Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I

Wasserdeprivation und Tyrosinase als Trigger des erythrozytären programmierten Zelltodes

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frauenfeld, Leonie Antonia Sophie
2017

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Ghoreschi

3. Berichterstatter: Professor Dr. J. Faudrey

Tag der Disputation: 01.02.2017

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis **1**
1 Einleitung **3**
1.1 Erythrozyten 5
1.1.1 Grundlagen 5
1.1.2 Form und Funktion der Erythrozyten 6
1.1.3 Physiologie des Erythrozyts 6
1.1.4 Seneszenz und Abbau der Erythrozyten 7
1.2 Definition der Apoptose 8
1.2.1 Bedeutung der Apoptose im menschlichen Organismus 9
1.2.2 Abgrenzung zur Nekrose 10
1.2.3 Ablauf der Apoptose: Signalwege und Mechanismen 12
1.2.3.1 Caspasen: Moleküle der Apoptose 12
1.2.3.2 Extrinsischer Signalweg 13
1.2.3.3 Intrinsischer Signalweg 14
1.3 Eryptose 16
1.3.1 Begriff „Eryptose“ 16
1.3.2 Mechanismen und Signalwege der Eryptose 17
1.3.2.1 Ionenkanäle 18
1.3.2.2 Phospholipide 20
1.3.2.3 Calpaine und Caspasen 21
1.3.2.4 Kalzium-unabhängiger Signalweg 22
1.3.3 Bedeutung der Eryptose für die Medizin 22
1.4 Dehydratation 23
1.4.1 Dehydratation 23
1.4.2 Klotho 24
1.4.3 Marker der Dehydratation 25
1.5 Tyrosinase 27
1.5.1 Vorkommen und Synthese 27
1.5.2 Klinische Relevanz 28
1.6 Fragestellung der Arbeit 28
2 Material und Methoden **30**

2.1 Wasserdeprivation 30
2.1.1 Mäuse 30
2.1.2 Bestimmung der Plasmakonzentration 30
2.1.2.1 Plasmaosmolarität 30
2.1.2.2 Calcitriol 31
2.1.2.3 ADH 31
2.1.2.4 Kalzium im Serum 31
2.1.3 Verwendete Lösungen 31
2.1.3.1 Ringerlösung 32
2.1.3.2 Glukosefreie Lösung 32
2.1.3.3 Hyperosmolare Lösung 33
2.1.3.4 T-BOOH 33
2.1.3.5 Annexin- Wasch-Puffer 34
2.2 Tyrosinase 34
2.2.1 Erythrozyten 34
2.2.2 Verwendete Lösungen 35
2.2.2.1 Ringerlösung 35
2.2.2.2 Ca^{2+}-freie Lösungen 35
2.2.2.3 Annexin-Waschpuffer 36
2.2.2.4 Phosphat-gepufferte Salzlösung 36
2.2.2.5 Tyrosinase 36
2.2.3 Messung des intrazellulären Kalziums: Fluo-3/AM 37
2.2.4 Bestimmung der Ceramid- Bildung: Anti-Ceramide-Antikörper 37
2.3 Durchflusszytometrische Analyse 38
2.3.1 Durchführung der Versuche 40
2.3.2 Messung der Phosphatidylserin-Exposition 41
2.3.3 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration 41
2.4 Statistik 42
3 Ergebnisse 43
3.1 Dehydratation 43
3.1.1 Messgrößen der Dehydratation 43
3.1.2 Phosphatidylserin-Exposition der murinen Erythrozyten 44

3.1.3 Energiedepletion 47
3.1.4 Ionomycin 50
3.1.5 Hyperosmotischer Schock 52
3.2 Tyrosinase 55
3.2.1 Phosphatidylserin-Exposition: Annexin V 55
3.2.2 Zellgröße: Forward Scatter 57
3.2.3 Zytosolische Kalziumkonzentrationen: Fluo-3AM 59
3.2.4 Kalziumunabhängige Zellmembranschrumpfung: Annexin V 61
3.2.5 Ceramid-Bildung: Ceramid-abhängige Fluoreszenz 63
3.2.6 Ionomycin-induzierte Eryptose: Forward Scatter 65
4 Diskussion 67
4.1 Methodendiskussion 67
4.2 Dehydratation 68
4.3 Tyrosinase 73
5 Zusammenfassung 77
6 Literaturverzeichnis 79
7 Abbildungsverzeichnis 90
8 Tabellenverzeichnis 94
9 Erklärung zum Eigenanteil 95
9.1 Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation 95
9.2 Stimulation of Cell Membrane Shrinkage by Mushroom Tyrosinase 95
10 Veröffentlichungen 97
11 Danksagung 98
12 Lebenslauf 99

Abkürzungsverzeichnis

µM	Micromol
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANOVA	Analysis of Variance
ANP	A-natriuretisches Peptid
APAF-1	Apoptosic Protease Activating Factor -1
APLT	Aminophospholipidtranslokase
ATP	Adenosintriphosphat
AWB	Annexin-Wash-Buffer
Bak	B-cell-2 homologus antagonist/ killer
Bax	B-cell-2 associated X-protein
Bcl	B-cell
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumine
Ca^{2+}	Kalzium
COX	Cyclooxygenase
Deh.	Dehydratation
DIABLO	Direct- IAP-binding Protein with low PI
EGTA	Ethylen Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorterer
FL-1	Fluorescent Channel 1
FSC	Forward Scatter
G	Gramm
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HEPES	32 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethansulfonicacid
HSP	Heat Shock Protein
IAPs	Inhibitors of Apoptosis Proteins

Abkürzungsverzeichnis

LPAT	Lyso-PAF acetyltransferase
min	Minute/n
mM	Millimol
mOsmol	milliOsmol
MPT	mitochondrial membrane permeability transition
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat
ORT	Oral Rehydratation Therapy
PAF	Platelet activating factor
PAF-R	Platelet activating factor receptor
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered Saline)
PGE2	Prostaglandin E2
PLA2	Phospholipase A2
PS	Phosphatidylserin
PTP	permeability transition pore
RBC	Red blood cells
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SSC	Sideward Scatter
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Vit. D	Vitamin D

1 Einleitung

Schon seit der frühen Antike befassten sich die Menschen mit dem Thema Blut, zum Beispiel im Corpus Hippocraticum als eine der ältesten medizinischen Schriften. Was damals von dem griechischen Arzt Hippokrates von Kos (ca. 400 v.Chr.) beschrieben wurde, waren Naturbeobachtungen der verschiedenen Säfte des Körpers, die mit Eigenschaften wie feucht und trocken, warm und kalt belegt wurden. Diese Säfte, gelbe und schwarze Galle, Schleim und Blut, überwogen je nach Jahreszeit oder Lebensphase eines Menschen, man versuchte also, die Physiologie des menschlichen Körpers zu verstehen und gewisse Regelmäßigkeiten festzustellen.

Galen von Pergamon fasste ca. 600 Jahre später das gesamte medizinische Wissen seiner Zeit zusammen und erweiterte es durch einige Grundsätze, so zum Beispiel mit den Begriffen der Eukrasie (Gleichgewicht der Säfte, beim gesunden Menschen) und Dyskrasie (Ungleichgewicht der Säfte, beim erkrankten Menschen). Aufgrund dieses Ungleichgewichts der Säfte sollte der Arzt seinen Patienten behandeln.

Das Zeitalter unserer heutigen wissenschaftlichen Medizin begann mit dem 17. Jahrhundert und Francis Bacon, dem „Wegbereiter des Empirismus“, also unserer modernen Forschung. Mithilfe dieser Methodik fand man die vielfältigen Funktionen heraus, die das Blut als Organ in unserem Körper einnimmt, so zum Beispiel den Sauerstofftransport von der Lunge zum Gewebe, Bestandteile des Puffersystems, der die Elektrolyte und Gase im Plasma im Gleichgewicht hält, sowie den Transport von Nährstoffen und Hormonen an ihre jeweiligen Bestimmungsorte. Außerdem reguliert das Blut die Körpertemperatur und übernimmt nicht zuletzt wichtige Aufgaben bei der Immunabwehr.

Unter dem Mikroskop ist das Blut in seinen einzelnen Bestandteilen erkennbar: Erythrozyten als große Masse, ferner Thrombozyten und Leukozyten.

Diese Zellen unterliegen einem ständigen Kreislauf der Reparatur bzw. der Erneuerung und des Absterbens gealterter und falsch funktionierender Zellen.

