wirkungen. Im Folgenden sollen ein paar der wichtigsten aufgelistet werden.

Flavonoide besitzen nachweislich ein ausgeprägtes antioxidatives Potential (Rababah, 2004). Dieses üben sie aus, indem sie reaktive Sauerstoffmoleküle oder Stickstoffverbindungen neutralisieren, indem sie Wasserstoffatome abgeben. So können sie einen Schutz bieten gegen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Tumorerkrankungen oder Diabetes mellitus Typ 2, deren Entstehung nachweislich in Zusammenhang stehen mit oxidativem Stress (Manach, 2004; Mayer, 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass manche Flavonoide Einfluss auf die Endothelfunktion von Gefäßen ausüben. So konnte nach dem Genuss von Schwarztee, der Flavonole und Flavonole enthält, eine Vasodilatation der Arteria brachialis beobachtet werden (Duffy, 2001). Für EGCG, das in grünem Tee vorkommt, konnte eine Hemmung der Thrombozytenaggregation gezeigt werden, die der von Aspirin entspricht (Sagesaka-Mitane, 1990). Apfelextrakte zeigten eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferationsrate von Tumoren und senkten das Entartungspotential (Ding, 2004).

2.4.3 Phloretin

Phloretin (2',4',6'-trihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-propiophenone), oder auch Dihydronaringenin oder Phloretol, ist ein Flavonoid und ein natürlicher Bestandteil von Äpfeln, Birnen, Tomaten und Erdbeeren. Äpfel sind dabei die Hauptressource von Flavonoiden in der westlichen Nahrung und so auch die größte Quelle von Phloretin und seinem Glykosid Phlorizin (Phloretin 2`-O- Glucose). Da alle oben genannten Früchte feste Bestandteile westlicher Ernährung sind, kann von einer kontinuierlichen Aufnahme von Phloretin ausgegangen werden. Beide Flavonoide gehören zur Untergruppe der Dihydrochalcone. Phloretin besteht aus zwei aromatischen Ringen, die durch ein Alkylzwischenstück zusammengehalten werden.

Die folgende Abbildung zeigt die Struktur von Phloretin und Phlorizin.

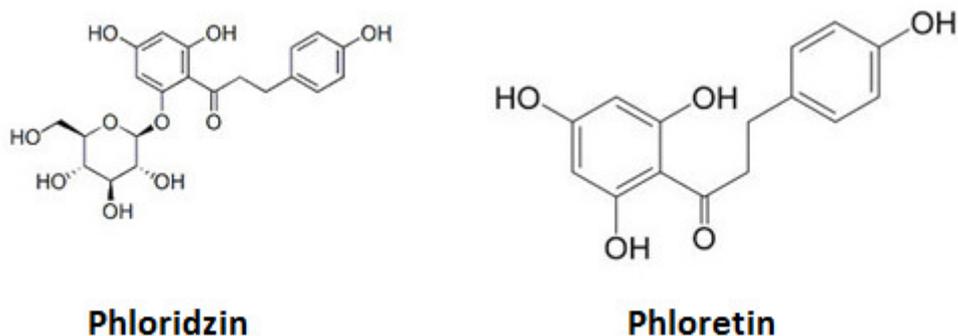


Abbildung 8: Das Aglykon Phloretin und sein Glykosid Phlorizin

2.4.4 Der Einfluss von Phloretin auf den zellulären Glukosetransport

Glukose kann aufgrund seiner Hydrophilie nicht durch die hydrophobe Zellmembran diffundieren. Für die Aufnahme in die Zelle ist deshalb ein Transporter nötig. Die zwei Hauptgruppen sind GLUTs (Glucose transporters) und die SGLTs (sodium glucose linked transporters). Der Unterschied zwischen diesen beiden Transportern besteht darin, dass GLUTs Glukose passiv entlang des Konzentrationsgradienten über die Zellmembran transportieren. SGLTs sind sekundär aktive Glukosetransporter.

Die GLUTs sind auf der basolateralen Seite der Zellen lokalisiert, zusammen mit einer ATP-abhängigen Protonenpumpe, der Na⁺/K⁺-ATPase. Diese befördert unter Verbrauch von ATP Natrium entgegen dessen Gradienten aus der Zelle heraus. Auf diese Weise wird auf der luminalen Zellseite der Natriumgradient aufrecht erhalten. Auf dieser Seite sind die SGLTs situiert. Diese befördern Natrium entlang des Gradienten, also ohne Energieaufwand, in die Zelle hinein und können dabei Glukose entgegen dessen Gradienten in die Zelle transportieren.

Phlorizin und Phloretin sind beide in der Lage SGLT-1 und SGLT-2 zu hemmen, wobei Phlorizin dabei die deutlich signifikantere Wirkung zeigt. Phloretin blockiert außerdem kompetitiv GLUT2 und GLUT1. Ein unerwünschtes Resultat dieser Hemmung in Enterozyten kann beispielsweise eine osmotische Diurese beziehungsweise Diarrhoe sein.

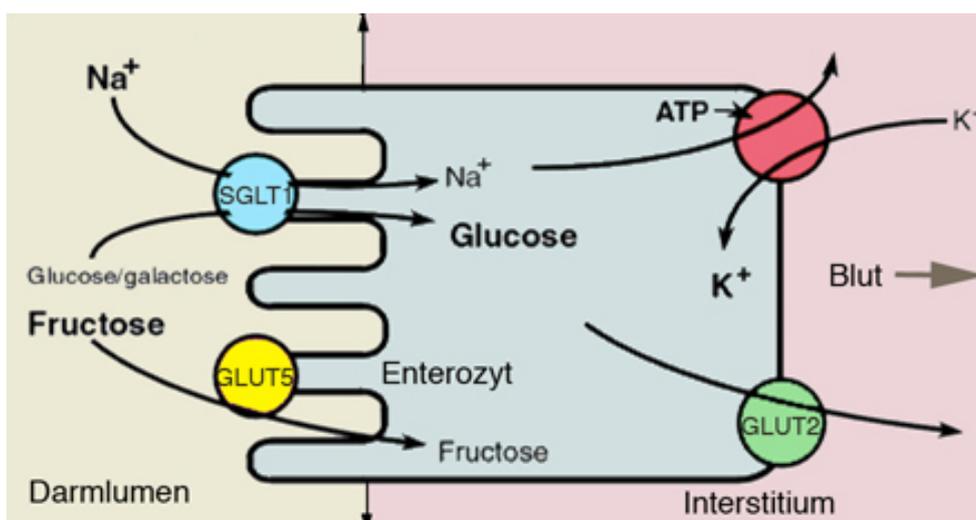


Abbildung 9: Die Funktion von GLUT2 und SGLT1 am Beispiel eines Erythrozyten

(Wright, 1998; Copyright © 1998 the American Physiological Society)

2.4.5 Spezielle Bedeutung von Phloretin für den Organismus und sein pharmakologisches Potential

Phloretin ist ein bipolares Molekül, das, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, mit diversen Kanälen und Transportern interagiert, unter anderem mit Glukosetransportern, Chlorid- und Kaliumkanälen (Wu, 2009; Nelson, 1993; Chao 2010; Malekova, 2007; Olson 2007; Skriabin 2000; Sukhorukov 2001; Fan 2001).

Eine der stärksten Eigenschaften von Phloretin ist seine starke antioxidative Wirkung (Rezk, 2002). Aus der Ermittlung der „Total Oxyradical Scavenging Capacity“ von Äpfeln ergab sich, dass die antioxidative Kapazität von 100g Apfel demnach vergleichbar ist mit der von 1,5g Vitamin C (Eberhardt et al., 2000). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Phloretin mit einer „Total antioxidant capacity“ von 1,63 ein potenteres Antioxidans ist als Vitamin C, welches lediglich über eine antioxidative Kapazität von 1,0 verfügt (Lee et al., 2003).

Weitere bewiesene Eigenschaften sind eine antiinflammatorische Wirkung (Lee, 2011), die Regulation von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen und die gesteigerte Produktion von endothelalem Stickstoff. Dieser besitzt die Fähigkeit zur Gefäßerweiterung und dadurch unter anderem eine Schutzfunktion vor Arteriosklerose (Munz, 2005). Phloretin mindert die Exposition von endothelialen Adhäsionsmolekülen und führt zur Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung, unter anderem über die Hemmung der Cyclooxygenase (Stangl, 2005; Landolfi 1984). Außerdem konnte eine antikanzerogene Wirkung von Phloretin gezeigt werden (Yang, 2001). Einige dieser Resultate sind auf die östrogenartige Wirkung von Phloretin zurückzuführen (Calliste, 2001). Neuste Studien zeigen, dass Phloretin in BGC823-Magenkrebs-Zellen Apoptose verursacht und die Bcl-2-Expression herab setzt (Mingqian et al., 2015).

Phloretin hemmt den Natrium-Glucose-Cotransporter SGLT1, ohne jedoch eine vermehrte Ausschüttung von Insulin zu bewirken. Es wird vermehrt Glucose mit dem Urin ausgeschieden. Demzufolge hat Phloretin eine antidiabetische Wirkung. Dieser Effekt ist allerdings bei Phlorizin ausgeprägter (Rossetti, 1987).

In geringen Konzentrationen wurde gezeigt, dass Phloretin einen Schutz vor Apoptose bietet. In hohen Konzentrationen kann Phloretin Apoptose auslösen, und könnte so zukünftig eventuell auf pharmakologischem Weg bestimmten Erkrankungen entgegen wirken (Kim 2009; Kobori, 1997 und 1999; Lee 2014; Park 2007).

3 Zielsetzung der Dissertation

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Phloretin in kernhaltigen Zellen Apoptose auslösen kann (Lee 2014, Kobori 1997 und 1999). Zunächst wurde angenommen, die ausgelöste Apoptose sei eine Folge der Blockade von Glucosetransportern, sodass die Energieversorgung der betroffenen Zellen nicht mehr gewährleistet werden konnte (Kobori, 1999). Dann fand man heraus, dass Phloretin in B16-Melanom-Zellen eine Caspasenaktivierung bewirkte. In HL-60-Leukämie-Zellen dagegen erfolgte die Induktion der Apoptose über die Inhibition der PKC (Kobori, 1999). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Phloretin in humanen H-Ras MCF10A-Brustkrebszellen Apoptose auslöst. Dies ging einher mit einem Anstieg von p53 und Bax, gefolgt von einer Aktivierung der Caspase-3 und des JNK- und p38-Signalwegs (Kim, 2009).

Vor kurzem konnte belegt werden, dass Phlorizin inhibierend auf die Eryptose wirkt (Meier, 2013). Da Phlorizin in wässriger Lösung, d.h. auch im Organismus, zu Phloretin und Zucker hydrolysiert wird, ist anzunehmen, dass auch Phloretin eine Wirkung auf Erythrozyten entfaltet. Aufgrund der fehlenden Glykolisierung verfügt Phloretin im Vergleich sogar über eine höhere Bioverfügbarkeit.

In dieser Studie soll zunächst untersucht werden, welchen Einfluss Phloretin auf das Apoptoseverhalten der Erythrozyten ausübt. Desweiteren soll untersucht werden, welche Abläufe sich in den Erythrozyten abspielen, die mit Phloretin in Kontakt kommen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Erythrozyten

Erythrozyten sind ausgereift nicht mehr teilungsfähig. Daher können sie nicht in Kulturen vermehrt werden und müssen frisch gewonnen werden. Alle Li-Heparin-antikoagulierten Erythrozytenkonzentrate wurden freundlicherweise von der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt und ausschließlich von freiwilligen Spendern entnommen. Deren Einverständnis ist schriftlich dokumentiert. Die experimentelle Studie sowie die Verwendung und Gewinnung der Erythrozyten wurde von der Ethikkommission der Universität genehmigt (Projekt Nummer 184/2003V).

Das Blut wurde mit 120g 20 Minuten bei 23°C zentrifugiert und der thrombozyten- und leukozytenhaltige Überstand wurde verworfen.

Mit diesen Proben isolierter Erythrozyten wurden nun alle Experimentalansätze unter einer Sterilbank, die weitgehende Keimfreiheit in den Proben gewährleisten sollte, vorbereitet.

Für die Versuche mit Annexin V und Fluor-3/AM wurde zu jeweils 1 ml Ringer-Lösung die entsprechende Menge Phloretin (Konzentration: 100, 200 und 300 µM) pipettiert, je 4 µl Erythrozytenkonzentrat hinzugefügt und anschließend wurde der Ansatz bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. So ergab sich in den Proben ein Hämatokrit von 0,4 %.

Für alle im Folgenden beschriebenen Versuchsaufbauten wurde eine Negativkontrolle ohne Zusatz von Phloretin angefertigt. Außerdem wurde immer eine Kontrollprobe ohne Phloretin aber mit DMSO ausgewertet, da DMSO Eryptose verstärkt. Diese Kontrollprobe diente also der Minimierung der Fehlerquote. Dabei wurden 3 µl DMSO verwendet.

Alle Versuche, die das FACS einbezogen, wurden mit unterschiedlichen Erythrozytenproben verschiedener Blutgruppen durchgeführt, um gegebenenfalls unterschiedliche Reaktionen durch die Blutgruppe oder den Rhesusfaktor feststellen zu können.

4.2 Durchflusszytometrie – Die FACS-Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden einzelne Partikel, in unserem Fall Körperzellen, in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl mit genau definierter Wellenlänge vorbei geführt. Die Durchflusszytometrie ist auch unter dem Begriff der FACS-Analyse bekannt. FACS steht für „Fluorescence activated cell sorting“. Diesen Begriff ließ die Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) patentrechtlich für sich schützen. Die Methode beruht auf der Streuung von Licht durch eine Zelle.

Eingehüllt in einen Flüssigkeitsstrom, auch Hüllstrom genannt, wird die Probe von einer Kapillare angesaugt. Beide Flüssigkeiten werden beschleunigt, vermischen sich jedoch nicht. Die Probe mit den darin enthaltenen Zellen verjüngt sich durch die erfahrene Beschleunigung derartig, dass sich die Zellen, ähnlich den Perlen einer Kette, hintereinander anordnen. Dieser Effekt wird als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet. Dies garantiert, dass immer nur die Streuung des Lichts durch eine Zelle gemessen wird und sich Messergebnisse nicht gegenseitig überlagern können. Passieren die Zellen nun den Laserstrahl, so entsteht Streulicht, dessen Qualität von den Eigenschaften der Zelle abhängt. Das Licht wird dabei in unterschiedliche Richtungen gestreut und dabei von mehreren Detektoren des FACS-Geräts aufgefangen. Sind die untersuchten Zellen zusätzlich fluoreszenzmarkiert, so werden die zusätzlich entstehenden Fluoreszenzimpulse ebenfalls detektiert. Die aufgefangenen Daten liefern so Erkenntnisse über zum Beispiel Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns sowie Größe der Zelle.

Abhängig vom dem Winkel, um den das Streulicht vom Laserstrahl abweicht, werden der sogenannte Forward Scatter (FSC) und der Side Scatter (SSC) unterschieden. Der FSC umfasst dabei das Streulicht mit bis zu 10° Abweichung und liefert Informationen über die Zellgröße. Je kleiner das Vorwärtsstreusignal, desto kleiner ist die gemessene Zelle. Der SSC misst Licht, das etwa in einem Winkel von 90° gestreut wird und liefert Daten zu Eigenschaften wie zum Beispiel Membranfaltung oder Zellgranula. Dabei gilt, je mehr Zellinhalt, das heißt Granularität, desto mehr Streulicht.