Diese Mechanismen werden unter anderem durch Apoptose reguliert, ein Vorgang, der den Körper in die Lage versetzt, entartete, überalterte oder

funktionsuntüchtige Zellen zu eliminieren, ohne andere Zellen oder gar den Organismus zu schädigen. Das Gewebe kann durch diesen Vorgang ständig erneuert werden und seine jeweilige Funktion erhalten [1].
Wie in den folgenden Kapiteln dieser Dissertation ersichtlich werden wird, sind für eine funktionierende Apoptose bestimmte Zellorganellen, so der Zellkern und auch die Mitochondrien, von herausragender Bedeutung [2].
Erythrozyten sind hochfunktionale, auf die Essenz ihrer Funktion des Sauerstofftransports verdichtete Zellen. Da sie in ihrer Reifungsphase im letzten Schritt (Retikulozyt zu Erythrozyt) ihren Zellkern und die Mitochondrien aussondern, um so ein noch geringeres Zellvolumen zu erreichen [3], dachte man bis vor einigen Jahren, dass diese Zellen nicht imstande sind, Apoptose zu betreiben. Sie wurden, laut Lehrmeinung, bei Alterung durch Milz und Leber aussortiert und abgebaut [4]. *In vitro* und *in vivo* Versuche zeigen jedoch, dass auch Erythrozyten in der Lage sind, sich für den Organismus aufzugeben und einen programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, zu induzieren [5]. Dieser von Bratosin et al. beschriebene Vorgang wurde durch Lang et al. als Eryptose bezeichnet und intensiver beforscht [6].
Für die weitere Erforschung dieses grundlegenden Mechanismus war zunächst der Praxisbezug wichtig. Inwiefern kann man mithilfe des Verständnisses dieser Mechanismen dem Patienten helfen? Da viele Krankheiten sich in Anämien äußern, die bisweilen schwer behandelbar sind, ergibt sich die klinische Relevanz der Erforschung vom apoptotischen Untergehen vor allem gesunder Erythrozyten. Welche Substanzen stimulieren beziehungsweise hemmen die Eryptose? Dieser und anderer Fragestellungen soll auf den Grund gegangen werden.
Der programmierte Zelltod konnte bei verschiedensten Erkrankungen sowie als unerwünschte Nebenwirkung zahlreicher Medikamente beobachtet werden. Man beobachtet sowohl bei Malariainfektionen bei den betroffenen Zellen eine signifikant erhöhte Eryptose [7], als auch bei Eisenmangelanämien [8] und vielen anderen Erkrankungen [7].
Zu Triggersubstanzen der Eryptose zählen unter anderem Sulforaphane, ein pflanzliches Produkt [9], Mitotane, ein Medikament, das zur Behandlung des

Nebennierenrindenkarzinoms eingesetzt wird [10] und Tyrosinase, ein Enzym, das in menschlichen Hautzellen (Melanozyten) vorkommt [11] und unter anderem Gegenstand dieser Dissertation ist [12].
Ein weiteres wichtiges und interessantes Gebiet ist die Erforschung von Substanzen, die den Ablauf der Eryptose hemmen und somit als mögliche Medikamente gegen Anämien anzusehen sind. Hierzu gehören unter anderem der Myosin II-Inhibitor Blebbistatin [13], das endogene Hormon Erythropoetin [14] und Probucol, eine antiinflammatorische und antioxidativ wirksame Substanz [15].
Im Folgenden soll sowohl die Wirkung von Wasserentzug als auch von Tyrosinase auf Erythrozyten diskutiert werden.

1.1 Erythrozyten

1.1.1 Grundlagen

Die Erythrozyten, allgemein auch als rote Blutkörperchen bekannt, bilden mit 99% den Hauptbestandteil des menschlichen Bluts. Je nach Geschlecht hat der Mensch 4,0-5,9 x 10^{12} Erythrozyten/ l Blut [3]. Die Neubildung aller Blutzellen findet im Knochenmark statt und wird im Falle der Erythrozyten als Erythropoese bezeichnet. Am Ursprung der Reihe stehen pluripotente Stammzellen, die durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu differenzierten Zellen heranwachsen. Am Ende dieser Reihe steht der Erythroblast, der seinen Zellkern abstößt und zum Retikulozyten wird, der in den Blutkreislauf geht [3]. Dieser Retikulozyt enthält noch Teile der RNA und Zellorganellen, die er ebenfalls abstößt. Ca. 0,8% der Erythrozyten werden am Tag neu gebildet, ihre mittlere Lebensdauer beträgt 100-120 Tage [16] und sie werden im seneszenten Zustand erkannt und im retikuloendothelialen System der Milz und Leber abgebaut [17-19].
Das wichtigste Wachstumshormon der Erythrozyten ist das Erythropoetin, ein Hormon, das in den peritubulären, fibroblastenähnlichen Zellen in der Niere gebildet wird. Es steigert die Erythropoese und die Ausdifferenzierung der Vorstufen der Erythrozyten [18, 20].

1.1.2 Form und Funktion der Erythrozyten

Humane Erythrozyten haben eine mittlere Größe von 7,5 µM und erweisen sich als bikonkav geformte Scheiben mit einem maximal 2 µM dicken Rand. Sie sind zellkernlos und weisen durch ihre Form eine enorm große Oberfläche im Vergleich zu ihrem Volumen auf. Neben Wasser bestehen die Erythrozyten hauptsächlich aus dem eisenhaltigen Proteinkomplex Hämoglobin, das mit seinen vier Untereinheiten und seinem Eisen-II-Komplex für den Sauerstofftransport von der Lunge zum Gewebe zuständig ist [21].
Die Zelloberfläche der Erythrozyten ist für den besseren Atemgasaustausch im Verhältnis zum Zellvolumen sehr groß, so wird die Diffusion erheblich vereinfacht. Die Scheibenform wird durch ein zytoskeletales Netzsystem aufrechterhalten, das durch einen speziellen Anker, Ankyrin, an der Doppelmembran befestigt ist. Dieses Zytoskelett muss der Aufgabe gerecht werden, eine Mischung aus Stabilität und Verformbarkeit zu gewährleisten, da sich die Erythrozyten durch Kapillaren zwängen, deren Durchmesser mitunter kleiner ist als sie selbst [17].

1.1.3 Physiologie des Erythrozyts

Dass Erythrozyten nicht nur ein „biologischer Sack, gefüllt mit Hämoglobin“ [3] sind, beweist die Tatsache, dass es ihnen zwar an fast allen Zellorganellen fehlt, sie aber dennoch einige Stoffwechselwege aufweisen können. Die notwendige Energie muss allein durch die anaerobe Glykolyse bereitgestellt werden, da es keine Mitochondrien gibt. Ohne Zellkern und endoplasmatisches Retikulum gibt es folglich auch keine Proteinsynthese, so müssen alle benötigten Proteine und insbesondere Reduktionsäquivalente (NADPH und Glutathion,GSH), die Proteine und Zellbestandteile vor Oxidation schützen, in früheren Reifungsphasen entstehen und bis zum Tod der Zelle in ihr verbleiben. GSH und NADPH werden mittels des Pentosephosphatwegs regeneriert, das heißt, sie werden von der oxidierten in die reduzierte Form zurückgeführt.
Eine besondere Rolle als Antioxidans nimmt das GSH ein, ein Molekül, das im Erythrozyt reichlich vorhanden ist. Es besitzt eine Thiolgruppe mit stark reduktiver Potenz, das unter Bildung von einer Disulfidbrücke mit einem zweiten

Molekül GSH oxidierte Proteine in ihren reduzierten Ursprungszustand umwandeln kann und selbst dabei oxidiert und zu GSSG umgewandelt wird. GSSG wird mittels der Glutathionreduktase und NADPH wieder in seine reduzierte Form, also in zwei Moleküle GSH rückgeführt. Oxidiertes NADP kann mittels des Pentosephosphatwegs in seine reduzierte Form überführt werden [3].

Dieser Schutz vor Oxidation stellt eine wichtige Grundlage zur Hauptfunktion der Erythrozyten dar, dem Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidtransport, der hauptsächlich durch das Hämoglobin gewährleistet wird. Dieses Transportmolekül wird dringend benötigt, da die Löslichkeit der Atemgase im Blut nicht hoch genug ist, um das Gewebe ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen und den Abtransport von Kohlenstoffdioxid zu gewährleisten. Aus diesem Grund werden die Sauerstoffmoleküle an das Hämoglobin gebunden, das aus jeweils zwei mal zwei identischen Untereinheiten besteht, das des adulten Organismus aus zwei α-Globin-Ketten und zwei β-Globin-Ketten, die jeweils eine Häm-Gruppe mit einem Eisen-II-Ion binden [22].

Der Vorgang der Sauerstoff- bzw. Kohlenstoffdioxidbindung hängt von mehreren physiologischen Faktoren ab, die es dem Hämoglobin ermöglichen, dass bei hohem Sauerstoffpartialdruck (Lungenparenchym) das O_2 koordinativ gebunden wird und bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck abgegeben wird um zum peripheren Gewebe zu gelangen [17].

1.1.4 Seneszenz und Abbau der Erythrozyten

Erythrozyten haben eine mittlere Lebensdauer von 120 Tagen [3]. Gegen Ende dieser Zeit können bei den Erythrozyten verschiedene Anzeichen des Alterns beobachtet werden, zusammengefasst unter dem Begriff Seneszenz [17]. Bestimmte Merkmale unterscheiden alternde Erythrozyten von jüngeren, dazu gehört beispielsweise der Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der Membran [18]. Phosphatidylserinverlagerung auf die Außenseite der Membran stellt bei allen Zellen eines der wichtigsten Merkmale der Apoptose dar, da Makrophagen Rezeptoren besitzen, die spezifisch an PS binden [23-26]. Als Trigger zum Abbau der Erythrozyten wird auch der Verlust des

membranständigen CD47 und von Sialinsäure angesehen. Ohne diese Moleküle werden Erythrozyten von Makrophagen erkannt und gebunden [27].
Die Entfernung der Erythrozyten wird durch die Markierung mittels IgG eingeleitet, das an ein erythrozytenspezifisches Oberflächenantigen bindet, welches sich in alternden Erythrozyten aus dem Bande-3-Protein (AE1) bildet [28].
Weitere Merkmale seneszenter Erythrozyten sind die kontinuierliche Volumenabnahme und die Abnahme des Hämoglobingehalts [3, 19] ebenso wie die Vesikelbildung [18]. Diese Vesikel werden abgeschnürt und in der Leber durch die Kupffer-Zellen phagozytiert [4, 19].
Die letztendliche Aussortierung alternder Erythrozyten wird vom retikuloendothelialen System der Milz, Leber und des Knochenmarks vorgenommen [4, 29, 30].

1.2 Definition der Apoptose

Zunächst betrachtete man den Zelltod als prinzipiell schädliches Ereignis, welches unter anderem mit dem Tod eines Organs beziehungsweise eines Organismus einhergehen kann. Dass es auch positive Beispiele des Zelltods gibt, sollte erst später bewiesen werden [31].
Eine der ersten Veröffentlichungen zum Thema der Apoptose behandelt die Metamorphose der Geburtshelferkröte *Alytes obstetricians* von Carl Vogt [32]. Diese erste Veröffentlichung zum Thema Apoptose sollte dann viele Jahrzehnte in Vergessenheit geraten, um erst Mitte des 20. Jahrhunderts zum Gegenstand weiterer Forschung zu werden. Glucksmann untersuchte den Zelltod unter normalen Bedingungen in Vertebraten [31]. Rund 20 Jahre später erforschten Kerr et al. die genauen Mechanismen des programmierten Zelltods und ihre Morphologie [33] und bezeichneten sie erstmals mit dem Begriff Apoptose. Der Begriff ist eine Zusammensetzung zweier griechischer Wörter, apo = weg, ab und ptosis= Senkung. Im eigentlichen Sinn beschreibt er den Blattabwurf der Bäume im Herbst oder den Abwurf der Blütenblätter einer Blume.
Diese frühen Veröffentlichungen zum Thema fokussierten sich auf morphologische Kennzeichen der Apoptose wie zum Beispiel die

elektronenmikroskopische Untersuchung von Zellschrumpfung und Kondensierung des Chromatins [34].
Das Interesse der Fachwelt blieb zunächst überschaubar. Als jedoch zusätzlich zu den morphologischen Kennzeichen der Apoptose die physiologischen und molekulargenetischen Prozesse genauer betrachtet wurden und 1982 eine der ersten Komponenten des programmierten Zelltodes, das humane Bcl-2 Molekül identifiziert wurde [35], wurde das Thema Apoptose stärker erforscht.
1977 fanden Forscher am Fadenwurm *C.elegans* Gene, die zu einer gestörten Apoptose führten [36]. Diese wurden dann später „CED-3“ benannt (cell death abnormal) und ihre genaue Funktion im Signalweg der Apoptose konnte identifiziert werden [37, 38]. Das menschliche Homolog zu diesen CED-3 Genen sind die Caspasen (Cystein-abhängige, Aspartat-spezifische Proteasen) [39-42].
Viele dieser Arbeiten befassten sich mit den Vorgängen im Zellinneren, erleichtert wurde die Arbeit durch die Erkenntnis, dass sich während des Vorgangs der Apoptose der Aufbau des Membranbilayers ändert und Phosphatidylserin auf der äußeren Membranschicht erscheint. Dies erleichterte die Forschungsarbeit in erheblichem Maße, da die Zellen nun durchflusszytometrisch bestimmt werden können [23, 25].

1.2.1 Bedeutung der Apoptose im menschlichen Organismus

Nach dem heutigen Kenntnisstand gibt es im menschlichen Organismus bei fast allen Zellen den Mechanismus des kontrollierten Zelltodes und jeden Tag werden im menschlichen Körper 50-70 Milliarden Körper auf diese Weise entfernt [43]. Fast alle Zellen des menschlichen Organismus können sich auf diese Weise entfernen [44]. In der Embryonalphase werden beispielsweise durch gezielte Apoptose Veränderungen vorgenommen, so werden zum Beispiel Fingerzwischenhäute entfernt oder im Gehirn angelegte Neuronen, die nicht gebraucht werden [31, 45].
Auch bei verschiedenen Krankheitsbildern konnte als Ursache entweder eine überschießende oder aber eine zu geringe Apoptoserate identifiziert werden.
So werden zum Beispiel im Immunsystem autoreaktive, funktionsuntüchtige oder seneszente Zellen gezielt mittels Apoptose entfernt. Dies gilt sowohl für T-

Zellen in ihrem Reifungsort, dem Thymus [46, 47] als auch für übermäßige Leukozyten nach Infektionen [24]. Wenn dieses System nicht mehr funktioniert und die Apoptose durch verschiedene Faktoren inhibiert wird, kann es zu malignen Neoplasien kommen [48, 49]. Krebszellen verlieren als Teil eines malignen Prozesses die Autoregulation, apoptoseinduzierende Faktoren sind erniedrigt oder wirkungslos und das Wachstum der Zellen ist enthemmt [50, 51]. Auch antiproliferative Therapieansätze arbeiten in Richtung Apoptoseinduktion [52].

Die Apoptose spielt ebenfalls bei einigen entzündlichen und degenerativen Erkrankungen eine Rolle. Zur Pathogenese des HI-Virus trägt entscheidend die deutlich erhöhte Apoptoserate der CD 4+ Zellen bei [53-56].

Im Fall von den neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer sind die Apoptoseraten, in diesem Falle der Neuronen, deutlich erhöht [57-60]. Als Therapieoption werden immer mehr Substanzen erforscht, die in den Apoptosemechanismus der Zellen eingreifen [61, 62].

1.2.2 Abgrenzung zur Nekrose

Prinzipiell gibt es zwei Modalitäten des Zelltodes:

Nekrose und *Apoptose [1]*

Der physiologische Vorgang der Apoptose und Nekrose ist nicht immer klar begrenzt, und es gibt zeitgleich ablaufende Vorgänge. Die folgende Tabelle soll jedoch die charakteristischen Merkmale der Todesmodalitäten auflisten.

Tabelle 1: Morphologische Kriterien der Apoptose aus: [2, 63, 64]

Apoptose
- Untergang einzelner Zellen
- Zellschrumpfung mit Bildung von apoptotic bodies (Zeiosis)
- keine inflammatorische Reaktion der Umgebung
- Ablösung aus dem bestehenden Zellverband
- Phagozytose durch Makrophagen
- kein Verlust der Zellintegrität
- Chromatinverdichtung und Fragmentation der DNA

Bei der Apoptose verringert sich zunächst das Zellvolumen; die Zellorganellen bleiben über den gesamten Zeitraum der Apoptose intakt und betreiben ihren Stoffwechsel weiter. Im Zellkern verdichtet sich das Chromatin und zusätzlich zur Schrumpfung der Zelle kommt es zur Verlagerung von Phosphatidylserin, von der inneren auf die äußere Membranwand. Dieser Prozess ist ursächlich durch ein Missverhältnis der Aktivität der Enzyme Scramblase und Translokase bedingt [65].
Membrane blebbing beziehungsweise Zeiosis, das durch Ausstülpungen der Zellmembran gekennzeichnet ist, kann an diesen Zellen ebenso beobachtet werden. Diese sogenannten *apoptotic bodies* lösen sich von der Membran ab, das darin enthaltene Zytoplasma verbleibt immer innerhalb der Membranen [2, 64].