Bei dem im FACS-Gerät der Firma Becton Dickinson verwendeten Laser handelt es sich um einen Argonlaser (488 nm). Zusätzlich verfügt es über einen Diodenlaser,

der auch Farben im roten Spektralbereich erfassen kann. Dadurch ist eine gleichzeitige Analyse von bis zu vier Farben möglich.

Die Durchflussgeschwindigkeit durch die Messkammer beträgt 6 m/s.

Die unterschiedlichen Wellenlängen des emittierten Lichts werden durch Interferenzfilter voneinander unterschieden. Unterschiedliche Fluoreszenzspektren werden wie folgt jeweils einem anderen Kanal zugeordnet (Shapiro, 2003):

- FL-1: 515 - 545nm (grün)
- FL-2: für 564 - 606nm (gelb)
- FL-3: >670nm (rot)
- FL-4: 653 – 669nm (rot)

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Messverfahren gibt es außerdem die Möglichkeit die Exposition von Oberflächenmarkern der Zelle durch die Durchflusszytometrie zu ermitteln. Fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Bindeproteine werden an die zu untersuchenden Zellen gebunden und diese emittieren nach Anregung durch den Laser Fluoreszenzlicht, welches gemessen werden kann. Das physikalische Prinzip dahinter ist, dass die verwendeten Fluorochrome in der Lage sind, Licht mit der Wellenlänge des Lasers (488 nm) zu absorbieren. Dieses regt Elektronen dazu an auf ein höheres Energieniveau zu springen. Wenn sie anschließend auf ihr vorheriges Niveau zurück fallen, wird die Energie frei in Form von Wärme und Licht, beziehungsweise Photonen. Dieses freigewordene Licht hat nun aber eine andere Wellenlänge. Im Falle von Annexin V-FITC liegt diese bei 530 nm. Ein Photodetektor zeichnet die Menge an emittierten Photonen auf. Diese ist proportional zur Menge an gebundenem Antikörper.

In den durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich der FSC ermittelt und das Verfahren der Fluoreszenzdetektion angewandt, da die Zellgranulierung für die Messung der Eryptose keine nennenswerte Relevanz besitzt.

4.3 Verwendete Substanzen und die mit ihnen durchgeführten Untersuchungen

4.3.1 Phloretin

Erythrozyten wurden in unserer Studie Phloretin ausgesetzt (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland). 25 mg Phloretin wurden in 911,51 µl DMSO gelöst, sodass eine 100 mM-Lösung entstand. Für die Versuche wurden dann daraus Proben mit Konzentrationen von 100 µM, 200 µM und 300 µM hergestellt.

4.3.2 Annexin V FITC – Die Messung der Phosphatidylserinexposition

Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein. Wie schon in Kapitel 2.3.1 beschrieben, ist Apoptose unter anderem durch einen Verlust der asymmetrischen Anordnung der Membranphospholipide gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass Phosphatidylserin, welches sich bei gesunden Zellen auf der Membraninnenseite befindet, an der Membranaußenseite exponiert wird. Auch bei der Eryptose ist dieser Vorgang zu erkennen, der Makrophagen als Signal zur Phagozytose dient.

Annexin-V zeigt eine hohe Affinität für Phosphatidylserin. Diese Gegebenheit wird hier genutzt. Das verwendete Annexin V ist zu Zwecken der Detektion im Durchflusszytometer (FACS) mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), einem Färbemittel, gekoppelt. Das Maximum der Anregung von FITC liegt bei 495 nm, die Hauptemission erfolgt mit 521 nm. In den Untersuchungen wurde FITC mit 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm (FL1) gemessen. Die für die Bindung des Annexins erforderliche Calciumkonzentration wurde durch die Verwendung eines Annexin-Waschpuffers garantiert.

Zunächst wurde der im vorherigen Absatz beschriebene Ansatz für 48 h bei 37 °C inkubiert, 150 µl der Zell-Suspension wurden 3min bei 1600 RPM zentrifugiert und anschließend mit 150 µl Annexin-Waschpuffer gewaschen. Diese Pufferlösung wurde zuvor mit Annexin-V-FITC versetzt, einem Produkt der Firma ImmunoTools (Friesoythe, Germany), in einem Lösungsverhältnis von 1:200. Der Ansatz wurde 15min und unter Ausschluss von Licht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde der Forward Scatter gemessen und die Intensität der Annexin-V-Fluoreszenz.

Die gleiche Untersuchung wurde erneut durchgeführt nach Inkubation in Calcium-freiem Milieu. Hierfür wurde die weiter unten (Kapitel 4.4.1) beschriebene Calcium-freie Ringer-Lösung verwendet.

4.3.3 Fluo-3 AM Ester – Die Messung des intrazellulären Calciums

Für den Signalweg der Eryptose ist ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel von großer Bedeutung, denn er vermittelt die Aktivierung der erythrozytären Scramblase und die damit verbundene Exposition von Phosphatidylserin. Fluo-3 AM (Acetoxymethyl-) Ester (C₅₁H₅₀Cl₂N₂O₂₃) ist ein membranpermeabler Stoff, der in die meisten Zellen eindringen kann. Bindet er an Calcium, verstärkt sich seine Fluoreszenz um das vierzigfache. Nachdem er in die Zelle eingedrungen ist, wird intrazellulär von Esterasen der Acetomethyl-Rest abgespalten und es entsteht Fluo-3. Dieses bildet mit den dort vorhandenen Calcium-Ionen einen Chelatkomplex. Dadurch ist er nicht mehr in der Lage die Membran zu passieren. Also trägt lediglich intrazelluläres Calcium zum Messergebnis bei. Gleichzeitig garantiert der große Fluoreszenz-Unterschied zwischen chelatiertem Fluo-3 und Fluo-3 AM Ester, dass auch hier bei der Messung im FACS keine Fehler entstehen. Somit ist Fluo-3 AM Ester als Indikator für intrazelluläres Calcium geeignet.

Das Maximum der Anregung liegt bei 506 nm, die Hauptemission erfolgt mit 526 nm. Im FACS wurde Fluo-3 mit 488 nm angeregt und die Emission im FL-1 Kanal (530nm) gemessen.

In den Versuchen wurde Fluo-3-AM der Firma Biotium (Hayward, USA) verwendet. Die Erythrozyten wurden wie in Kapitel 4.2.2 und 4.3.2 beschrieben nach 48 Stunden Inkubation zentrifugiert und anschließend mit Fluo-3 AM gesättigt. Dieses war in Waschpuffer gelöst, im Verhältnis 1:200. Nach 30 Minuten erneuter Inkubationszeit bei 37°C und in Dunkelheit wurden die Zellen im FACS gemessen.

4.3.4 Monoklonale Antikörper - Die Messung von Ceramid

Ceramid wird während der Eryptose an der Zelloberfläche exprimiert. Diese Tatsache macht es messbar.

Zur Ermittlung der Menge an exprimiertem Ceramid wurde ein Testverfahren auf Basis von monoklonalen Antikörpern verwendet. Nach Inkubation wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit 1 µg/ml monoklonalem anti-Ceramid Antikörpern (clone MID 15B4; Alexis, Grünberg, Germany) versetzt, die in PBS gelöst waren. Dieses enthielt 0.1 % bovines Serum-Albumin (BSA) in einem Lösungsverhältnis von 1:5. Nach zweimaliger Waschung mit PBS-BSA wurden die Zellen für 30 Minuten mit einem speziellen Antikörper versetzt (polyclonale Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG and IgM specific antibody (Pharmingen, Hamburg, Germany)). Dieser war im Verhältnis 1:50 in PBS-BSA gelöst. Ungebundene Antikörper wurden durch wiederholtes Waschen mit PBS-BSA entfernt. Die Proben wurden dann mittels Durchfluss-Zytometrie bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 530 nm ermittelt. Die Messung erfolgte im FL-1 Kanal.

4.3.5 ATP – Die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration

Adenosintriphosphat (ATP) besteht aus dem Molekül Adenin, das über eine O-glykosidische Bindung an Ribose gebunden ist. An dessen 5'-Ende befindet sich ein Triphosphatrest, dessen erste Phosphatgruppe als Ester und die beiden letzten anhydridisch gebunden sind.

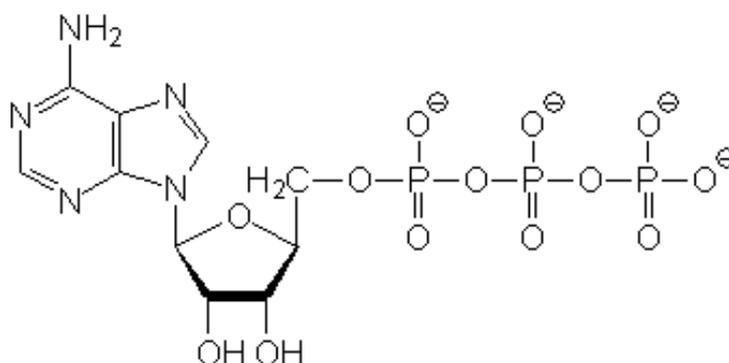


Abbildung 10: Strukturformel von ATP

Bei ATP handelt es sich um den wichtigsten Energieträger des menschlichen Organismus. Die Phosphatgruppen besitzen ein sehr hohes Gruppen-Übertragungspotenzial. Bei der Abspaltung einer einzigen Gruppe wird ca. 30,3 kJ/mol Energie frei, bei der Spaltung beider Gruppen ca. 32,2 kJ/mol. ATP wird im Körper benötigt, um aktive Transportsysteme wie beispielsweise die Na⁺/K⁺-ATPase energetisch zu versorgen. Viele enzymatische Reaktionen sind ATP-abhängig.

Zur Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts wurden 90 µl Erythrozytenkonzentrat für 48 Stunden in Standard-Ringer-Lösung sowie in glucosefreier Ringerlösung resuspendiert. Der Hämatokrit lag bei 5%. Die Versuche wurden jeweils in Ab- und Anwesenheit von Phloretin (300 µM) durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in destilliertem Wasser lysiert und die Proteine mit 5%-iger Perchlorsäure (HClO₄) ausgefällt. Daraufhin wurden die Proben zentrifugiert und 400 µl des Überstands abgenommen. Dieser wurde mittels Kaliumtrihydrogenkarbonatlösung (KHCO₃) auf einen pH von 7,7 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugierung wurden 200 µl des Überstands entnommen und damit die anschließende Messung der ATP-Konzentration durchgeführt. Alle oben beschriebenen Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt, um den Abbau von ATP zu verhindern. Zur Ermittlung der ATP-Menge wurde das Luciferin-Luciferase Assay Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet und ein Luminometer (Berthold Biolumat LB9500; Bad Wildbad, Deutschland).

Luciferasen sind Enzyme mit der Fähigkeit, Luciferine zu oxidieren.

Die Firefly-Luciferase, die bei den Experimenten zur ATP-Bestimmung verwendet wurde, reagiert ATP-abhängig. Bei der Reaktion entstehen Kohlenstoffdioxid, Pyrophosphat, AMP und Licht. Die Lichtemission kann mittels eines Luminometers gemessen werden. Das Emissionsmaximum des Lichts liegt bei 562 nm. Mit Hilfe der Michaelis-Gleichung kann die Lichtintensität berechnet werden:

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

Wie aus der Gleichung ersichtlich, verhält sich die Lichtintensität direkt proportional zur ATP-Konzentration. Dank dieser Tatsache kann der ATP-Gehalt der

gemessenen Probe durch Verwendung einer Standardkurve bestimmt werden. Diese wurde auch für die durchgeführten Versuche definiert.

Die Standardkurve wurde mit den folgenden ATP-Konzentrationen (Verdünnung mittels destilliertem Wasser) gemessen: 150, 250, 500 und 1000 nM.

4.3.6 Ionomycin

Ionomycin ist ein Ca^{2+} -Ionophor, das gradientengetrieben, ionenkanalunabhängig biologische Membranen passieren kann. Es wurde als Positivkontrolle für die Bestimmung der Menge an intrazellulärem Calcium in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ (1h) verwendet.

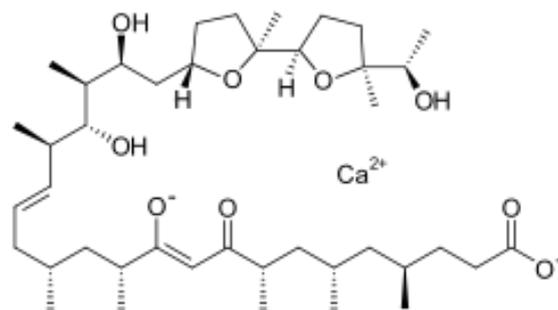


Abbildung 11: Strukturformel von Ionomycin

4.3.7 Amitriptylin und Zoledron-Säure

Amitriptylin gehört zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva und wird in aller Regel zur Behandlung von psychischen Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen, aber auch zur langfristigen Schmerzbehandlung, eingesetzt. Zoledron-Säure wird zur Gruppe der Bisphosphonate gezählt und als solches zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt oder auch in der Behandlung von Krebspatienten, so unter anderem bei tumorinduzierter Hyperkalzämie.

Bei Amitriptylin und Zoledron-Säure handelt es sich um Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase. Diese ist wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben dafür zuständig Sphingomyelin zu spalten, wodurch Ceramid gebildet wird, das wiederum die erythrozytäre Scramblase aktiviert, wodurch es zur Exposition von Phosphatidylserin an der Erythrozytenoberfläche kommt.

Durch die Zugabe der beiden Inhibitoren zu den Proben soll getestet werden, ob die beobachteten Versuchsergebnisse von einer Ceramid-Bildung abhängig sind oder nicht.

Es wurden für dieses Testverfahren 0.01 μM Amitriptylin zugesetzt beziehungsweise 10 μM Zoledron-Säure.

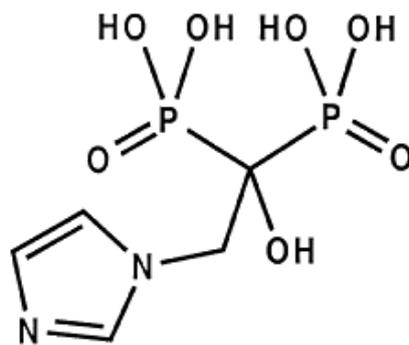


Abbildung 12: Zoledronsäure

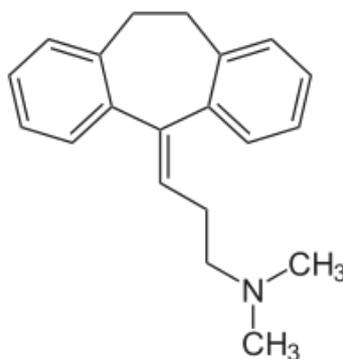


Abbildung 13: Amitriptylin

4.3.8 SB203580

SB203580 ist ein Pyridinyl-Imidazol und ein potenter Inhibitor der p38 MAP-Kinase. Wie bereits weiter vorn beschrieben zählt p38 zu den sogenannten Stress-Kinasen, die beispielsweise bei osmotischem Schock, durch entzündungsfördernde Zytokine oder UV-Licht aktiviert werden.

SB203580 wurde eingesetzt, um herauszufinden, ob p38 MAPK in der durch Phloretin verursachten Eryptose eine Rolle spielt.

SB203580 wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 2 μ M verwendet.

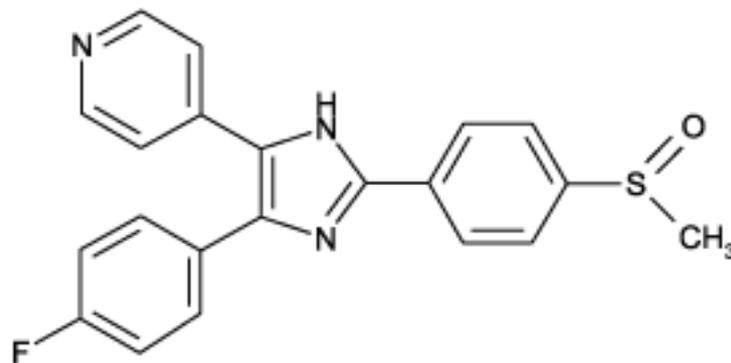


Abbildung 14: Strukturformel von SB203580

4.3.9 Staurosporin

Staurosporin ist ein unselektiver Proteinkinaseinhibitor, der unter anderem die Proteinkinase C blockiert. Dabei bindet es kompetitiv als „falscher“ Ligand an die ATP-Bindungsstelle der Kinasen und führt so zu einer Hemmung. Außerdem ist mittlerweile bekannt, dass Staurosporin ein potenter Apoptoseinduktor für viele Tumorzellen ist, der auch auf gesunde Zellen hoch toxisch wirkt.

Hier soll mithilfe von Staurosporin untersucht werden, ob die PKC eine Rolle in dem durch Phloretin verursachten Ablauf der Eryptose spielt.

Staurosporin kam in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ zum Einsatz und wurde in DMSO gelöst.

Die Erythrozyten wurden für 48 Stunden Phloretin ($300\mu\text{M}$) ausgesetzt, in Ab- und Anwesenheit von Staurosporin ($1\mu\text{M}$).

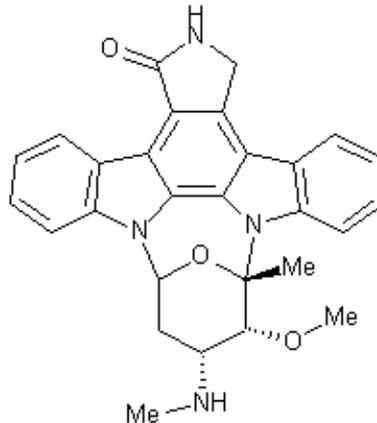


Abbildung 15: Strukturformel von Staurosporin (Fermentek biotechnology)

4.4 Verwendete Lösungen

4.4.1 Ringer Lösung

Rote Blutkörperchen verfügen über wenige Stoffwechselforgänge. So benötigen sie lediglich eine geeignete Umgebung, um ihre Elektrolyte im Gleichgewicht zu halten und ausreichend Glucose, die ihre Energieversorgung garantiert. Eine einfache Ringer-Lösung erfüllt diese Voraussetzungen. Sie hat die gleiche Elektrolytzusammensetzung, Osmolarität und pH-Wert wie menschliches Plasma. Sie dient in allen Experimenten als Lösungsmittel und ebenso als Kontrollsubstanz, weil in ihr die spontane Erytoserate zu vernachlässigen ist. Es wurde mit einem pH-Wert von 7,4 gearbeitet. Dieser wurde erreicht durch die Zugabe der benötigten Menge Natriumhydroxid (NaOH) sowie durch 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes) als Puffersubstanz. Die Lösung wurde durch einen sterilen

Filter der Firma Millipore (Cork, Ireland) gefiltert. Die Ringer-Lösung enthielt (in mM) 125 NaCl (Natriumchlorid), 5 KCl (Kaliumchlorid), 1 MgSO₄ (Magnesiumsulfat), 32 HEPES, 5 Glucose und 1 CaCl₂ (Calciumchlorid). Dies ist in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Substanz	Konzentration (mM)	Menge für 1l (g)
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
CaCl ₂	1	0,111
Glucose	5	0,901
Hepes	32	7,674
NaOH	13	0,541
H ₂ O		982,798

Tabelle 2: Zusammensetzung der Ringer-Lösung

Bei den beschriebenen Untersuchungen, die eine CaCl₂-freie Ringer-Lösung erforderten, wurde 1 mM CaCl₂ durch 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) ersetzt.

4.4.2 Glucose-freie Ringerlösung

Erythrozyten gewinnen ihre Energie mittels ATP-Produktion. Für diese benötigen sie Glukose, da sie aufgrund des Mangels an Mitochondrien auf die anaerobe Glykolyse angewiesen sind. Entzieht man ihnen diesen Energielieferanten, tritt die Eryptose deutlich schneller ein. Für Versuche, in denen gezielt Eryptose herbeigeführt werden sollte, wurde deshalb eine glukosefreie Ringer-Lösung hergestellt, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt ist. Der pH-Wert dieser Lösung wurde ebenfalls auf 7,4 eingestellt, die Osmolarität betrug 300 mosmol/l.

Substanz	Konzentration (mM)	Menge für 1l (g)
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
Hepes	32	7,674
CaCl ₂	1	0,111
NaOH	13	0,541
H ₂ O		982,798

Tabelle 3: Zusammensetzung Glucose-freie Ringer-Lösung

4.4.3 Hypertone Lösung

Durch Zugabe von 550 mM Saccharose zur oben beschriebenen Ringer-Lösung entstand eine Lösung mit erhöhter Osmolarität.

Hypertone Umgebung versetzt der Zelle einen osmotischen Schock. Dieser löst eine Stressreaktion aus, bei der die p38-Kinase involviert ist, die letztlich zur Eryptose führt.

Die Hypertone Lösung wurde zur Durchführung einer Positivkontrolle verwendet, bei der ermittelt wurde, ob die Zugabe von SB203580 die Untersuchungsergebnisse nach osmotischem Schock verändern kann im Vergleich zu einer Probe ohne SB203580.

4.4.4 Waschpuffer für Annexin und Fluo-3/AM

Der Annexin-Waschpuffer wurde verwendet, um die in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 beschriebenen Untersuchungen durchzuführen. Mit ihm wurden Erythrozyten gewaschen und die beschriebenen Färbungen im Verhältnis 1:200 verdünnt.

Substanz	Konzentration(mg/ml)	Menge für 1l (g)
NaCl	140	7,305
Hepes	10	2,383
CaCl ₂	5	0,555
NaOH	4	0,168
H ₂ O		990

Tabelle 4: Zusammensetzung des Waschpuffers

4.4.5 Phosphate Buffered Saline (PBS)

PBS ist isoton und nicht zytotoxisch und ist daher geeignet zum Waschen von Zellen.

Substanz	Konzentration (mM)	Menge für 1l (g)
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,2
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	8,1	1,44
KH ₂ PO ₄	1,76	0,24

Tabelle 5: Zusammensetzung PBS

4.6 Statistik

Die Daten werden unter Verwendung des arithmetischen Mittels \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse wurde ermittelt mit Hilfe von ANOVA und Tukey's test als post-test und t-test wo angemessen. „n“ kennzeichnet die Anzahl der verschiedenen untersuchten Erythrozyten-Proben und entspricht der Anzahl an Patienten. Da jede Erythrozyten-Probe unterschiedlich stark empfänglich für die verschiedenen Auslöser von Erythrose ist, wurden immer dieselben Proben für das Experiment und die jeweilige Kontrolle verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Annexin V – Die Bindung von Phosphatidylserin

Die Phosphatidylserin-exponierenden Zellen wurden, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, mittels Bindung an Annexin-V und Durchfluss-Zytometrie identifiziert und ihre Menge wurde bestimmt. Dafür wurde die Emission von an Annexin-V konjugiertem FITC im FL1-Kanal des FACS-Calibur gemessen.

Wie in Abbildung 16 gezeigt, erhöhte die Zugabe von Phloretin nach 48 Stunden den prozentualen Anteil an Annexin-V-bindenden Erythrozyten. Dieser Effekt erreicht bei einer Phloretin-Konzentration von 100 μM statistische Signifikanz. Dies zeigt, dass Phloretin zur Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Zellmembran führt.

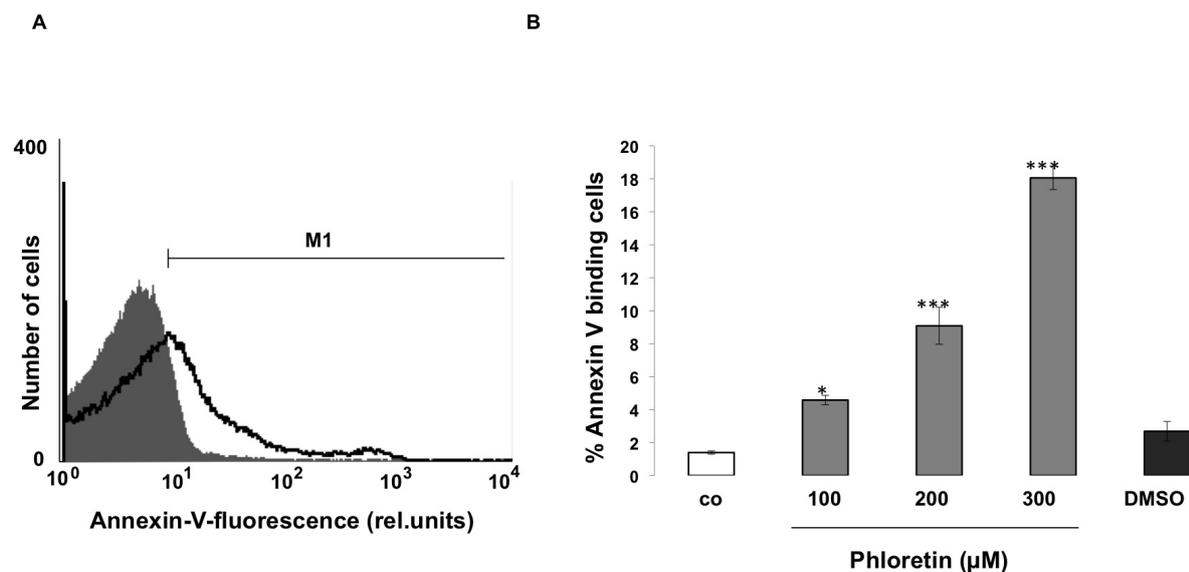


Abbildung 16: Effekt von Phloretin auf die Phosphatidylserin-Exposition (Bissinger+Fischer, 2014)

A Histogramm der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit (schwarze Linie) und ohne (grauer Bereich) Phloretin (300 μM).

B Arithmetisches Mittel \pm SEM (standard error of the mean) der erythrozytären Annexin-V-Bindung ($n = 10$) nach 48 Stunden Inkubation in Ringer Lösung ohne (weiße Säule) und mit Zugabe von Phloretin (100-300 μM ; graue Säulen). Zum Vergleich wurde der Effekt von 3 μl DMSO/ml Ringer-Lösung untersucht (schwarze Säule). *($p < 0.05$), ***($p < 0.001$) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu Proben ohne Zugabe von Phloretin (ANOVA (Analysis of Variance)).

5.2 Forward Scatter – Ermittlung der Zellgröße

Es ist bekannt, dass Apoptose und Eryptose eine Zellschrumpfung verursachen. Dies ist, wie in Kapitel 2.3.1 ausführlicher erklärt, eine Folge des Calciumeinstroms und dem daraus resultierenden KCl-Verlust, was wiederum zu einem osmotischen Gradienten führt, der zum Wasserausstrom aus der Zelle führt.

Mittels Durchflusszytometrie wurde das Zellvolumen anhand des Forward Scatters ermittelt. Dies ist in Kapitel 4.2 näher beschrieben.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, blieb der Forward Scatter nach Inkubation der Erythrozyten mit Phloretin annähernd unverändert gegenüber der Kontrolle ohne Phloretin.

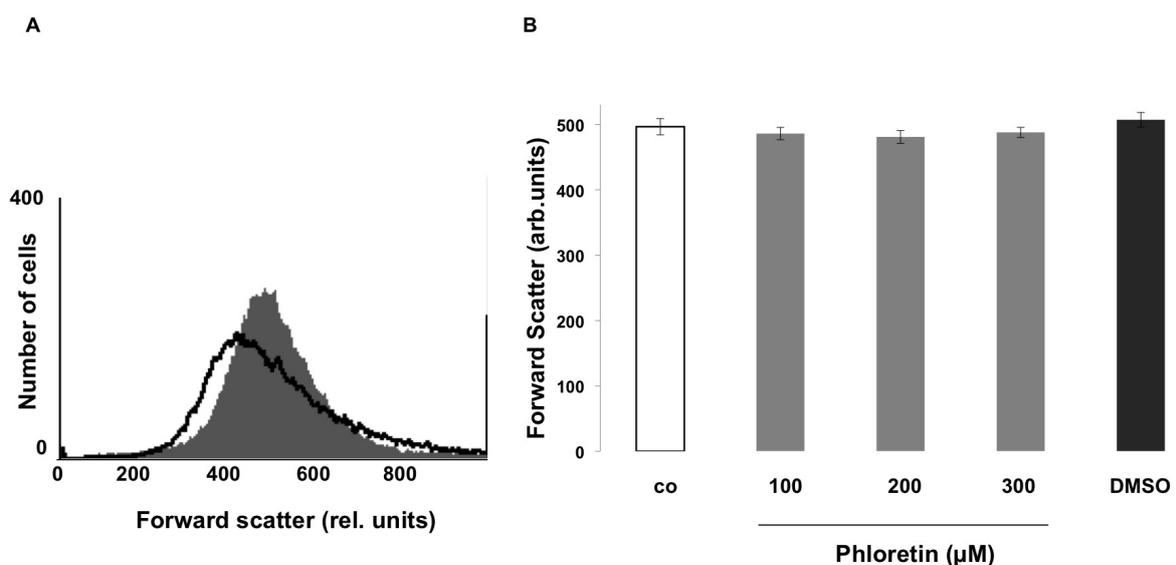


Abbildung 17: Effekt auf den erythrozytären Forward Scatter (Bissinger+Fischer, 2014)

A Histogramm des erythrozytären Forward Scatters nach 48-stündiger Exposition in Ringer-Lösung unter Ab- (grauer Bereich) und Anwesenheit von 300 µM Phloretin (schwarze Linie).

B Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 10$) des erythrozytären Forward Scatters (FSC) nach 48 Stunden Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weiße Säule) und mit (graue Säulen) Phloretin (100-300 µM). Es konnte keine signifikante Abweichung gezeigt werden. Zum Vergleich wird der Effekt von 3 µl DMSO/ml Ringer gezeigt (schwarze Säule).

5.3 Messung des intrazellulären Calciums

Die Fluo-3-Fluoreszenz wurde angewandt, um zu testen, ob Phloretin einen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumaktivität zeigt.

Wie in Abbildung 18a gezeigt, hatte eine 48-Stunden-Exposition in Phloretin keinen signifikanten Einfluss auf die Fluo-3-Fluoreszenz. Daher lässt sich sagen, dass Phloretin keinen merklichen Einfluss auf die zytosolische Calciumaktivität besitzt.

Wie in Abbildung 18b gezeigt, konnte ein Calciumanstieg bewirkt werden, indem man zum Zwecke einer Positivkontrolle 1 μM (1h) der Calcium-Ionophore Ionomycin zu den Erythrozyten gab.