Tabelle 2: Morphologische Kriterien der Nekrose Aus: [1, 66, 67]

Nekrose
- Untergang ganzer Zellverbände
- Zellschwellung
- inflammatorische Reaktion
- Phagozytose
- Verlust der Zellintegrität, Zerbersten der Membran und Freisetzung lysosomaler Proteine

Nekrotischen Zelluntergängen liegt meist ein Trauma beziehungsweise eine enorme Abweichung des physiologischen Normalzustands, zum Beispiel durch Hitze, mechanische Kräfte oder eine Hypoxie im betreffenden Areal zu Grunde [1, 66, 67]. Die Zelle ist nicht mehr in der Lage, den physiologischen Ionentransport an der Membran fortzusetzen, in der Folge kommt es zu einer osmotischen Schwellung der Zelle, die zum Zerreißen der Membran führt und so das Zytoplasma freisetzt. Die Zellbestandteile provozieren eine Immunreaktion im umgebenden Gewebe [67].

1.2.3 Ablauf der Apoptose: Signalwege und Mechanismen

Beim Ablauf der Apoptose können sowohl biochemische als auch morphologische (s. 1.2.1) Prozesse beobachtet werden. Mit der intensiven Erforschung des Themas rückten die biochemischen und molekulargenetischen Vorgänge in den Mittelpunkt, um eine genauere Analyse der Vorgänge in der Zelle zu erhalten.

Auf molekularer Ebene werden drei Phasen der Apoptose beschrieben:

- Initiationsphase
- Exekutionsphase
- Terminationsphase

Die Initiationsphase kann in zwei Wege eingeteilt werden:

- extrinsischer Signalweg
- intrinsischer Signalweg

1.2.3.1 Caspasen: Moleküle der Apoptose

Die Familie der Caspasen stellt eine der wichtigsten Molekülfamilien dar, die beim physiologischen Geschehen der Apoptose vor allem intrazellulär agierend eine Rolle spielen. Es handelt sich bei den Caspasen um eine Gruppe hochkonservierter Moleküle [41]. Nicht alle Caspasen sind im Ablauf der Apoptose involviert, einige sind bei der Verarbeitung von Zytokinen beteiligt (s. Abb. 1A) [40, 68]. Allen Caspasen ist eines gemeinsam, es handelt sich um Cystein-haltige Aspartat-schneidende Proteasen, daher auch ihr Name [41].

Caspasen werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und erst im Laufe einer Aktivierungskaskade funktionsfähig. Man kann die Apoptose-assoziierten Caspasen in zwei Gruppen einteilen: Initiator- und Effektorcaspasen [39, 42, 68].

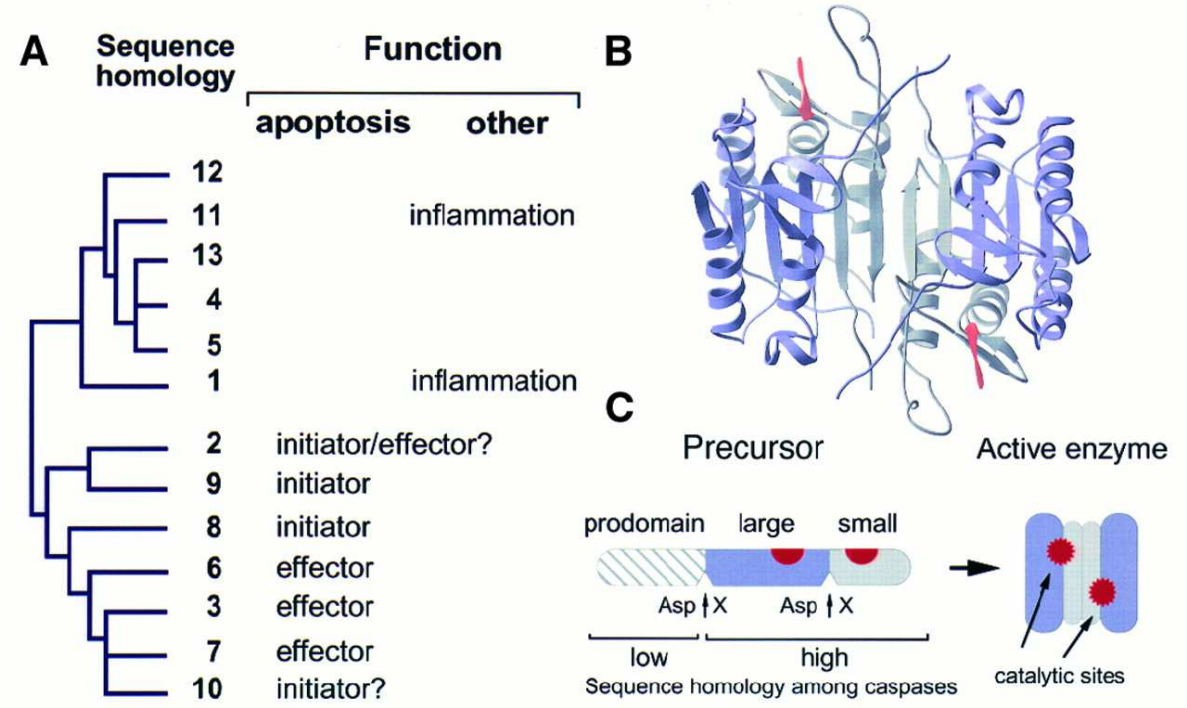

Abb. 1: (A) Familie der Caspasen (B) 3D-Struktur der Caspasen (C) Precursor-Molekül und aktives Enzym mit markierten katalytischen Arealen: das aktive Enzym liegt als Dimer vor, die durch hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind [69]
Aus:[68]

Die durch nachfolgend dargestellte Signalwege ausgelöste Caspasen-Kaskade hat vielfältige Wirkungsweisen, wobei Effektorcaspasen wichtige Rollen übernehmen und Caspasen ihre Lokalisation wechseln, um aktiviert werden zu können [70]. Zu den Hauptaufgaben der Effektorcaspasen zählen unter anderem die Degradation, also das Zerschneiden, der Matrixproteine, zum Beispiel der Laminine, und die Zerschneidung der DNA [42, 71].

1.2.3.2 Extrinsischer Signalweg

Beim extrinsischen Signalweg kommt der Todesimpuls von außerhalb der Zelle, in Form des sogenannten Todesliganden (FAS-Ligand oder TNF-α) [72]. Dieser Ligand bindet an einen Rezeptor der death receptor family, auch DD genannt (Death Domain) [73], der dadurch aktiviert wird und den death inducing signalling complex (DISC) bildet (s. Abb. 1) [74]. Der DISC aktiviert die Initiatorcaspase-8 [75, 76], die wiederum Effektorcaspasen aktiviert, darunter Effektorcaspase-3 [40], die die Apoptose der Zelle einleitet [51]. Caspase-8 wiederum stimuliert unter anderem Bid aus der bcl-Familie, dabei entsteht das

Spaltprodukt tBid, das dann den intrinsischen Signalweg der Apoptose induziert, indem es Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran freisetzt [77] und beide Signalwege verbindet [74, 78, 79].

1.2.3.3 Intrinsischer Signalweg

Lange Zeit ging man davon aus, dass Apoptose hauptsächlich Aufgabe des Zellkerns ist. Diese Meinung konnte mit der Entdeckung des intrinsischen Signalwegs geändert werden. Ebenso wie der Zellkern sind für eine funktionierende Apoptose die Mitochondrien notwendig [80]. Der intrinsische Signalweg wird durch Stress wie zum Beispiel chemische Noxen, Hitze, Kälte, UV-Strahlung (DNA Schädigung [81]) oder durch fehlgefaltete Proteine [51, 82] induziert. Das Signal zur Apoptose geht unter diesen Umständen also von der Zelle selbst aus. Am intrinsischen Signalweg sind in erheblichem Maße die Mitochondrien beteiligt [83], die, ausgelöst durch unterschiedliche Noxen, durch Öffnung der permeability transition pore (PTP) die Membranpermeabilität der Mitochondrien erhöhen [51, 84-86]. Außerdem wird durch die Öffnung der PTP der Anstieg der mitochondrialen membrane permeability transition (MPT) induziert und sowohl der Protonengradient vom Zytoplasma zum Mitochondrium zerstört als auch die Atmungskette entkoppelt [87]. Es kommt zu einer Rupturierung der äußeren Mitochondrienmembran und anschließend zur Freisetzung der darin enthaltenen proapoptotischen Moleküle, um so auch die Freilassung des in der Mitochondrienmembran vorhandenen Cytochrom C [72] und Apoptosis Inducing Factor (AIF) zu gewährleisten [79, 84]. AIF ist ein phylogenetisch altes Protein, das beweist, dass nicht nur Caspasen am Prozess der Apoptose beteiligt sind [88]. Einmal aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigelassen, gelangt es ungehindert zu seinem Wirkungsort, dem Nucleus und löst dort die Chromatin Kondensation und DNA Fragmentation aus [80, 89]. Auch die Procaspasen-2 und -9 (Initiatorcaspasen) sind intermembranständig und können zeitgleich ins Zytosol eindringen [90]. APAF-1, Apoptotic Protease Activating Factor 1 wird durch Bindung an Cytochrom c aktiviert (vgl. Abb. 2) und führt zur Bildung eines sogenannten Apoptosoms. Dieses Apoptosom besteht aus sieben speichenförmig angeordneten APAF-1 Molekülen, jeweils verbunden mit einem Cytochrom C.