Eine Reihe weiterer Experimente untersuchte, ob das durch Phloretin verursachte Zellmembran-Scrambling einen Einstrom von extrazellulärem Calcium erfordert. Zu diesem Zweck wurden Erythrozyten für 48 Stunden 300 μM Phloretin ausgesetzt, jeweils in der An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium.

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, erhöhte Phloretin den Anteil der Annexin-V-Bindungen signifikant. Dies erfolgte in gleichem Ausmaß sowohl in An- also auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium. Daraus ließ sich schließen, dass die Phosphatidylserin-Translokation nicht vom Einstrom extrazellulären Calciums abhängig ist.

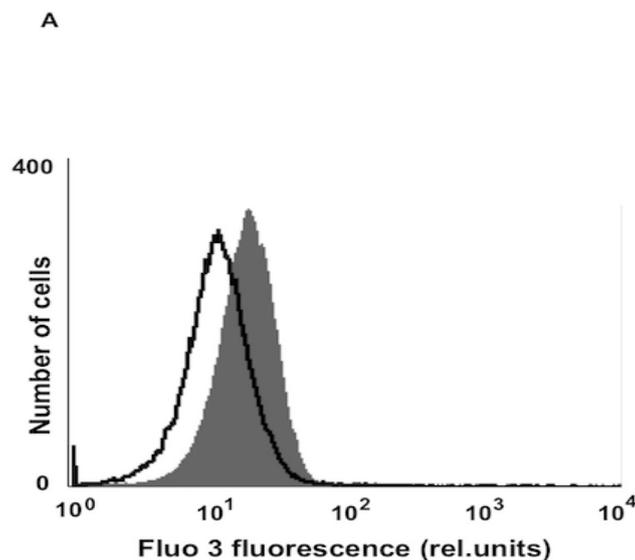


Abbildung 18a: Effekt von Phloretin auf die erythrozytäre Calcium-Aktivität (Bissinger + Fischer, 2014)

A Histogramm der Fluo3-Fluoreszenz in Erythrozyten, nachdem diese für 48 Stunden Ringer-Lösung ausgesetzt waren, in Ab- (grauer Bereich) und Anwesenheit (schwarze Linie) von Phloretin (300 μM). Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration.

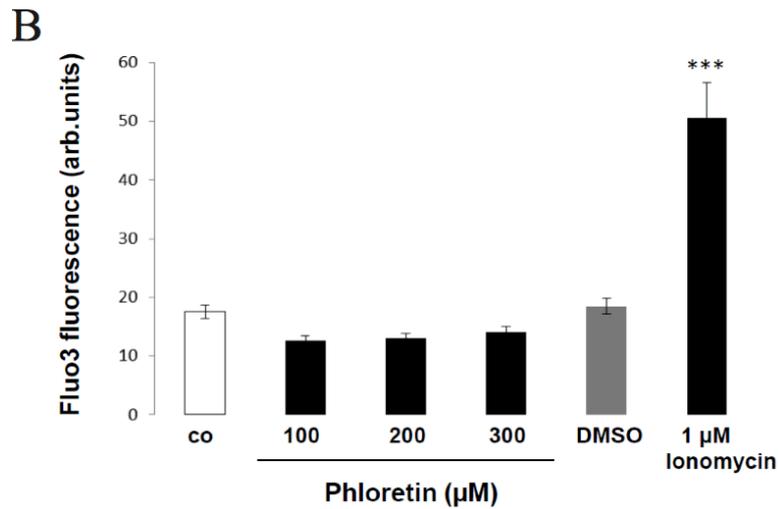


Abbildung 18b: Arithmetisches Mittel der Fluo3-Fluoreszenz (Bissinger + Fischer, 2014)

B Arithmetisches Mittel \pm SEM (n = 10) der Fluo3-Fluoreszenz von Erythrozyten nach 48 Stunden Exposition in Ringer-Lösung ohne (weiße Säule) und mit (schwarze Säulen) Phloretin (100-300 μ M). Es konnte keine signifikante Abweichung durch Zugabe von Phloretin erreicht werden. Zum Vergleich wurde der Effekt von 3 μ l DMSO/ml Ringer-Lösung (graue Säule) und des Calcium-Ionophors Ionomycin untersucht und hier gezeigt (1 μ M, 60 min, schwarze Säule).

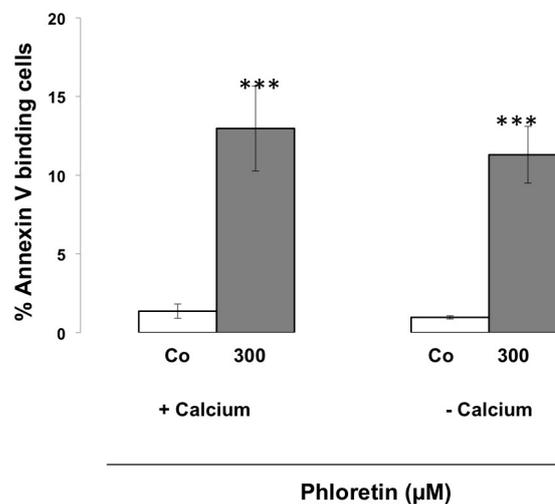


Abbildung 19: -Calcium/+Calcium (Bissinger+Fischer, 2014)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n = 4) der erythrozytären Phosphatidylserin-Exposition nach 48 Stunden Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weiße Säulen) und mit (graue Säulen) 300 μ M Phloretin in Anwesenheit (linke Säulen, + Calcium) und Abwesenheit (rechte Säulen, - Calcium) von extrazellulärem Calcium. ***($p < 0.001$) zeigt signifikante Abweichungen zwischen den Messergebnissen an, die unter Ab- und Anwesenheit von Phloretin erhoben wurden.

5.4 Messung der Ceramid-Häufigkeit

Es ist bekannt, dass Erytose durch Ceramid vermittelt werden kann. Wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, sensitiviert es die Scramblase für intrazelluläres Calcium und sorgt so für eine gesteigerte Phosphatidylserinexposition. Dies wiederum verstärkt die Phagozytose.

Die Häufigkeit von Ceramid wurde, wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben, mit Hilfe eines spezifischen, monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörpers ermittelt.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, lies sich bei den untersuchten Erythrozyten eine signifikant erhöhte Ceramid-Quantität an der Erythrozytenoberfläche nachweisen, nachdem man sie 48 Stunden 100 μM beziehungsweise 300 μM Phloretin ausgesetzt hatte.

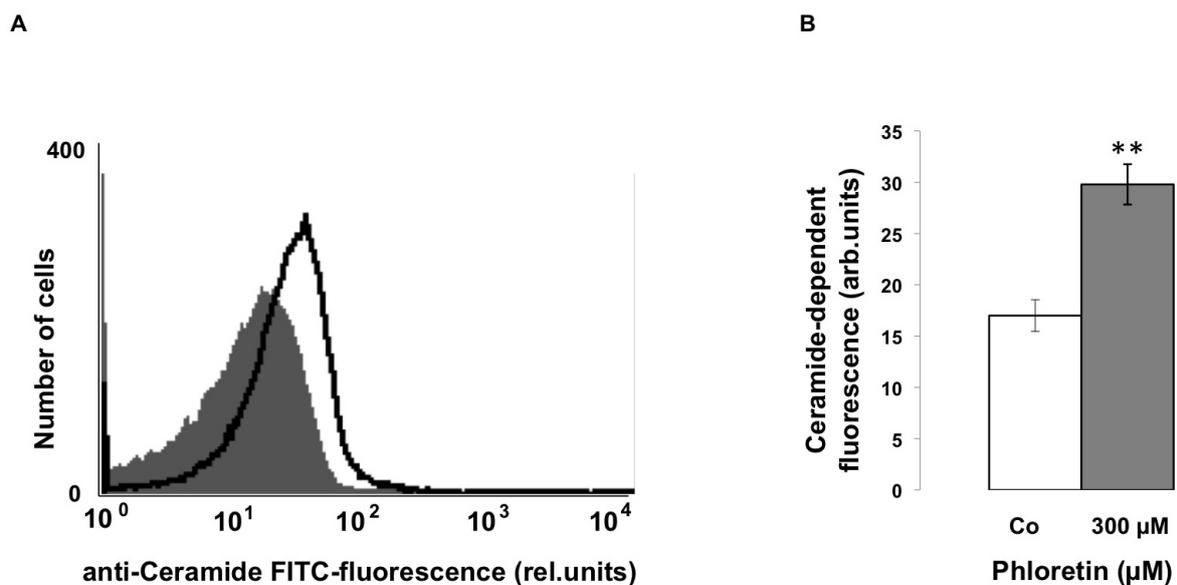


Abbildung 20: Effekt von Phloretin auf das Verhalten von Ceramid (Bissinger+Fischer, 2014)

A Histogramm der Ceramid-Häufigkeit an Erythrozytenoberflächen nach 48 h Inkubation in Ringer-Lösung ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) Anwesenheit von 300 μM Phloretin.

B Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=4$) der Ceramid-Häufigkeit nach 48h Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weiße Säulen) und mit 300 μM Phloretin (graue Säule). ** ($p < 0.01$) zeigt signifikante Abweichungen im Vergleich zur Abwesenheit von Phloretin (t test).

Der durch 300 μM Phloretin erreichte Anstieg der Ceramid-Häufigkeit an der Erythrozytenoberfläche ließ sich nicht signifikant beeinflussen durch die Zugabe saurer Sphingomyelinase-Inhibitoren. Sie erreichte 24.2 ± 2.1 (arbitrary units) in deren Abwesenheit ($n = 3$), 23.7 ± 1.6 (arb. U.) in Anwesenheit von 0.01 μM Amitriptylin ($n = 3$) und 24.8 ± 1.8 (arb. U.) unter Verwendung von 10 μM Zoledronsäure ($n = 3$).

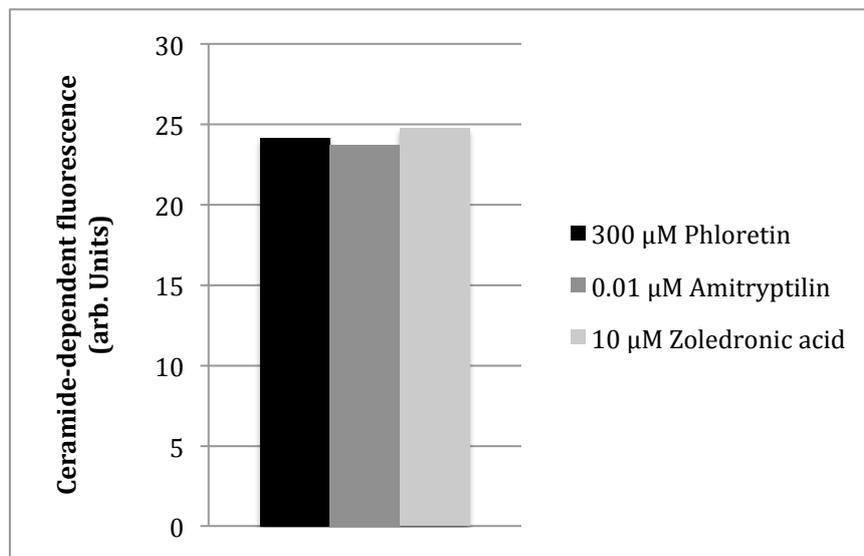


Abbildung 21: Ceramid-Häufigkeit

Arithmetisches Mittel ($n=3$) der Ceramid-Häufigkeit (arbitrary Units) nach Zugabe von 300 μM Phloretin (schwarz), 300 μM Phloretin + 0,01 μM Amitriptylin (dunkelgrau) und 300 μM Phloretin + 10 μM Zoledronic Acid (hellgrau). Es ist keine signifikante Abweichung zu erkennen.

Ebenso ließ sich auch die durch 300 μM Phloretin herbeigeführte, erhöhte Phosphatidylserin-Exposition nicht signifikant durch die Zugabe von sauren Sphingomyelinase-Inhibitoren modifizieren. Sie erreichte 14.0 ± 2.3 arb. U. ($n = 4$) in deren Abwesenheit, 13.8 ± 2.3 arb. U. ($n = 4$) mit $0.01 \mu\text{M}$ Amitriptylin und 12.0 ± 1.5 arb. U. ($n = 4$) unter Verwendung von $10 \mu\text{M}$ Zoledronsäure.

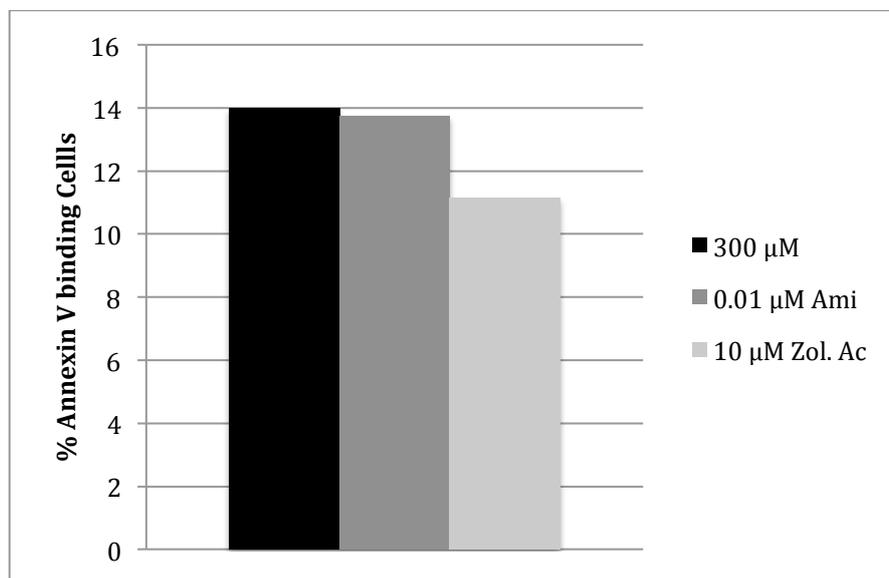


Abbildung 22: Phosphatidylserin-Exposition mit Inhibitoren

Arithmetisches Mittel ($n=4$) der Phosphatidylserin-Exposition (arb. Units) nach Zugabe von $300 \mu\text{M}$ Phloretin (schwarz), $300 \mu\text{M}$ Phloretin + $0,01 \mu\text{M}$ Amitriptylin (dunkelgrau) und $300 \mu\text{M}$ Phloretin + $10 \mu\text{M}$ Zoledronic Acid (hellgrau). Es lässt sich keine signifikante Abweichung erkennen.

5.5 Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben, kann das Zellmembran-Scrambling durch die Aktivierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase eingeleitet werden. Zum Zwecke der Untersuchung, ob dies im Falle von Phloretin zutrifft, wurden Erythrozyten für 48 Stunden Phloretin ausgesetzt (300 μ M), jeweils in der An- und Abwesenheit des p38-Kinase Inhibitors SB203580 (2 μ M). Es ergab sich nach der Inkubation mit Phloretin ein Anstieg an Annexin-V-bindenden Erythrozyten von 1.9 ± 0.2 auf 19.3 ± 1.9 % ($n = 8$) in Abwesenheit von SB203580 und von 1.7 ± 0.1 auf 18.1 ± 1.6 % ($n = 8$) in Anwesenheit von SB203580. Dies zeigt, dass der p38-kinase Inhibitor SB203580 zu keinem signifikanten Ergebnisunterschied führt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

Es wurde eine Positiv-Kontrolle durchgeführt, die in der Herbeiführung eines hyperosmotischen Schocks bestand. Hierzu wurden die Erythrozyten über 6 Stunden 550mM Saccharose ausgesetzt. Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, war der prozentuale Anteil an Phosphatidylserin-exponierenden Erythrozyten in der Anwesenheit von SB203580 (2 μ M, $p < 0.001$) signifikant geringer (11.9 ± 0.8 , $n = 8$) als in dessen Abwesenheit (15.0 ± 0.6 , $n = 8$).