Caspase-9 lagert sich ebenfalls am Apoptosom an und wird dadurch aktiviert, und als Komplex aktiviert das Apoptosom Caspase-3 und initiiert die Caspase-Kaskade [79, 91, 92].
Bcl-2 ist ebenso wie AIF und Cytochrom C ein intermembranales Molekül [93], das den Vorgang der Apoptose einer Zelle überwacht. Die Familie der Bcl-2 Moleküle hat sowohl pro- als auch antiapoptotische Mitglieder [94].

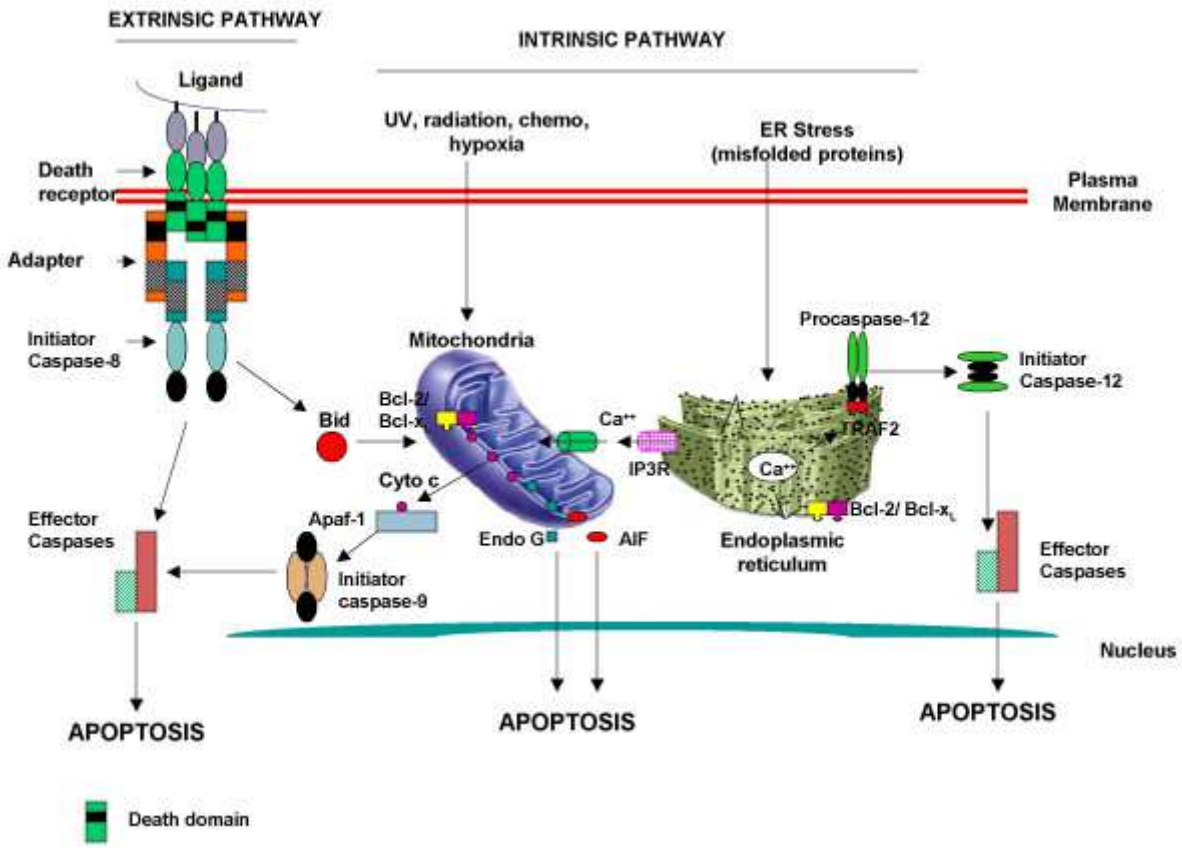

Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose. Weitere Erklärungen vgl. 1.2.3.2 und 1.2.3.3 Aus:[76]

Weitere Proteine, die beim Vorgang der Apoptose eine wichtige regulierende Rolle spielen, sind folgende:

- Tumorsupressor- Gen p53 [95]
- IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) [92, 96, 97],
- Hitzeschockproteine [85],
- SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) [92, 98]
- DIABLO (Direct IAP-binding Protein with Low PI) [92]
- Bax [99] und Bak [100, 101]

Ein weiterer Mechanismus der Apoptose stimuliert ebenfalls die Cytochrom C Ausschüttung aus der Mitochondrienmembran. Hierbei handelt es sich um Sphingomyelinasen, die Phospholipide der Zellmembran spalten. Dabei entsteht Phosphorylcholin und Ceramid. Ceramid konnte als Second-Messenger identifiziert werden [102] und bildet Kanäle an der äußeren Mitochondrienmembran, die Cytochrom C ins Zytosol strömen lassen [103] und so die Apoptose einleiten [104].

1.3 Eryptose

1.3.1 Begriff „Eryptose“

Der Erythrozyt ist ab dem Zeitpunkt, da er in das zirkulierende Blut eintritt, mehreren Bedingungen ausgesetzt, die ihn potentiell schädigen können. Dazu gehört zum Beispiel das Milieu in den Kapillaren der Lunge, das oxidativen Stress ausübt, das hyperosmolare Milieu in den Kapillaren des Nierenmarks und die ständige Verformung durch extrem kleine Kapillaren. Aus diesem Grund muss es den Zellen ermöglicht werden, zum Schutze des Organismus einen programmierten Zelltod einzuleiten, der sich als Reaktion auf Stress auslösen lässt. Erythrozyten können, ähnlich wie zellkernhaltige Zellen und obwohl sie weder Nucleus noch Mitochondrien und damit weder Cytochrom C, APAF-1 und Caspase-9 haben [105], einem der Apoptose ähnlichen Mechanismus unterzogen werden. Man nahm lange Zeit an, dass Erythrozyten keinen programmierten Zelltod einleiten können, da sie in vitro ohne Serum überleben und sogar unter Zusatz von Staurosporin, einem Proteinkinaseinhibitor, der als starker unspezifischer Apoptoseinduktor fungiert, nicht sterben [18]. Wichtige morphologische Ähnlichkeiten zur Apoptose sind zum Beispiel Zellschrumpfung [106], Zellmembranabschnürung sogenannter *apoptotic bodies* und Phosphatidylserin-Exposition an der Zellmembranaußenseite [20]. Nachfolgend können die apoptotischen Zellen von Makrophagen erkannt werden und aus dem System isoliert werden, ohne eine überschießende und nierenschädliche Hämolyse zu verursachen [20, 107, 108]. Auch infizierte, defekte oder anderweitig schädliche Zellen können mittels der Eryptose eliminiert werden [16]. Zwar gibt es einige Gemeinsamkeiten zwischen der oben beschriebenen

Seneszenz der Erythrozyten, doch kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Mechanismen grundlegend unterschiedlich sind [109].
Der Begriff Eryptose setzt sich zusammen aus ery- griechisch rot (ebenso in Erythrozyt) und –ptose griechisch für abfallen, wegfallen.