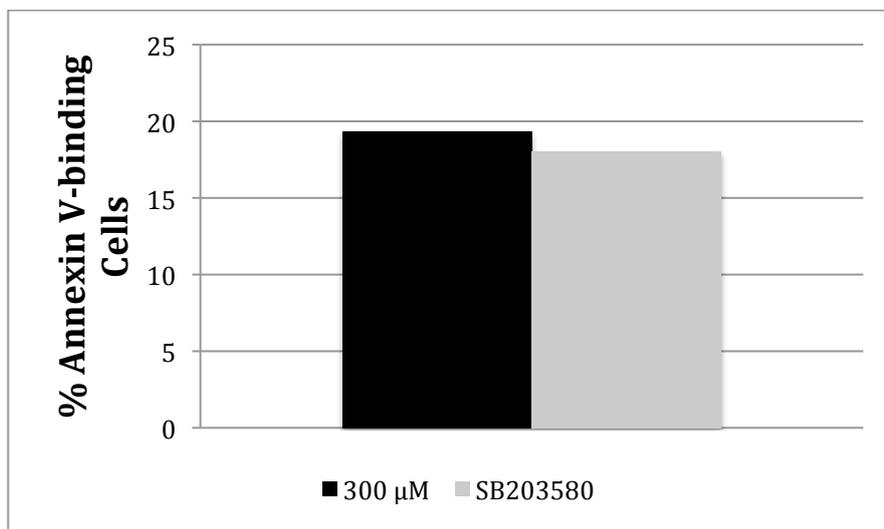


Abbildung 23: Annexin-V-Bindung

Arithmetisches Mittel ($n=8$) der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten (arb. U.) nach Inkubation mit 300 μ M Phloretin (schwarz) und mit 300 μ M Phloretin + 2 μ M SB203580 (grau). Es ist keine signifikante Abweichung zu erkennen.

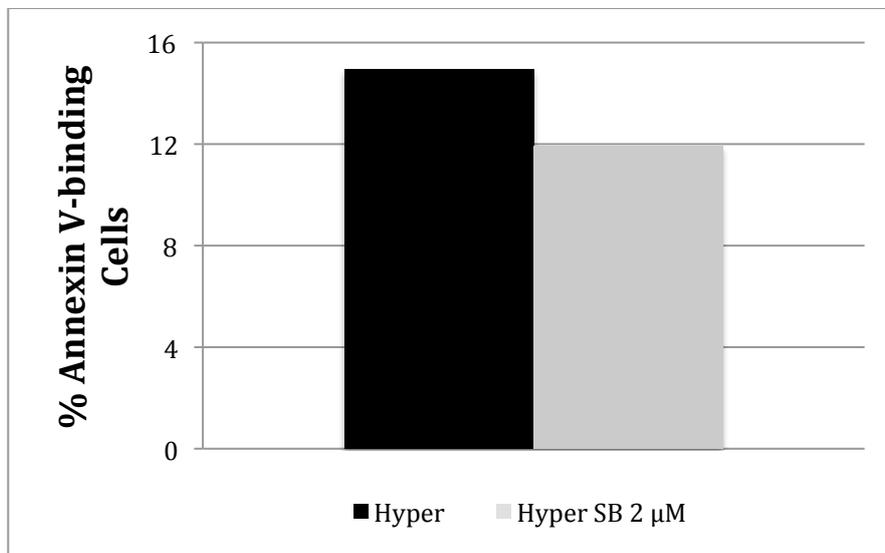


Abbildung 24: Positivkontrolle hyperosmotischer Schock

Arithmetisches Mittel (n=8) der Positivkontrolle nach Auslösen eines hyperosmotischen Schocks mit 550 mM Saccharose ohne (schwarz) und mit 2 µM SB203580 (grau). Es ist eine signifikant erhöhte Phosphatidylserin-Exposition in Abwesenheit des Inhibitors zu erkennen.

5.6 Proteinkinase C

Es wurde untersucht, ob das Zellmembran-Scrambling in Folge einer Aktivierung der Proteinkinase C auftritt. Zu diesem Zweck wurden die Proben mit Staurosporin (1µM) versetzt, einem Proteinkinase-C-Inhibitor. In dieser Experimentenreihe ergab sich nach Zugabe von Phloretin (300µM) ein prozentualer Anstieg der Annexin-V-bindenden Erythrozyten von 1.8 ± 0.3 auf 23.6 ± 2.1 % (n = 8) in Abwesenheit von Staurosporin und von 2.1 ± 0.3 auf 23.4 ± 2.0 % (n = 8) in dessen Anwesenheit. Es konnte also kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen gezeigt werden.

In der Positiv-Kontrolle, dem Entzug von Glucose über 48 Stunden, war die Phosphatidylserin-Exposition signifikant geringer in der Anwesenheit von Staurosporin (1 µM Staurosporin; 17.2 ± 0.8 ; n = 8) als in dessen Abwesenheit (22.7 ± 1.0 , n = 8).

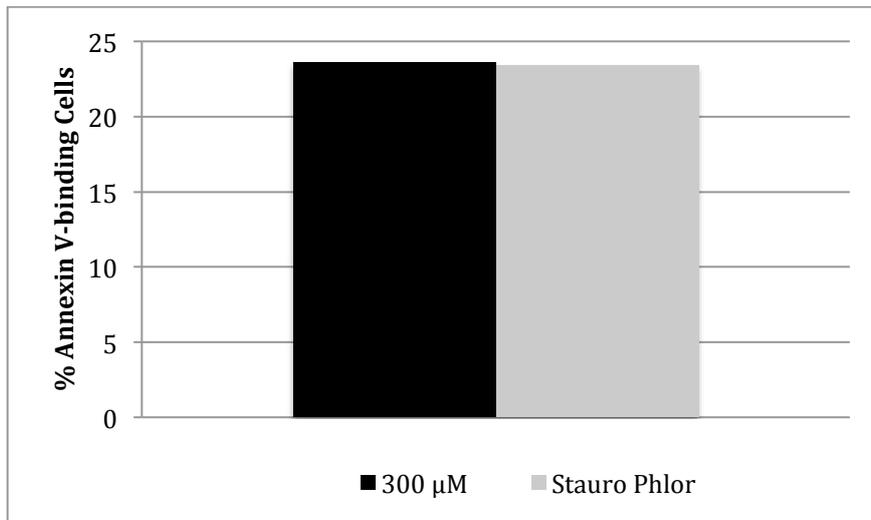


Abbildung 25: Annexin-V-Bindung mit Staurosporin

Arithmetisches Mittel (n=8) der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach Inkubation mit 300 µM Phloretin (schwarz) und mit 300 µM Phloretin + 1 µM Staurosporin (grau). Es ist keine signifikante Abweichung zu erkennen.

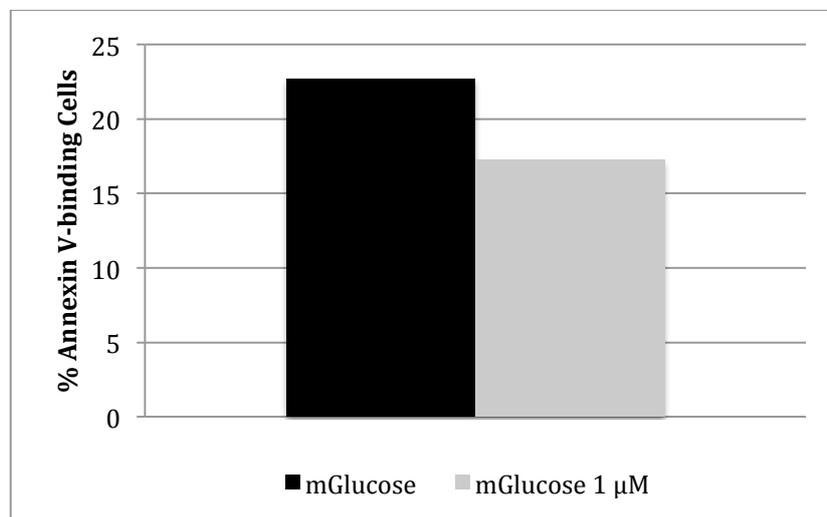


Abbildung 26: Positivkontrolle Glucoseentzug

Arithmetisches Mittel (n=8) der Positivkontrolle nach Glucoseentzug über 48h. Gezeigt ist die Annexin-V-Bindung ohne (schwarz) und mit 1 µM Staurosporin (grau). Es ist eine signifikante erhöhte Phosphatidylserin-Exposition in Abwesenheit des Inhibitors zu erkennen.

5.7 Messung des ATP-Gehalts

Es ist bekannt, dass Eryptose unter anderem durch Energieverlust hervorgerufen werden kann. Darum untersuchten weitere Experimente, ob Phloretin den erythrozytären ATP-Gehalt herabsetzt. Wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, wurde mit Hilfe von vier verschiedenen ATP-Konzentrationen eine Standardkurve erstellt, um für die aus den Versuchen ermittelten Werte Vergleichswerte zu erzeugen. Die Standardkurve ist in Abbildung 27 dargestellt. Nach 48 Stunden Inkubation ergab sich ein mittlerer Messwert von $168,7 \pm 29,37$ ($n = 4$) in der Abwesenheit von Phloretin und von $165,7 \pm 28,29$ ($n = 4$) in der Anwesenheit von Phloretin ($300 \mu\text{M}$). Auch hier unterscheiden sich die jeweiligen Ergebnisse nicht signifikant. Im Gegensatz hierzu ergab sich nach 48-stündigem Glukose-Entzug ein signifikanter Abfall des ATP-Wertes ($32,08 \pm 4,368$ ($n = 4$)). Dies ist in Abbildung 28 dargestellt.

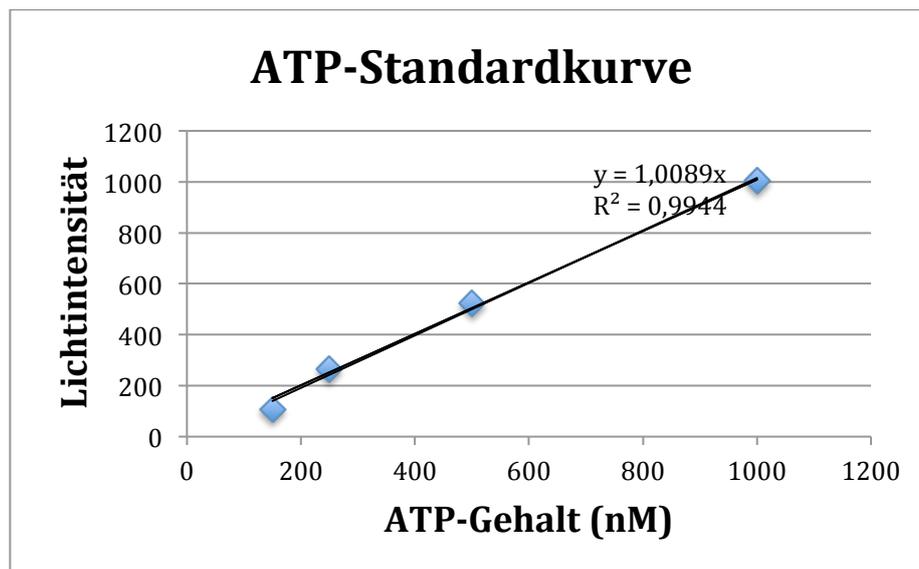


Abbildung 27: ATP-Standardkurve

Die ATP-Standardkurve zeigt, dass sich die Lichtintensität proportional zum ATP-Gehalt (nM) verhält. Die Gerade wurde mit den ATP-Konzentrationen von 150, 250, 500 und 1000nM erstellt. $y=1,0089x$ stellt die Geradengleichung dar. R^2 gibt das Bestimmtheitsmaß an.

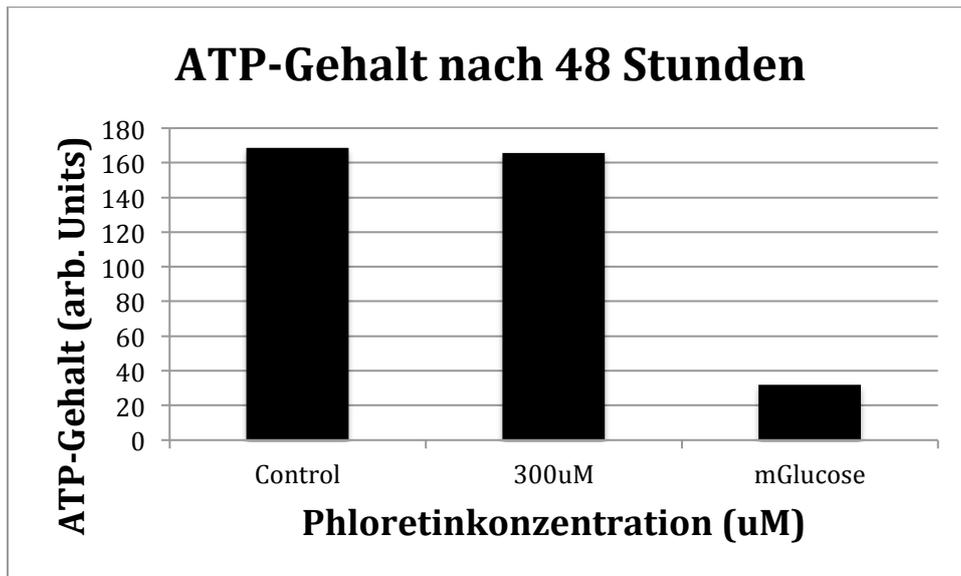


Abbildung 28: Effekt von Phloretin auf die ATP-Konzentration von Erythrozyten

Arithmetisches Mittel (n=4) des intrazellulären ATP-Gehalts (arb. Units) nach 48 h in Ringer-Lösung mit 0 μM und 300 μM Phloretin. Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Zum Vergleich rechts das Ergebnis nach Glukoseentzug.

6 Diskussion

6.1 Methodendiskussion

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung der Eryptose. Mögliche Fehlerquellen, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnten, wurden bestmöglich vermieden. So befindet sich das FACS - Calibur in einem abgedunkelten Raum, um Streulichteinflüsse zu vermeiden. Es wird nach jeder Messung gereinigt, um Verunreinigungen vorzubeugen. Das Gerät ist auf einem schwingungsarmen Tisch gelagert. Dieser dient der Vermeidung von Vibrationen, die die Ergebnisse beeinflussen könnten.

Beim Messen der Proben wurde zuerst ein Gate festgelegt, welches die zu untersuchende, relevante Zellpopulation abgrenzt. Dies beeinflusst das Ergebnis lediglich in einem Maß, welches für das Endergebnis zu vernachlässigen ist.

Die verwendeten Substanzen wurden vor und nach Gebrauch luftdicht verschlossen und entsprechend der Herstellerangaben bei +4 °C oder -20 °C gelagert. Lichtempfindliche Substanzen wurden in lichtgeschützten Behältern aufbewahrt.

Die Experimente wurden unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Lösungen wurden unter einer Sterilbank hergestellt und in regelmäßigen Abständen erneuert, um Verunreinigungen vorzubeugen. Dennoch können kleinere Verunreinigungen der Proben und Substanzen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Solche Verunreinigungen können sich beispielsweise durch stark abweichende Messergebnisse darstellen. Kam es im Verlauf dieser Studie zu solchen, wurden die betroffenen Experimente wiederholt oder die jeweiligen Messergebnisse aussortiert.

6.2 Ergebnisdiskussion

Das Flavonoid Phloretin wird in der westlichen Kultur regelmäßig mit der Nahrung aufgenommen. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass es einen Einfluss auf die Apoptose von Zellen ausübt. In geringen Konzentrationen besitzt es eine schützende Funktion, wohingegen höhere Konzentrationen eine proapoptotische Wirkung entwickeln. Über die Auswirkungen von Phloretin auf den programmierten Zelltod von Erythrozyten, auch als Eryptose bezeichnet, war bisher wenig bekannt. Vorausgehende Studien zeigten, dass Phlorizin, ein Glykosid von Phloretin, antiapoptotisch wirkt. Da die Bioverfügbarkeit von Phloretin deutlich höher ist, stellte sich die Frage, ob es ebenfalls einen Einfluss auf Erythrozyten ausübt.

Die vorliegende Studie zeigt, dass der Kontakt von Erythrozyten mit Phloretin ein Zellmembran-Scrambling zur Folge hat, was bedeutet, dass er zu einer Phosphatidylserin-Exposition an der Erythrozytenoberfläche führt. Dies ist das Hauptkennzeichen der sogenannten Eryptose, beziehungsweise dem programmierten Zelltod von Erythrozyten. Dies bedeutet, dass Phloretin in der verwendeten Konzentration eine Phlorizin entgegengesetzte Wirkung entfaltet.

In vorausgehenden Studien konnte festgestellt werden, dass mit einer Phloretinkonzentration von 200 μM in vitro die Apoptose von Leber-Carcinomzellen herbeigeführt werden konnte. Nach Kombination mit Paclitaxel zeigten bereits Konzentrationen von 50-150 μM eine proapoptotische Wirkung (Wu et al., 2009; Yang et al., 2009). Eine Dosis von 10 mg/kg war ausreichend, um das Tumorwachstum in vivo zu verlangsamen. Die in vivo-Plasma-Konzentrationen, die nach Gabe dieser Dosis erzielt werden konnten, wurden von den Autoren nicht angegeben. Diese Konzentrationen decken sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen, aus denen ersichtlich wird, dass Phloretin ab einer Konzentration von 100 μM Eryptose verursacht. Bei den hier verwendeten Konzentrationen von 200 μM und 300 μM erhöht sich die Signifikanz der Ergebnisse weiter.

Geringere Dosen an Phloretin scheinen dagegen eine schützende Wirkung gegenüber der Apoptose zu entfalten. So konnte gezeigt werden, dass die durch Cisplatin verursachte Apoptose von äußeren Haarzellen des Corti-Organs in vitro mit Hilfe von Phloretin (1-20 μM) verringert werden kann (Choi, 2011).

Es lässt sich also festhalten, dass die Wirkungsweisen von Phloretin konzentrationsabhängig sind.

Der Kontakt mit Phloretin bewirkte kein Schrumpfen der Erythrozyten, beziehungsweise keinen verminderten Forward Scatter. Die Zellschrumpfung ist ein weiteres Markenzeichen der Eryptose. Sie wird hauptsächlich verursacht durch die Anhäufung von Calcium im Zytosol, mit anschließender Aktivierung von Calciumsensitiven, auswärtsgerichteten Kaliumkanälen. Kalium verlässt die Zelle, es kommt zu einer Hyperpolarisation, gefolgt von Chlorid-Ausstrom und einem osmotischen Flüssigkeitsentzug entlang des Gradienten in Folge des KCL-Verlusts (Lang, 2003). Durch die Fluo3-Fluoreszenz ließ sich kein durch Phloretin bewirkter, intrazellulärer Calciumanstieg nachweisen. Die Phosphatidylserin-Exposition auf der äußeren Erythrozytenmembran erfolgte also völlig unabhängig von einer gesteigerten, intrazellulären Calciumkonzentration.

Desweiteren konnte ein Energieverlust als Ursache für das Scrambling ausgeschlossen werden, da sich nach dem Kontakt der Erythrozyten mit Phloretin, anders als bei Glucose-Entzug, kein Abfall des ATP-Gehalts nachweisen ließ.

Zudem konnte die durch Phloretin verursachte gesteigerte Phosphatidylserin-Exposition nicht durch die Zugabe des Proteinkinase-C-Inhibitors Staurosporin abgeschwächt werden. Anders verhielt es sich mit der Positivkontrolle, der durch Energieverlust herbeigeführten Eryptose. Hier war der durch Staurosporin bewirkte Unterschied signifikant.

Die pharmakologische Inhibition der p38-Kinase durch SB203580, welche eine Rolle im Auslösemechanismus der Eryptose nach osmotischem Schock spielt (Lang et al., 2012), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den Eryptose-Ablauf nach Phloretin-Zugabe.

In weiteren Experimenten ließ sich aber nachweisen, dass das Zellmembran-Scrambling gemeinsam mit einer gesteigerten Ceramid-Häufigkeit in der erythrozytären Membran auftritt. Der Ceramid-Anstieg konnte nicht durch die Sphingomyelinase-Inhibitoren Amitriptylin oder Zoledronsäure inhibiert werden. Sphingomyelinasen sind membranständige oder im Zytosol lokalisierte Enzyme. Nach Aktivierung spalten sie die Phosphodiesterbindung des Membranlipids Sphingomyelin, wobei unter anderem Ceramid entsteht. Da weder Amitriptylin noch Zoledronsäure einen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse hatte, muss angenommen werden, dass die gesteigerten Ceramid-Werte nicht durch eine

Aktivierung der Sphingomyelinasen verursacht wurden. So bleibt der Mechanismus, welcher zur Phloretin-induzierten Eliminierung von Erythrozyten führt, ungeklärt. Möglicherweise könnte aber eine Translokation von Ceramid zur Erythrozytenoberfläche anstelle dessen Bildung ursächlich dafür sein. Ceramid ist ein sehr starker Auslöser der Eryptose (Lang, 2012). Um dies genauer zu untersuchen, wären weitere Experimente notwendig.

Die Eryptose spielt auch bei der physiologischen Abwehr der Malaria eine Rolle. Der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* dringt in Erythrozyten ein und verursacht dort oxidativen Stress. Dieser wiederum sorgt für die Aktivierung von Ca^{2+} -durchgängigen Kationenkanälen in diesen Erythrozyten (Kirk, 2001.) Der Ca^{2+} -Einstrom durch diese Kanäle leitet die Eryptose ein und sorgt für die rasche Eliminierung der betroffenen Zellen aus dem Blutkreislauf. Eine gesteigerte Eryptose wirkt so der Verbreitung des Parasiten entgegen und nimmt positiven Einfluss auf den klinischen Krankheitsverlauf der Malaria (Foller, 2009). Einige genetisch bedingte, erythrozytäre Störungen schützen vor einem schweren Verlauf der Malaria, zum Teil aufgrund vermehrter Eryptose. So beispielsweise die Sichelzellenanämie, Beta-Thalassämie und der homozygote HbC- und G6PD(glucose-6-phosphate dehydrogenase)-Mangel (Cappadoro, 1998). Der klinische Verlauf von Malaria wird ebenfalls positiv beeinflusst durch andere Erkrankungen mit einhergehender, gesteigerter Eryptose, so zum Beispiel bei Eisenmangel oder bei Zufuhr von Eryptose-auslösenden Xenobiotika, wie zum Beispiel Blei (Koka et al., 2007), Chlorpromazin (Koka et al., 2008) oder Stickstoffmonoxid(NO)- Synthase-Inhibitoren (Koka et al., 2008).

In der Theorie könnte Phloretin ebenso die Eryptose von *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten einleiten. Darüber hinaus ist bekannt, dass Phloretin störend in einige Transportprozesse des Parasiten oder auch des Wirts, also des Erythrozyten, eingreift (Ginsburg (1983), Silfen (1988), Tripatara (1986)).

Die gesteigerte Eliminierung der roten Blutkörperchen kann aber wiederum selbst pathophysiologische Bedeutung gewinnen, sollte diese nicht durch eine gesteigerte Bildung neuer Erythrozyten ausgeglichen werden. Denn es wären nicht nur erkrankte Erythrozyten von Eryptose betroffen, sondern auch die gesunden. Sollte der Organismus nicht in der Lage sein, die erhöhte Eliminierung von roten

Blutkörperchen durch eine gesteigerte Erythropoese zu kompensieren, käme es zur Entwicklung einer Anämie.

Jede in vitro Studie sollte bezüglich ihrer Bedeutung auf den lebenden Organismus hinterfragt werden. Durch Absorption, Metabolisierung und andere mögliche Einflussfaktoren, kann die Konzentration von Phloretin im Körper stark variieren, bleibt aber deutlich hinter den von uns verwendeten Konzentrationen zurück. Studien haben gezeigt, dass die maximale Konzentration an Flavonoiden im menschlichen Plasma, die durch Nahrungsaufnahme erreicht werden kann, bei 1 bis 2 μM liegt (Watzl, 2001). So beeinflusst beispielsweise bereits die Anbauweise und die Verarbeitung den Gehalt an Flavonoiden in verschiedenen Lebensmitteln. So enthalten mit Pestiziden behandelte Äpfel mehr Phloretin als ungespritzte, industriell gepresste Säfte sind reicher an Phloretin als handgepresste und Schalen oder Erhitzen vermindert den Flavonoidgehalt deutlich (Chinnici, 2004; Manach 2004; Tomas-Barberan, 2000).

Die von uns verwendeten Dosen haben daher nur pharmakologische Bedeutung. Eine gesteigerte Eryptose aufgrund von durch die Nahrung aufgenommenem Phloretin ist auszuschließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Phloretin das Zellmembran-Scrambling, beziehungsweise die vermehrte Exposition von Phosphatidylserin, stimuliert; ein Effekt der durch die erhöhte Anhäufung von Ceramid an der Erythrozytenoberfläche begleitet und möglicherweise begründet wird. Diese wiederum führt zur Phagozytose und so zur Eliminierung der betroffenen Zelle.

Die erhobenen Ergebnisse zeigen ein pharmakologisches Potential auf im Hinblick auf Erkrankungen, für deren Behandlung sich eine gesteigerte Eryptose günstig auswirken würde. Dieses Potential sollte durch weitere Studien untersucht und genutzt werden.

Bis dahin bleibt zu hoffen, dass die zahlreichen, bereits nachgewiesenen, positiven Effekte von Phloretin ihre Wirkung durch gezielte Ernährung entfalten und Erkrankungen vorgebeugt werden können. Schließlich kommt Phloretin in unserer westlichen Nahrung reichlich vor.

So soll auch hier zuletzt zur Verdeutlichung ein Sprichwort Erwähnung finden, welches bereits in vielen anderen Studien aufgegriffen wurden: „An apple a day keeps the doctor away.“

7 Zusammenfassung

Der Begriff der Eryptose beschreibt die in den kernlosen Erythrozyten nachgewiesene Form der Apoptose. Wie bei kernhaltigen Zellen erfolgt im Rahmen der Eryptose auch bei Erythrozyten eine Phosphatidylserin-Exposition auf der Zelloberfläche mit anschließender Zellschrumpfung und Abschnürung multipler Zellvesikel. Alle drei Effekte können unter Verwendung der FACS-Analyse dargestellt werden.

2013 konnte die inhibierende Wirkung von Phlorizin auf die Eryptose nachgewiesen werden (Meier, 2013). Phlorizin kommt in zahlreichen endemischen Früchte- und Gemüsesorten vor und wird daher regelmäßig mit der natürlichen Nahrung in den Körper aufgenommen. In wässriger Lösung, wie zum Beispiel unserem Organismus, wird Phlorizin zu Phloretin und Zucker hydrolysiert. Aufgrund der fehlenden Glykolisierung verfügt Phloretin im Vergleich sogar über eine höhere Bioverfügbarkeit. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Phloretin in kernhaltigen Zellen Apoptose auslösen kann (Lee 2014, Kobori 1997 und 1999).

In dieser Studie wurde *in vitro* untersucht, welchen Einfluss Phloretin auf das Apoptoseverhalten von Erythrozyten ausübt.

Hierfür wurde, unter Hinzugabe verschiedener Mengen von Phloretin, die Phosphatidylserin-Exposition, das Zellvolumen sowie die intrazelluläre Calciumkonzentration in Erythrozyten untersucht. Zusätzlich wurde die Ceramidkonzentration ermittelt.

Nach Exposition mit Phloretin konnte eine erhöhte Phosphatidylserin-Exposition an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dies ging jedoch nicht mit einer signifikanten Veränderung des Zellvolumens oder der intrazellulären Calciumkonzentration einher.

Zur Aufklärung des dem Zellmembran-Scramblings zu Grunde liegenden Mechanismus wurde der ATP-Gehalt der Erythrozyten in phloretinhaltiger Lösung untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle, sodass ein Energiemangel als Ursache ausgeschlossen werden konnte. Ebenso zeigte eine Inhibition der Proteinkinase-C sowie der p38-Kinase keine signifikanten Veränderungen der Ergebnisse.

Es konnte eine erhöhte Ceramid-Häufigkeit in der Erythrozytenmembran nachgewiesen werden. Dies konnte nicht durch Inhibition der Sphingomyelinase

beeinflusst werden. So ist anzunehmen, dass es im Zusammenhang mit Phloretin eher zu einer Umverteilung von Ceramid als zu einer Bildung dessen kommt.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Phloretin zu einer erhöhten Phosphatidylserin-Exposition und dadurch zu einer erhöhten Erythrozyten-Eliminierung durch Makrophagen führt.

8 Literaturverzeichnis

Abed M, Towhid ST, Mia S, Pakladok T, Alesutan I, Borst O, Gawaz M, Gulbins E, Lang F (2012) - „Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells“. *Am J Physiol Cell Physiol*; 303:C991-999

Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ (2010) – „Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B“. *Immunol Rev.* 235(1):105-16.

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

Almeida C. B., Botelho Souza L.E., Maranhão Costa F.T., Werneck C., Covas D.T, Costa F.F. und Conran N. (2013) – „Acute inflammatory Processes are induced by Hemolysis and reversed by Hydroxyurea“. *Blood*: 122 (21)

Andersen O.M. und Markham K.R. (2006) – „Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications“. CRC-Verlag, Seiten 219-262.

Andrews DA, Low PS (1999) – „Role of red blood cells in thrombosis“. *Curr Opin Hematol* 6:76-82.

Ayim, AO (2014) – „Molekulare Mechanismen der Streptococcus pneumoniae-induzierten endothelialen Apoptose“. Dissertation, Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

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.

Bernales, S. (2006) – „Intracellular signaling by the unfolded protein response“. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:487–508

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Ron D (2000) – „Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response“. *Nat Cell Biol* 2(6):326-32

Birka, C., Lang, P. A., Kempe, D. S., Hoefling, L., Tanneur, V., Duranton, C., Nammi, S., Henke, G., Myssina, S., Krikov, M., Huber, S. M., Wieder, T. und Lang, F. (2004) - „Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion“. *Pflugers Arch* 448 5: S. 471-477

Bissinger, R., Barking, S., Alzoubi, K., Liu G., Liu G., Lang F. (2015) – „Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by the Antimalarial Drug Mefloquine“. *Cell Physiol Biochem* 36:1395-1405.