1.3.2 Mechanismen und Signalwege der Eryptose

Da die Erythrozyten keine Zellorganellen besitzen, ist der physiologische Ablauf der Eryptose ein anderer als der der Apoptose zellkernhaltiger Zellen. Zwar gibt es morphologische und biochemische Ähnlichkeiten, doch muss grundsätzlich unterschieden werden. Einige Signalwege konnten bisher aufgedeckt werden, doch sprechen aktuelle Forschungsergebnisse dafür, dass es noch weitere Mechanismen gibt.
Eryptose kann durch verschiedenste endogene und exogene Substanzen als auch durch oxidativen Stress [107], Hyperosmolarität [16, 110], Energiedepletion [16], Hyperthermie [111] ausgelöst werden. Außerdem ist die Eryptose hervorgerufen durch unterschiedliche Erkrankungen und kann als Mitursache von Anämien betrachtet werden [8] (vgl. 1.3.3).
Am Anfang der Eryptose kann ein Kalziumeinstrom in die Zelle detektiert werden, der durch aktivierte Ca^{2+}-permeable Ionenkanäle hervorgerufen wird [112]. Diese Kalziumkanäle konnten bislang noch nicht genau identifiziert werden; sicher ist, dass der TRPC6 Kationenkanal eine Rolle beim programmierten Zelltod spielt [113]. Ein weiterer wichtiger Ionenkanal ist der kalzium-sensitive Kaliumkanal *Gardos* (vgl.1.3.2.1).
Das Äquivalent zu den Caspasen der zellkernhaltigen Zellen sind im Erythrozyt die Calpaine (Kalzium-abhängige Papain-ähnliche cytosolische Protease), kalziumabhängige Proteasen [18].
Die Ceramid-Bildung [112] ist ebenfalls ein Trigger der Eryptose, der jedoch unabhängig vom Kalziumeinstrom abläuft. Ceramid wird wie in anderen Zellen auch durch die saure Sphingomyelinase als Spaltprodukt von Phospholipiden gebildet und wird im Erythrozyt durch PAF (Platelet activating Factor) stimuliert [114].

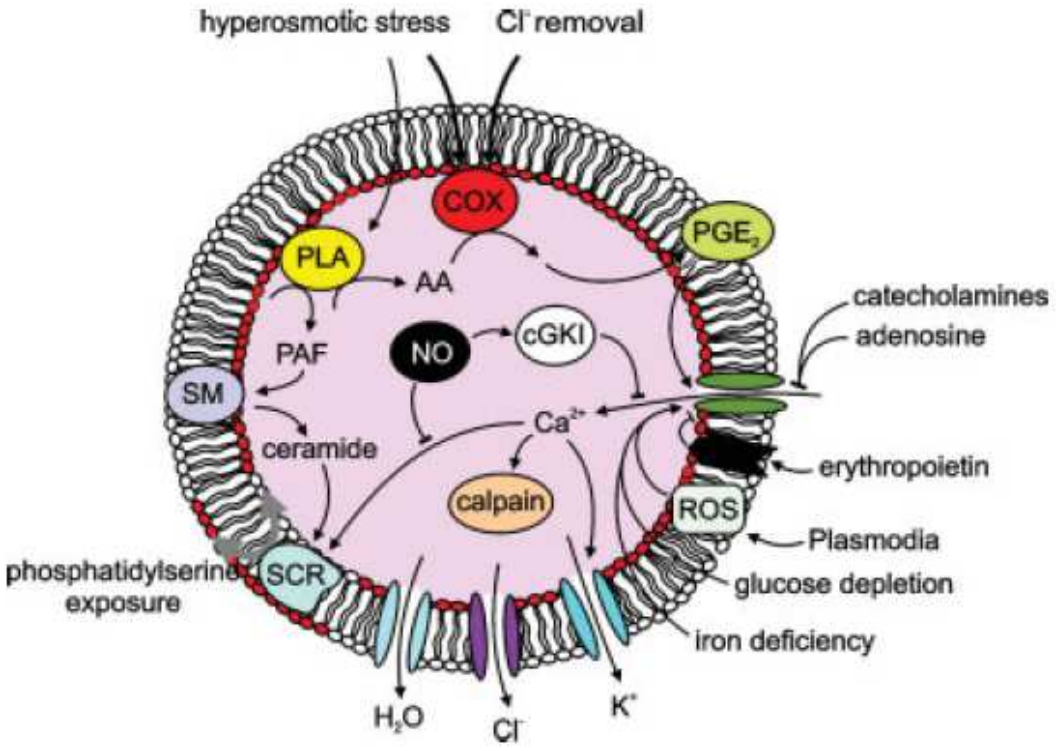

Abb. 3: Trigger der Eryptose, schematisch dargestellt, aus: [114]
Zellschrumpfung, Energieentzug oder der Verlust von Chlorid führen zur Bildung von PGE2. PGE2 aktiviert unspezifische Kationenkanäle, durch die Kalzium einströmt. Kalzium aktiviert zusätzlich den Gardos-Kanal, durch den Kalium die Zelle verlässt, was auch einen Verlust von Chlorid und Wasser bedeutet. Außerdem aktiviert Kalzium die Calpaine und bewirkt die Aktivierung der Scramblase und somit die Exposition von PS an der äußeren Erythrozytenmembran. Gleichzeitig aktiviert PAF die Sphingomyelinase. Das freigesetzte Ceramid fördert das Scrambling der Membran.
COX: Cyclooxygenase; LPAT: Lyso-PAF acetyltransferase; PAF: Platelet activating factor; PAF-R: Platelet activating factor receptor; PGE2: Prostaglandin E2; PLA2: Phospholipase A2

1.3.2.1 Ionenkanäle

Einen grundlegenden Mechanismus des programmierten Zelltods in Erythrozyten stellt die Aktivierung unterschiedlicher Ionenkanäle dar. Erythrozyten haben wenig Kanalaktivität, der Austausch von Chlorid-Ionen ist jedoch stark ausgeprägt. Wichtige Transporter des Erythrozyten sind: Na^+, K^+-ATPase, Ca^{2+}-ATPase, Aniontransporter (Bande-3-Protein), Wasserkanäle (Gen: AQP1) und Glukosetransporter (GLUT1) [115]. Chlorid-Entzug, hyperosmotisches Milieu [110] und oxidativer Stress [116] bewirken bei Erythrozyten eine enorme Erhöhung der Kationenleitfähigkeit und tragen damit zur Eryptose bei. Diese Kationenleitfähigkeit bezieht sich hauptsächlich auf

Kalziumionen, wobei davon ausgegangen werden muss, dass die Kanäle unspezifisch fungieren [116]. Die Kanäle sind bislang nicht genau bekannt, es wird aber vermutet, dass der TRCP6-Kanal unter anderem eine Rolle spielt [20, 112].

Eine hyperosmolare Umgebung lässt die Erythrozyten durch Wasserausstrom schrumpfen [110, 117]. Diese Zellschrumpfung trägt, ebenso wie Verlust von Chlorid und Energiedepletion, zur Bildung von Prostaglandin E_2 bei. PGE2 wiederum aktiviert die Kalziumkanäle, und Kalzium kann in die Zelle einströmen (vgl. Abb. 3) [114]. Des Weiteren wird ein kalziumabhängiger Kaliumkanal aktiviert, der Gardos-Kanal [118-120]. Dieser Kanal lässt, mit absolut notwendiger Anwesenheit von Kalzium [120], Kalium aus der Zelle ausströmen [121]. Durch die Hyperpolarisation der Zellmembran kommt es zum Chloridausstrom, um das elektrophysiologische Gleichgewicht der Zelle wiederherzustellen [122]. Dies wiederum kommt dem bereits erwähnten Chloridverlust gleich und PGE2-Bildung wird stimuliert [20]. Wasser folgt dem osmotischen Gefälle und lässt die Zelle schrumpfen [121]. Der Gardos-Kanal wird unter anderem durch PGE2, cAMP und PKA aktiviert [120]. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass der Chloridkanalblocker NPPB eine durch Kalziumeinstrom ausgelöste Eryptose abschwächen kann [123]. Ein hyperosmolares Milieu kommt physiologischerweise im Körper im Nierenmark vor. Dort kann es bis zu 1200 mosmol/l erreichen, was einen starken Stressor für Erythrozyten darstellt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Harnstoff (der im Nierenmark vermehrt vorkommt) ein Inhibitor der Sphingomyelinase (vgl. 1.3.2.2) ist und somit die Erythrozyten schützt [124]. Oxidativer Stress bewirkt ebenfalls eine unspezifische Erhöhung der Kationenleitfähigkeit der Membran, somit also auch die Aktivierung der Chloridkanäle und führt über den Verlust von Chlorid-Ionen zum Zelltod. Dem Kaliumchloridverlust der Zelle folgt osmotisch Wasser, was wiederum zur Zellschrumpfung führt [125]. Kaliumverlust wird ebenfalls als Trigger der Eryptose gesehen [126].