Bissinger R., Fischer S., Jilani K., Lang F. (2014) - „Stimulation of Erythrocyte Death by Phloretin“. *Cell Physiol Biochem*; 34:2256-2265

Boivin, Wendy Anne (2009) – „Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma“. *Laboratory Investigation* (2009) 89, 1195–1220

Borst O, Abed M, Alesutan I, Towhid ST, Qadri SM, Foller M, Gawaz M, Lang F (2012) – „Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX“. *Am J Physiol Cell Physiol* 302:C644-C651

Bosman, G. J., Willekens, F. L., und Werre, J. M. (2005) – „Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?“ *Cell Physiol Biochem.* 16 1-3:S. 1-8

Brand, V. B., Sandu, C. D., Duranton, C., Tanneur, V., Lang, K. S., Huber, S. M. und Lang, F. (2003) – „Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte“. *Cell Physiol Biochem.* 13 6 2003: S. 347-356

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.

Calliste CA, Bail JCL, Trouillas P, Pouget C, Habrioux G, Chulia AJ, Duroux JL (2001) – „Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities“. *Anticancer Res.* 21: 3949– 3956

Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P (1998) – „Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency“. *Blood*; 92:2527-2534

Chang D.W., Xing Z., Pan Y., Algeciras-Schimmich A., Barnhart B.C., Yaish-Ohad S., Peter M.E. and Yang X. (2002) - „c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis“. *EMBO J.*, 21, 3704–3714.

Chao EC, Henry RR (2010) – „SGLT2 inhibition - a novel strategy for diabetes treatment“. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 551– 559

Chaurio, R. A., C. Janko, et al. (2009) - „Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation." *Molecules* 14(12): 4892-4914

Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. (2004) – „Radical Scavenging Activities of Peels and Pulp of cv. Golden Delicious Apples as Related to Their Phenolic Composition“. *J Agric Food Chem*; 52: 4684-4689.

Choi BM, Xiao Y C, Shang S G, Rizhe Z, Bok-Ryang K (2011) – „Anti-apoptotic effect of phloretin on cisplatin-induced apoptosis in HEI-OC1 auditory cells“. *Pharmakological Reports*, 63, 708-716

Chou, J., Li, H., Salvesen, G., Yuan, J., and Wagner, G. (1999) - „Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling.“ *Cell* 96, 615-624

Chung SM, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Lee MY, Jung YS, Chung JH (2007) – „Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes“. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:414-421

Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR (1999) – „Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium“. *Br J Haematol* 107:300-302

Cohen, J. J. (1993) - „Apoptosis.“ *Immunology today* 14(3): 126-130

Collatz, K.-G. (1999) – „Apoptose“. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Crespy V, Aprikian O, Morand C, et al. (2002) – „Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats“. *J Nutr*; 132: 3227-3230.

Daugas, E., Cande, C. und Kroemer, G. (2001) – „Erythrocytes: death of a mummy“. *Cell Death.Differ.* 8 12: S. 1131-1133

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, et al. (1998) – „Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity“. *FEBS Lett*; 436:71–5

Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G (2003) – „Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter“. *Biochem Pharmacol*; 65:1199–206

Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G (1998) - „Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review).“ *International journal of oncology* 12(1): 141-152.

Dekkers, D. W., Comfurius, P., Bevers, E. M., und Zwaal, R. F. (2002) - „Comparison between Ca^{2+} -induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells“. *Biochem.J.* 362 Pt 3: S. 741-747

Deveraux Q.L., Reed J. C. (1999) – „IAP family proteins–suppressors of apoptosis“. *Genes & development*, ISSN 0890-9369. PMID 9990849

Ding M, Lu Y, Bowman L, et al. (2004) – „Inhibition of AP-1 and Neoplastic Transformation by Fresh Apple Peel Extract“. *J Biol Chem*; 279: 10670-10676

Duffy SJ, Keaney JF, Holbrook M, et al. (2001) – „Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease“. *Circulation*; 104: 151-156

Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH (200) – „Antioxidant activity of fresh apples“. *Nature*; 405: 903-904

Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., Pannekoek, W. J., Liu, W. M., Cramer, M. J., Lips, D. J., und Doevendans, P. A. (2004) – „Role of apoptosis in reperfusion injury“. *Cardiovasc. Res.* 61 3: S. 414-426

Ehrenkranz, J. R., N. G. Lewis, et al. (2005) – „Phlorizin: a review.“ *Diabetes/metabolism research and reviews* 21(1): 31-38

Eisele, K., Lang, P. A., Kempe, D. S., Klarl, B. A., Niemoller, O., Wieder, T., Huber, S. M., Duranton, C., und Lang, F. (2006) – „Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions“. *Toxicol Appl Pharmacol* 210 1-2: S. 116-122

Elmore, S. (2007) – „Apoptosis: a review of programmed cell death“. *Toxicologic pathology* 35(4): 495-516

Fan HT, Morishima S, Kida H, Okada Y (2001) – „Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cyclic AMP-activated, but not Ca-activated, Cl(-) channels“. *Br J Pharmacol*;133:1096-1106

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., 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.

Foller M, Bobbala D, Koka S, Huber SM, Gulbins E, Lang F (2009) – „Suicide for survival-death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria“. *Cell Physiol Biochem*; 24:133-140

Föller, M (2008) – „The regulation of erythrocyte survival and suicidal cell death“. *Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen. Kapitel 2.2.3*

Föller, M., Huber S.M., Lang F. (2008). "Erythrocyte programmed cell death." *IUBMB life* 60(10): 661-8.

Gallagher PG, Chang SH, Rettig MP, Neely JE, Hillery CA, Smith BD, Low PS (2003) – „Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis.“ *Blood* 101:4625-4627

Ginsburg H, Krugliak M, Eidelman O, Cabantchik ZI (1983) – „New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes“. *Mol Biochem Parasitol*; 8:177-190.

Green, D. R. (2003) - „Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system.“ *Immunological reviews* 193: 5-9

Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999) – „BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis“. *Cell* 13(15):1899-911.

Grunert, M. (2011) – „Die Charakterisierung des rezeptornahen Signalweges der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B“. Dissertation, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gülow, Karsten - „Zellulärer Stressabbau – Alles eine Frage der Regulation“. Biospektrum, April 2001, S. 321.

Güter, Carola (2008) – „Der Einfluss des Flavonoids Phloretin auf die Thrombozytenaktivität und die Aggregationshemmung.“ Dissertation, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Haimovitz-Friedman A., Kolesnick R.N. and Fuks Z. (1997) – „Ceramide signaling in apoptosis“. *British Medical Bulletin*. 53 (No 3) 539-553

Harrison HE, Bunting H, Ordway NK, Albrink WS (1947) – „The Pathogenesis of the Renal Injury Produced in the Dog by Hemoglobin or Methemoglobin“. *J Exp Med*; 86:339-356

Hengartner, M. O. (2000) – „The biochemistry of apoptosis.“ *Nature*. 407(6805): 770-776.

Hennino A., Berard M., Krammer P. H., Defrance T. (2001) - „FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis“. *J. Exp. Med.* 193, 447–458
10.1084/jem.193.4.447

Hermle, T.F. (2007) – „Programmierter Zelltod fetaler Erythrozyten“. Dissertation, Medizinische Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen

Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995) – „Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers“. *Am J Clin Nutr*;62:1276–82

Hu S., Vincenz C., Buller M. and Dixit V. M. (1997) - „A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis“. *J. Biol. Chem.* 272, 9621-9624.

Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M. und Krupitza, G. (2003) – „The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity“. *Mutat Res* 543 3: S. 235-249

Ito A., Uehara T., Tokumitsu A., Okuma Y., Nomura Y. (1999) – „Possible involvement of cytochrome c release and sequential activation of caspases in ceramide-induced apoptosis in SK-N-MC cells“. *Biochim Biophys Acta*. 1452:263-74

Jacobson, M. D., Weil, M., und Raff, M. C. (1997) – „Programmed cell death in animal Development“. *Cell* 88 3: S. 347-354

Jain, S.K. (1983) – „Vitamin E and stabilization of membrane lipid organization in red blood cells with peroxidative damage“. *Biomedica Biochimica Acta*, vol. 42, no. 11-12, pp. S43–S47

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

Kaufmann RJ, Back SH, Song B, Han J, Hassler J (2010) – „The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells.“ *Diabetes, Obesity and Metabolism* DOI: 10.1111/j.1463-1326.2010.01281.x

Kayßer P. (2002) – „Phagozytose und Apoptose von Lymphozyten in der Immunpathogenese der HIV-Erkrankung“. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

Kempe, D. S., Lang, P. A., Duranton, C., Akel, A., Lang, K. S., Huber, S. M., Wieder, T. und Lang, F. (2006) – „Enhanced programmed cell death of irondeficient erythrocytes“. *Faseb J* 20 2: S. 368-370

Kempe, D. S., Lang, P. A., Eisele, K., Klarl, B. A., Wieder, T., Huber, S. M., Duranton, C., und Lang, F. (2005) – „Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions“. *Am J Physiol Cell Physiol* 288 2: S. C396-C402

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. (1991) – „Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein“. *Science*; 252(5013):1708-11

Kim MS, Kwon JY, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ (2009) – „Phloretin induces apoptosis in H-Ras MCF10A human breast tumor cells through the activation of p53 via JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling“. *Ann N Y Acad Sci*;1171:479-483

Kishikawa, K., Chalfant C.E., Perry D.K., Bielawska A., Hannun Y. A. (1999) – „Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses“. *J Biol Chem*. 274:21335-41

Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammer PH (2000) - „Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells“. *Eur. J. Immunol*. 30(10):2765-74.

Kirk, K. (2001) – „Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte“. *Physiological reviews* 81(2): 495-537.

Klarl, B. A. (2007) – „Die Rolle der Proteinkinase C im Apoptoseprogramm der Erythrozyten nach Glukosedepletion“. Dissertation, Universität Tübingen

Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T, Shinohara K (1997) – „Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport“. *Cancer Lett*;119:207-212.

Kobori M, Iwashita K, Shinmoto H, Tsushida T (1999) – „Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells“. *Biosci Biotechnol Biochem*;63:719-725

Koka S, Huber SM, Boini KM, Lang C, Foller M, Lang F (2007) – „Lead decreases parasitemia and enhances survival of Plasmodium berghei-infected mice“. *Biochem Biophys Res Commun*; 363:484-489

Koka S, Lang C, Boini KM, Bobbala D, Huber SM, Lang F (2008) – „Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice“. *Cell Physiol Biochem*; 22:261-268

Koka S, Lang C, Niemoeller OM, Boini KM, Nicolay JP, Huber SM, Lang F (2008) – „Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice“. *Cell Physiol Biochem*; 21:481-488

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2001) - „Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c.“ *7(12):1166-73.*

Kucherenko Y., Geiger C., Shumilina E., Foller M. und F. Lang (2008) – „Inhibition of cation channels and suicidal death of human erythrocytes by zidovudine“. *Toxicology*, vol. 253, no. 1–3, pp. 62–69.

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.

Landolfi R, Mower RL, Steiner M. (1984) – „Modification of Platelet Function and Arachidonic Acid Metabolism by Bioflavonoids“. *Biochem Pharmacol*; 33: 1525-1530

Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Durantton, C., Wieder, T., Huber, S. M. und Lang, F. (2005) – „Mechanisms of suicidal erythrocyte death“. *Cell Physiol Biochem*. 15 5: S. 195-202

Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F. und Huber, S. M. (2003) – „Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis.“ *Am J Physiol Cell Physiol* 285 6: S. C1553-C1560

Lang, F., Lang, K.S., Lang, P., Huber, S. und Wieder, T. (2006) – „Mechanisms and significance of eryptosis“. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8(7-8): ,1183-1192

Lang, K. S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P. A., Berchtold, S., Huber, S. M., Lang, F., und Wieder, T. (2004) – „Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes“. *Cell Death.Differ.* 11 2 : S. 231-243

Lang, P. A., Kempe, D. S., Akel, A., Klarl, B. A., Eisele, K., Podolski, M., Hermle, T., Niemoeller, O. M., Attanasio, P., Huber, S. M., Wieder, T., Lang, F. und Durantton, C. (2005 b) – „Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines“. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372 3: S. 228-235

Lang, K. S., Myssina, S., Tanneur, V., Wieder, T., Huber, S. M., Lang, F. und Durantton, C. (2003 c) – „Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride“. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367 4: S. 391-396

Lang, K. S., Myssina, S., Lang, P. A., Tanneur, V., Kempe, D. S., Mack, A. F., Huber, S. M., Wieder, T., Lang, F., und Duranton, C. (2004 b) – „Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻“. *Am J Physiol Renal Physiol* 286 6: S. F1046-F1053

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., 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, E., Lang F. (2015) – „Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death“. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 513518, 16 pages

Lang, E., Modicano, P., Arnold, M., Bissinger, R., Faggio, C., Abed, M., Lang, F. (2013) – „Effect of Thioridazine on Erythrocytes“. *Toxins* 5(10), 1918-1931

Lang E, Qadri SM, Lang F (2012) – „Killing me softly - suicidal erythrocyte death“. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1236-1243

Lang, K. S., Roll, B., Myssina, S., Schittenhelm, M., Scheel-Walter, H. G., Kanz, L., Fritz, J., Lang, F., Huber, S. M., und Wieder, T. (2002) – „Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency“. *Cell Physiol Biochem* 12 5-6: S. 365-372

Lang, P. A., Huober, J., Bachmann, C., Kempe, D. S., Sobiesiak, M., Akel, A., Niemoeller, O. M., Dreischer, P., Eisele, K., Klarl, B. A., Gulbins, E., Lang, F. und Wieder, T. (2006a) – „Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel“. *Cell Physiol Biochem*. 18 1-3: S. 151-164

Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., Hermle, T., Attanasio, P., Akel, A., Schafer, R., Friedrich, B., Risler, T., Baur, M., Olbricht, C. J., Zimmerhackl, L. B., Zipfel, P. F., Wieder, T., und Lang, F. (2006b) – „Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome“. *JMol Med* 84 5: S. 378-388

Lang Florian und Lang Philipp - „Basiswissen Physiologie“. 2. Auflage, Kapitel 2.2 „Erythrozyten“.

Li F., Ackermann E. J., Bennett C.F., Rothermel A.L., Plescia J., Tognin S., Villa A., Marchisio P. C., D. C. Altieri D. C. (1999) – „Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function“. *Nature Cell Biology*, Band 1, Nummer 8, ISSN 1465-7392. PMID 10587640.

Lee EJ, Kim JL, Kim YH, Kang MK, Gong JH, Kang YH (2014) – „Phloretin promotes osteoclast apoptosis in murine macrophages and inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis in mice“. *Phytomedicine*;21:1208-1215

Lee JH, Regmi SC, Kim JA, Cho MH, Yun H, Lee CS, Lee J (2011) - „Apple flavonoid phloretin inhibits Escherichia coli O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats“. *Infect. Immun.* 79: 4819– 4827

Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY (2003) – „Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity“. *J Agric Food Chem*; 51: 6516-6520

Levine AJ (2009) - „The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53.“ *Virology.* 384(2):285-93.

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. (1997) – „Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade“. *Cell* 91:479–489.