1.3.2.2 Phospholipide

Ebenso wie bei zellkernhaltigen Zellen existiert im *Bilayer* der Erythrozytenmembran eine streng asymmetrische Verteilung der Phospholipide [26, 127]. Das Phospholipid Phosphatidylserin ist im normalen Zustand immer auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert [128] und findet sich nur bei sterbenden Zellen auf Membranaußenseite [5, 129]. Es stellt, auf der äußeren Membran befindlich, einen Rezeptor dar, der von Makrophagen bzw. Kupffer-Zellen der Leber [19] erkannt wird und die Phagozytose der betreffenden Zelle zur Folge hat [23, 130]. Für den Erhalt der Asymmetrie ist maßgeblich das membranständige ATP-abhängige Enzym Aminophospholipid-Translokase verantwortlich [131]. Das Enzym Phospholipid-Scramblase ist gewissermaßen der Gegenspieler der Translokase [26, 132]. Stimuliert durch Kalzium wirkt es großflächig und unselektiv auf die Biomembran, indem es Phospholipide vom inneren auf das äußere Blatt und umgekehrt verlagert [127]. Da Kalzium die Translokase hemmt, kommt es zu einer PS-Exposition auf dem äußeren Membranblatt [127] (vgl. Abb. 4).

In diesem Zusammenhang wird auch eine Interaktion zwischen PS-Exposition und Adhärenz an der Gefäßwand diskutiert, die unter anderem zum Hyperkoagulabilität des Blutes führen kann und Thrombosegeschehen einleiten kann [133, 134].

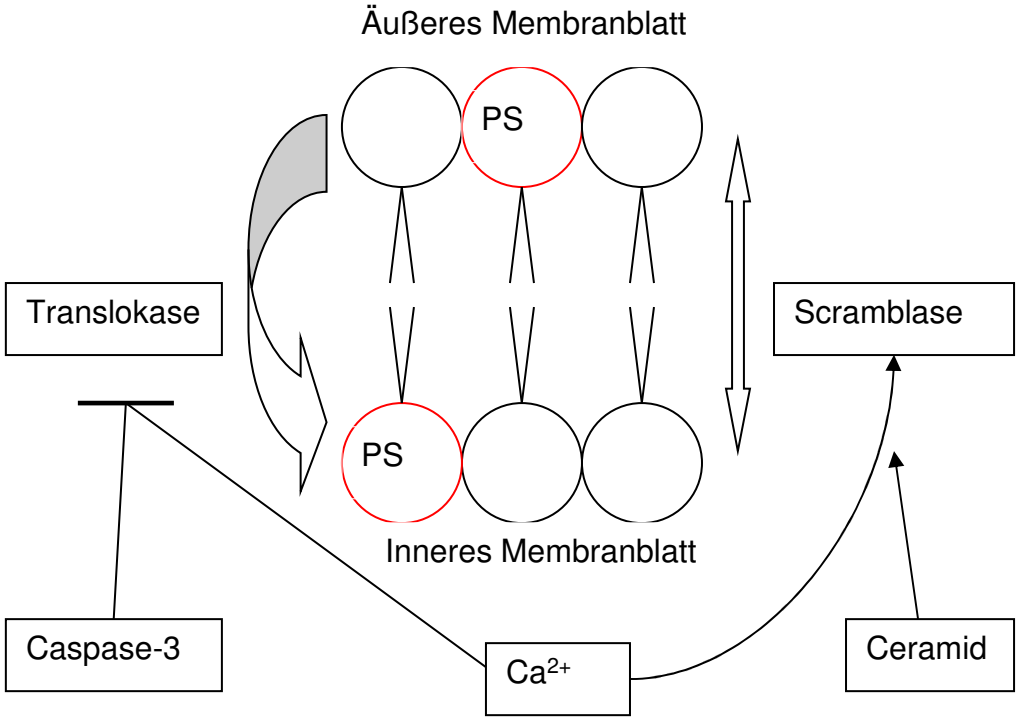

Abb. 4: Inhibition und Stimulation der Enzyme Translokase und Scramblase (selbst erstellt). Kalzium inhibiert die Translokase und stimuliert die Aktivität der Scramblase [132]. Dies führt zu einer Phosphatidylserin-Exposition. Caspase-3 inhibiert die Translokase[135] , Ceramid stimuliert die Scramblase. Beides führt zur PS-Exposition.

1.3.2.3 Calpaine und Caspasen

Ein weiterer kalziumabhängiger Mechanismus des erythrozytären programmierten Zelltodes stellen die Proteasen-Gruppe der Calpaine dar [136]. Dies sind Kalzium-abhängige Papain-ähnliche cytosolische Proteasen, die unter anderem auch in neuronalen Zellen vorkommen und nach ihrer Aktivierung Zellbestandteile so wie zytoskeletale Proteine (z.B. Aktin), Kinasen Phosphatasen, und Transporter spalten können [137].

Zunächst wurde angenommen, dass Erythrozyten keine Caspasen besitzen, dies konnte jedoch widerlegt werden. Gerade in alternden Erythrozyten findet sich aktivierte Caspase-3 und Caspase-8 [135]. Caspase-3, als Effektorcaspase, reguliert die Aktivität der ATP-Translokase herunter und sorgt dafür, dass vermehrt PS ans äußere Membranblatt verlagert wird (vgl. Abb. 4) [135].

1.3.2.4 Kalzium-unabhängiger Signalweg

Viele der Mechanismen in der erythrozytären Apoptose sind Ca^{2+}-gesteuert. Man konnte jedoch einen weiteren, Ca^{2+}-unabhängigen Signalweg ausmachen: Der eryptotische Untergang der Zellen mit PS-Exposition, z.B. durch osmotischen Schock, konnte weder in Ca^{2+}-freiem Milieu noch unter Inhibition der Kationenkanäle durch Amilorid oder Ethylisopropylamilorid unterbunden werden [117]. Als Ursache für dieses eryptotische Vorgehen konnte Ceramid [112] identifiziert werden, ein Spaltprodukt der Sphingomyelinase aus Phospholipiden der inneren Zellmembran [138]. Es handelt sich um ein als „second messenger" fungierendes Molekül [139], das mit seiner Wirkung als proaptoptotisches Lipid bei verschiedenen Arten von Zellen als Tumorsuppressor fungiert [104, 140, 141].

Ceramid macht die membranständige Scramblase sensitiver für Ca^{2+}-Ionen, die wiederum die Scramblase aktivieren [142]. Somit ist Ceramid in der Lage, die PS-Exposition der zellkernlosen Blutzellen zu stimulieren und ihren programmierten Zelltod in die Wege zu leiten [112].

1.3.3 Bedeutung der Eryptose für die Medizin

Die Eryptose nimmt in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle in der klinischen Medizin ein. Zum einen könnte sie der Schlüssel zur Erklärung verschiedener Erkrankungen sein (z.B. Anämien etc.) [143], zum anderen kann sie in Zukunft vielleicht als möglicher Angriffspunkt für Therapien fungieren [144].

Bisher konnte man bei verschiedenen Systemerkrankungen eine erhöhte Apoptoserate der Erythrozyten bzw. eine leichtere Sterblichkeit der Zellen, die zusätzlich Stressoren ausgesetzt wurden, messen. Krankheiten, durch die die Erythrozyten verstärkt mit Eryptose auf Stressoren wie osmotischer Schock, oxidativen Stress [106] oder Energiedepletion reagieren, sind zum Beispiel die Eisenmangelanämie [8] oder hereditäre Krankheitsbilder, wie die Sichelzellanämie [145], die Thalassämie oder der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel [144]. Diese Mutationen zeigen auch eine gewisse Resistenz gegen die Infektion mit Plasmodien.

Im Falle von dem Erreger Plasmodium falciparum, der die Malaria tropicana auslöst, nisten sich Plasmodien in den roten Blutzellen ein und induzieren oxidativen Stress [146]. Ca^{2+} strömt in die Zelle ein und löst durch die oben genannten Mechanismen Eryptose aus [147]. Dies scheint einen Schutzmechanismus des Körpers darzustellen, um mittels der Eryptose die Erreger zu eliminieren. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass einige proeryptotische Substanzen den Krankheitsverlauf der Malaria positiv beeinflussen können [148, 149].
Weitere Krankheiten, bei denen erhöhte Eryptoseraten beobachtet werden können sind Diabetes Mellitus [20] und Nierenversagen [150].
Eryptose wird durch Hyperthermie induziert; dies geschieht wohl mitunter durch eine erhöhte Produktion von Leukotrienen [111]
Sehr stark erhöht ist die Eryptoserate in septischen Patienten und *in vitro* bei Erythrozyten, die Pathogenen ausgesetzt wurden [151].
Viele exogene Substanzen wie zum Beispiel einige Ionen (Gold [152], Aluminium [153] und Zink [154]) sowie Chemotherapeutika (Paclitaxel [29], Mitotan [10] oder Thioridazin [155]) stellen Triggersubstanzen der Eryptose dar.