Lupescu A., Bissinger R., Herrmann T., Oswald G., Jilani K., Lang F. (2014) - „Induction of Suicidal Erythrocyte Death by Novobiocin“. *Cell Physiol Biochem* 33:670-680

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. (2004) – „Polyphenols: food sources and bioavailability“. *Am J Clin Nutr*; 79: 727-747

Mandal D., Mazumder A. 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.

Mayer B, Schumacher M, Brandstätter H, Wagner FS, Hermetter A. (2001) – „High-Throughput Fluorescence Screening of Antioxidative Capacity in Human Serum“. *Anal Biochem*; 297: 144-153

McMahon, T. J., R. E. Moon, et al. (2002) – „Nitric oxide in the human respiratory cycle". *Nature medicine* 8(7): 711-717

Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E. (1997) – „FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)". *EMBO J.* 16:2794–2804.

Meier, Anja (2013) – „Der Einfluss von Phlorizin auf den programmierten Zelltod von Erythrozyten“. Dissertation, Physiologisches Institut, Universität Tübingen

Mengesdorf, Thorsten (2002) – “Die Rolle des endoplasmatischen Retikulums bei der Ausbildung des neuronalen Zellschadens“. Dissertation, Fakultät für Chemie, Ruhr-Universität Bochum

Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* 114(2): 181-190.

Mingqian L, Qingzhi K, Xinhua X, Hongda L, Zhongxin L, Wei Y, Bin Z, Jin S, Rong G (2015) – „Evaluation of Apoptotic and Growth Inhibitory Activity of Phloretin in

BGC823 Gastric Cancer Cell". Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 14 (1): 27-31

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.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. (1994) – „Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo“. Oncogene; 9(6):1799-805.

Miyashita T, Reed JC. (1995) – „Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.“ Cell; 80(2):293-9.

Miyoshi, H., Umeshita, K., Sakon, M., Imajoh-Ohmi, S., Fujitani, K., Gotoh, M., Oiki, E., Kambayashi, J., und Monden, M. (1996) – „Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury“. Gastroenterology 110 6: S. 1897-1904

Munz BM, Bauer GM, Schaefer CA, Erdogan A, Tillmanns H, Waldecker B, Kuhlmann CRW, Wiecha J (2005) – „Dietary flavonoid phloretin modulates Ca²⁺-activated K⁺ channels resulting in an increase of endothelial nitric oxide production“. Int. J. Pharmacol. 1: 38– 43

Müller, M. (2004) – „Survivin und seine alternativen Spleißvarianten: Untersuchungen zu ihrer Bedeutung für eine Zytostatika-induzierte Apoptose und ihren molekularen Interaktionspartnern.“ Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Myssina, S., Huber, S. M., Birka, C., Lang, P. A., Lang, K. S., Friedrich, B., Risler, T., Wieder, T. und Lang, F. (2003) – „Inhibition of erythrocyte cation channels by Erythropoietin“. J.Am.Soc.Nephrol. 14 11: S. 2750-2757

Naseem, K.M. (2005) – „The role of nitric oxide in cardiovascular diseases“. Mol Aspects Med, 26 (1–2), S. 33–65

Nelson, J. A. S., and Falk, R. E. (1993) – „The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth“. Anticancer Res., 13, 2287-229

Ng F.W., Nguyen M., Kwan T., Branton P.E., Nicholson D.W., Cromlish J.A., Shore G. C. (1997) – „p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum“. J. Cell Biol. 139:327–338.

Nguyen M., Millar D.G., Yong V.W., Korsmeyer S.J., Shore G.C. (1993) – „Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence“. J. Biol. Chem. 268:25265–25268

Nickels, J.T., and J.R. Broach (1996) – „A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of Saccharomyces cerevisiae“. Genes Dev. 10:382-94

Niemoeller OM, Foller M, Lang C, Huber SM, Lang F (2008) - „Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death“. *Cell Physiol Biochem.* 21(1-3):193-202.

Niemoeller, O. M., Kiedaisch, V., Dreischer, P., Wieder, T., und Lang, F. (2006) – „Stimulation of eryptosis by aluminium ions“. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*6-9- 2006

Niemoeller, O. M., Akel, A., Lang, P. A., Attanasio, P., Kempe, D. S., Hermle, T., Sobiesiak, M., Wieder, T., und Lang, F. (2006a) – „Induction of eryptosis by Cyclosporine“. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 374 1: S. 41-49

Olson ML, Kargacin ME, Ward CA, Kargacin GJ (2007) – „Effects of phloretin and phloridzin on Ca²⁺ handling, the action potential, and ion currents in rat ventricular myocytes“. *J Pharmacol Exp Ther*;321:921-929

Oyadomari S, Mori M (2004) – „Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress“. *Cell Death Differ.* 11(4):381-9.

Paris F., Grassme H., Cremesti A., Zager J., Fong Y., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Gulbins E., Kolesnick R. (2000) – „Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase^{super-/-} hepatocytes“. *J Biol Chem.*

Pellestor, F. (1995) – „The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos“. *Hum Reprod Update.* 1:581-5

Perutz, M. F. (1969) – „Structure and function of hemoglobin“. *Harvey Lect.* 63: S.213-261

Pockros PJ, Schiff ER, Shiffman ML, McHutchison JG, Gish RG, Afdhal NH, Makhviladze M, Huyghe M, Hecht D, Oltersdorf T, Shapiro DA (2007) – „Oral IDN-6556, an antiapoptotic caspase inhibitor, may lower aminotransferase activity in patients with chronic hepatitis C“. *46(2):324-9*

Prostko CR, Brostrom MA, Malara EM, Brostrom CO (1992) - „ Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78“. *J Biol Chem*; 267:16751–16754.

Qadri S. M., Mahmud H., Foller M. und F. Lang (2009) – „Inhibition of suicidal erythrocyte death by xanthohumol“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 16, pp. 7591–7595.

Rababah TM, Hettiarachchy NS, Horax R. (2004) – „Total Phenolics and Antioxidant Activities of Fenugreek, Green Tea, Black Tea, Grape Seed, Ginger, Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo Extracts, Vitamin E, and tert-Butylhydroquinone“. *J Agric Food Chem*; 52: 5183-5186

Reed, J. C. (2002) – „Apoptosis-based therapies“. *Nat.Rev.Drug Discov.* 1 2: S. 111-121

Repetto, M., Reides, C., Gomez Carretero, M. L., Costa, M., Griemberg, G. und Llesuy, S. (1996) – „Oxidative stress in blood of HIV infected patients“. Clin.Chim.Acta 255 2: S. 107-117

Rezk BM, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A (2002) - „The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids“. Biochem Biophys Res Commun;295:9-13.

Robert V, DeGeorgi F, Massimino ML, Cantini M, Pozzan T (1998) - „Direct monitoring of the calcium concentration in the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum of skeletal muscle myotubes.“ J Biol Chem. 273, 30372-30378.

Rossetti L, Smith D, Shulman GJ, Papachriston D, DeFronzo RA. (1987) – „Correction of Hyperglycemia with Phlorizin Normalizes Tissue Sensitivity to Insulin in Diabetic Rats“. J Clin Invest; 79: 1510-1515

Rouquet, N. et al. (1996) – „ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against in vivo liver apoptosis“. Curr Biol 6, no. 9,1192.

Ruvolo, P. P. (2003) – „Intracellular signal transduction pathways activates by ceramide and its metabolites“. Pharm. Res. 47, 383 – 392.

Ruvolo P.P., Deng X., Ito T., Carr B.K., May W.S. (1999) – „Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A“. J Biol Chem. 274:20296-300

Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, Okada S. (1990) – „Platelet Aggregation Inhibitors in Hot Water Extract of Green Tea“. Chem Pharm Bull; 38: 790-793

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.

Sawada M., Nakashima S., Banno Y., Yamakawa H., Hayashi K., Takenaka K., Nishimura Y., Sakai N., Nozawa Y. (2000) – „Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells“. Cell Death Differ. 7:761-72.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. (2005) – „Polyphenols: Antioxidants and beyond“. Am J Clin Nutr; 81: 215S-217S

Schaer D., Bühler P., Alayash A., Belcher J. und Vercellotti G. (2012) – „Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins“. Blood-2012-11-451229

Schmelz, K. (2002) - „TNF α -vermittelte Sensitivierung von malignen hämatologischen Zellen für Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose“. Dissertation, FU Berlin

Schulze-Osthoff K., Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998) - „Apoptosis signaling by death receptors“. Eur J Biochem 15;254(3):439-59.

Seigneuret, M. und Devaux, P. F. (1984) – „ATP-dependent asymmetric distribution of spinlabeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes“. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 81 12: S. 3751-3755

Shapiro, Howard M. (2003) – „Practical Flow Cytometry“. 4. Ausgabe, Wiley-Liss, New York

Sheridan, C. and S. J. Martin (2010). "Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis." Mitochondrion 10(6): 640-648.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) - „Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.“ 399(6735):483-7.

Shimohama S. (2000) – „Apoptosis in Alzheimer's disease - an update“. Apoptosis. 5(1):9-16.

Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H (2006) – „Er stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1“. J Cell Sci 119,3958-3966.

Silfen J, Yanai P, Cabantchik ZI (1988) – „Bioflavonoid effects on in vitro cultures of Plasmodium falciparum. Inhibition of permeation pathways induced in the host cell membrane by the intraerythrocytic parasite“. Biochem Pharmacol; 37:4269-4276

Siskind, L. J. (2005) Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. J. Bioenerg. Biomembr. 37, 143 – 153.

Skriabin G, Orlov S, Masse C, Berthiaume Y (2000) – „Phloretin inhibits Na⁺ and K⁺ uptake in cultured alveolar type II cells by reduction of cellular ATP content“. Exp Lung Res;26:319-333

Sopjani M, Föller M, Lang F (2008) - „Gold stimulates Ca²⁺ entry into and subsequent suicidal death of erythrocytes.“ Toxicology. 244(2-3):271-9

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H. and Walczak, H. (2000) - "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." Immunity 12(6): 599-609

Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A. and Walczak, H. (2002) - "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." EMBO J 21(17): 4520-4530.

Stangl V, Lorenz M, Ludwig A, Grimbo N, Guether C, Sanad W, Ziemer S, Martus P, Baumann G, Stangl K (2005) – „The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets“. J Nutr;135:172-178

Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann S, Schulz T (2012) – „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“. 7. Auflage. Kapitel 12, Seite 80.

Sukhorukov VL, Kurschner M, Dilsky S, Lisec T, Wagner B, Schenk WA, Benz R, Zimmermann U (2001) – „Phloretin-induced changes of lipophilic ion transport across the plasma membrane of mammalian cells“. *Biophys J*;81:1006-1013

Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Oltersdorf T. , Reed J. C. (1998) – „IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs“. *Cancer research* Band 58, Nummer 23, ISSN 0008-5472. PMID 9850056

Thompson CB (1995) - „Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease“. *Science*. 267(5203):1456-62.

Tomas-Barberan F, Clifford MN (2000) – „Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden“. *J Sci Food Agric*; 80: 1073-1080.

Tripathi A, Yuthavong Y (1986) – „Effect of inhibitors on glucose transport in malaria (*Plasmodium berghei*) infected erythrocytes“. *Int J Parasitol*; 16:441-446

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe E., Croce, C.M. (1985) – „Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma“. *Science*. 228(4706):1440-3.

VanderHeiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997) - „Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria.“ *Cell* 91:627–637

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) – „Surfing the p53 network“. *Nature*; 408(6810):307-10.

Vucic D., Stennicke H. R., Pisabarro M. T., Salvesen G. S., Dixit V. M. (2000) – „ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas“. *Current biology*, CB Band 10, Nummer 21, ISSN 0960-9822. PMID 11084335.

Wada, T. und Penninger, J.M (2004) - „Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation“. *Oncogene* 23, 2838–2849

Watzl B, Rechkemmer G (2001) – „Flavonoide.“ *Ernährungs-Umschau*; 48: 498-502

Woodcock, J. (2006) – „Sphingosine and Ceramide Signalling in Apoptosis“. *Life*, 58(8): 462 – 466

Wright EM (1998) – „Glucose Galactose Malabsorption.“ *Am J Physiology Gastrointest Liver Physiol*; 275: G879-82

Wu CH, Ho YS, Tsai CY, Wang YJ, Tseng H, Wei PL, Lee CH, Liu RS, Lin SY (2009) – „In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter“. *Int J Cancer*;124:2210-2219.

Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) – „Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds“. *Annu Rev Nutr*; 21: 381-406

Yang KC, Tsai CY, Wang YJ, Wei PL, Lee CH, Chen JH, Wu CH, Ho YS (2009) – „Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human hep G2 cells“. *Mol Carcinog*;48:420-431

Zamzami N., Kroemer G. (2001) - „The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.“ *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(1):67-71.

Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A., Kroemer G. (1998) – „Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins“. *Oncogene*16:2265 - 2282

Zhang X., Yuan Y, Jiang L, Zhang J et al. (2014) – „Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury“. *Autophagy*. 10(10):1801-13.

Zhu W., Cowie A., Wasfy G.W., Penn L.Z., Leber B., Andrews D.W. (1996) – „Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types“. *EMBO J*; 15(16): 4130–4141.

Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., und Sims, P. J.(2002) – „Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase1“. *Blood* 99 11: S. 4030-4038

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997) – „Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3“. *Cell* 90:405–413

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM (2005) - „Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells“. *Cell Mol Life Sci* 62:971-988

9 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Bissinger R., **Fischer S.**, Jilani K., Lang F. (2014) - „Stimulation of Erythrocyte Death by Phloretin“. *Cell Physiol Biochem*; 34:2256-2265

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im physiologischen Institut der der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Florian Lang durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Florian Lang.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Rosi Bissinger eigenständig oder in Zusammenarbeit mit dieser im Institut durchgeführt. Die Ermittlung des ATP-Gehalts erfolgte durch Rosi Bissinger.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Salome Fischer

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich auf diesem Wege noch einmal meinen Dank aussprechen möchte:

Zunächst gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Florian Lang für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die immerzu engagierte Betreuung.

Herzlichsten Dank an Rosi Bissinger, die sich viel Zeit dafür genommen hat meine Fragen zu klären und mir bei der Durchführung der Experimente zu helfen. Du hast eine freundschaftliche Atmosphäre geschaffen, durch die die Zeit im Labor wirklich Spaß gemacht hat.

Mein besonderer Dank gilt Thomas Eder, der mit viel Geduld immer für mich da ist. Danke für deine Unterstützung, deine konstruktive Kritik, deinen Rückhalt und deine liebevolle Motivation.

Ebenso gilt meine Dankbarkeit Anja Meier für Anregungen, das Korrekturlesen und nicht zuletzt für deine treue Freundschaft.

Danke an Jonathan Schulz, der mir bei statistischen Fragen geduldig eine große Hilfe zur Selbsthilfe war.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, die Hochs und Tiefs mit mir durchwandert und für den nötigen Ausgleich gesorgt haben: Klaudia, Mischa, Jenny, Tobi, Susi, Denan und Derya.

Danke auch an Dr. Michael Diehl und Dr. Isabel Wohlfahrt, für die großzügig zur Verfügung gestellte Zeit und ein tolles Arbeitsumfeld.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meiner Schwester Hannah und insbesondere meinen Eltern Dr. Gerhard und Dr. Esther Fischer. Danke für eure jahrelange Unterstützung, für all die Kraft und Liebe, die ihr mir geschenkt habt. Ohne euch hätte ich das alles nicht geschafft. Ihr seid unersetzlich.