1.4 Dehydratation

1.4.1 Dehydratation

Der Begriff der Dehydratation bezeichnet den Verlust von Wasser in Form von verschiedenen Körperflüssigkeiten. In der Medizin wird häufig auch der Begriff Volumenmangel verwendet. Schon früh konnten Symptome identifiziert werden, denen der Volumenmangel als Ursache zugrunde liegt, wie z.B. das Schockgeschehen [156]. Außerdem konnte man Zusammenhänge zwischen dem Volumenmangel und einer Anämie entdecken, die mitunter mit einer Suppression der Erythropoese einhergehen [30, 157, 158].
Klinisch unterscheidet man drei Arten der Dehydratation, die isotone, hypotone und die hypertone Dehydratation: Bei der isotonen Dehydratation kommt es zu einem Verlust von Wasser als auch von Natrium in isotonem Verhältnis, das unter anderem Folge von Erbrechen und Durchfällen [159, 160],

Verbrennungen (Verlust über die geschädigte Haut), Diuretikatherapie, Blutungen oder chronischem Nierenversagen sein kann. Bei der hyptotonen Dehydratation kommt es zu einem Wasserverlust und zu einem hypertonen Salzverlust. Der Salzverlust ist im Verhältnis also höher als der Wasserverlust, das Serumnatrium und die Serumosmolarität ist, im Gegensatz zur isotonen Dehydratation erniedrigt. Die Ätiologie ist meist dieselbe wie bei der isotonen Dehydratation, pathogenetisch wird oft zu viel freies Wasser substituiert (hypoton). Die hypertone Dehydratation bezeichnet eine Erniedrigung des freien Wassers im Körper insgesamt. Bemerkbar macht sich dies im Labor unter anderem durch eine erhöhte Serumosmolarität und ein erhöhtes Serumnatrium. Die hypertone Dehydratation kommt meist durch Dursten, Wasserverlust über Haut und Lunge oder iatrogen durch übermäßige Verabreichung osmotisch wirksamer Substanzen zustande [161].
Als Therapiemöglichkeit ist an erster Stelle die orale Rehydratationstherapie (ORT) zu nennen [162]. Bei massiveren Wasserverlusten oder einer nicht durchführbaren ORT kann die Wassersubstitution auch intravenös vorgenommen werden. Bei isotoner Dehydratation soll auf die Zufuhr von isotonen Lösungen (NaCl-Lösung) geachtet werden. Ebenso bei der hypotonen Dehydratation, mit Beachtung des Ausgleichs des Natriumhaushaltes. Bei der hypertonen Dehydratation soll osmotisch freies Wasser substituiert werden, zum Beispiel 5%ige Glucose-Lösung. Der Ausgleich sollte stets langsam erfolgen, und bei zusätzlicher Substitution von Natrium noch vorsichtiger, um den Liquordruck nicht zu beeinflussen [161].

1.4.2 Klotho

Klotho, ein transmembranäres Protein, Protease und Hormon [163] ist ein Korezeptor des FGF23-Rezeptor [164], der die $1,25(OH)_2D_3$ Produktion herunterreguliert [165], und variabel auf Hydratation und Dehydratation reagiert [166-168]. Es wird hauptsächlich in den Nebenschilddrüsen, der Niere und dem Plexus Choroideus exprimiert [169, 170].
Der Ausfall des Klotho-Gens geht hauptsächlich mit einer massiven $1,25(OH)_2D_3$-Produktion einher, aber auch mit der Stimulation des im Nierentubulus befindlichen Phosphat-Transporter und einer daraus

resultierenden Erhöhung der Phosphatkonzentration des Serums [163, 168, 171, 172]. Im Umkehrschluss können bei Mäusen, denen hohe Konzentrationen Klotho intravenös verabreicht wurde, eine Hypophosphatämie und Phosphaturie wegen der verminderten Reabsorption beobachtet werden [171].

Mäuse, die wie in den nachfolgenden Versuchen eine reduzierte Expression des Klotho aufweisen, leiden an den unterschiedlichsten Krankheiten, zum Teil unter altersassoziierten Erkrankungen, die vorzeitig eintreten [173, 174], wie eine kurze Lebensspanne [170], Infertilität, Arteriosklerose, Osteoporose, Hautatrophien und Lungenemphysemen [167, 174, 175]. Außerdem kann es zu endothelialer Dysfunktion, Nierenversagen und Kalzifikationen der Arterien führen [176, 177]. Hörverlust, Ataxien, Muskelatrophie und neurodegenerative Erkrankungen zählen ebenso zu den Symptomen, die klothodefiziente Mäuse vorzeitig erleiden [167, 168].

Die Erythrozyten klothodefizienter Mäuse sind verstärkt für Stressoren der Eryptose anfällig und durchleben schneller einen eryptotischen Abbau als die Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen [169]. Dieser Vorgang der Eryptose bei klothodefizienten Mäusen ist unter anderem durch eine Vitamin D-reiche Diät reversibel (durch vermehrte $1,25(OH)_2D_3$ Produktion) [169].

Dadurch, dass Eryptose durch die Abwesenheit von dem *anti-ageing* Protein Klotho getriggert wird [169] und Klotho durch Dehydratation herunterreguliert wird [170, 178], soll diese Arbeit analysieren, ob Dehydratation alleine bei Mäusen reicht, um eine vermehrte Eryptose zu provozieren.

1.4.3 Marker der Dehydratation

Als Marker der Dehydratation sollen in den folgenden Versuchen vor allem das Calcitriol ($1,25(OH)_2D_3$), Aldosteron, Kalzium im Serum und die Plasmaosmolarität dienen. Die Plasmaosmolarität wird im menschlichen Körper in engen Grenzen gehalten und ist durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Sie beträgt physiologischerweise ca. 285-290 mosmol/L [179]. Eine Ausnahme stellt die Osmolarität im Nierenmarkparenchym dar, die mit bis zu 1200 mosmol/L sehr viel höher ist [17]. ADH, auch Vasopressin genannt, ist ein durch den Hypophysenhinterlappen ausgeschüttetes Hormon, das an den distalen Tubuli der Niere wirkt und durch Einbau von Aquaporin-Kanälen die

Rückresorption von Wasser unter Mitnahme von Natrium induziert und antidiuretisch wirksam ist. Durch seine vasokonstriktorische Potenz erhöht es gleichzeitig den Blutdruck. Es wirkt außerdem gemeinsam mit Angiotensin II, Aldosteron und dem ANP auf das Trinkverhalten, das im Hypothalamus reguliert wird. In Durstphasen ist ADH erhöht, um so den Harn zu konzentrieren und dem Organismus Wasser bereitzustellen und den Verlust so klein wie möglich zu halten [17, 180]

Calcitriol, also $1,25(OH)_2D_3$, nimmt im menschlichen Körper viele Funktionen ein und übernimmt eine zentrale Rolle im Kalziumhaushalt. Es stellt mittels komplexer Vorgänge Kalzium für den Einbau in die Knochenmatrix bereit [17]. Hohe Calcitriolspiegel im Blut führen zu einer Hyperkalzämie [177, 181]. Calcitriol reguliert außerdem auch das RAAS-System. Calcitriol-Armut stimuliert die Renin-Expression [[181, 182]. Dies wiederum führt über die Freisetzung von Angiotensin I und II zur Wasserretention der Nieren. Die Nieren steigern die Rückresorption von Wasser, zur gleichen Zeit wirkt Angiotensin II vasokonstriktorisch [17].

1.5 Tyrosinase

1.5.1 Vorkommen und Synthese

Die Tyrosinase ist ein kupferhaltiges Enzym mit einer Phenol-Struktur, das beim Menschen hauptsächlich in den Melanin-produzierenden Hautzellen (Melanozyten) vorkommt und für die Katalyse verschiedener biochemischer Umwandlungen von L-Tyrosin zu Eumelanin/ Phäomelanin (Pigmente der Haut) zuständig ist [183] (vgl. Abb. 5). Das Enzym kann leicht aus dem Pilz *Agaricus bisporus* isoliert werden und ist deshalb leicht für die Forschung zugänglich [183]. Die Isolation aus menschlichem Melanomgewebe ist jedoch auch möglich. [11].

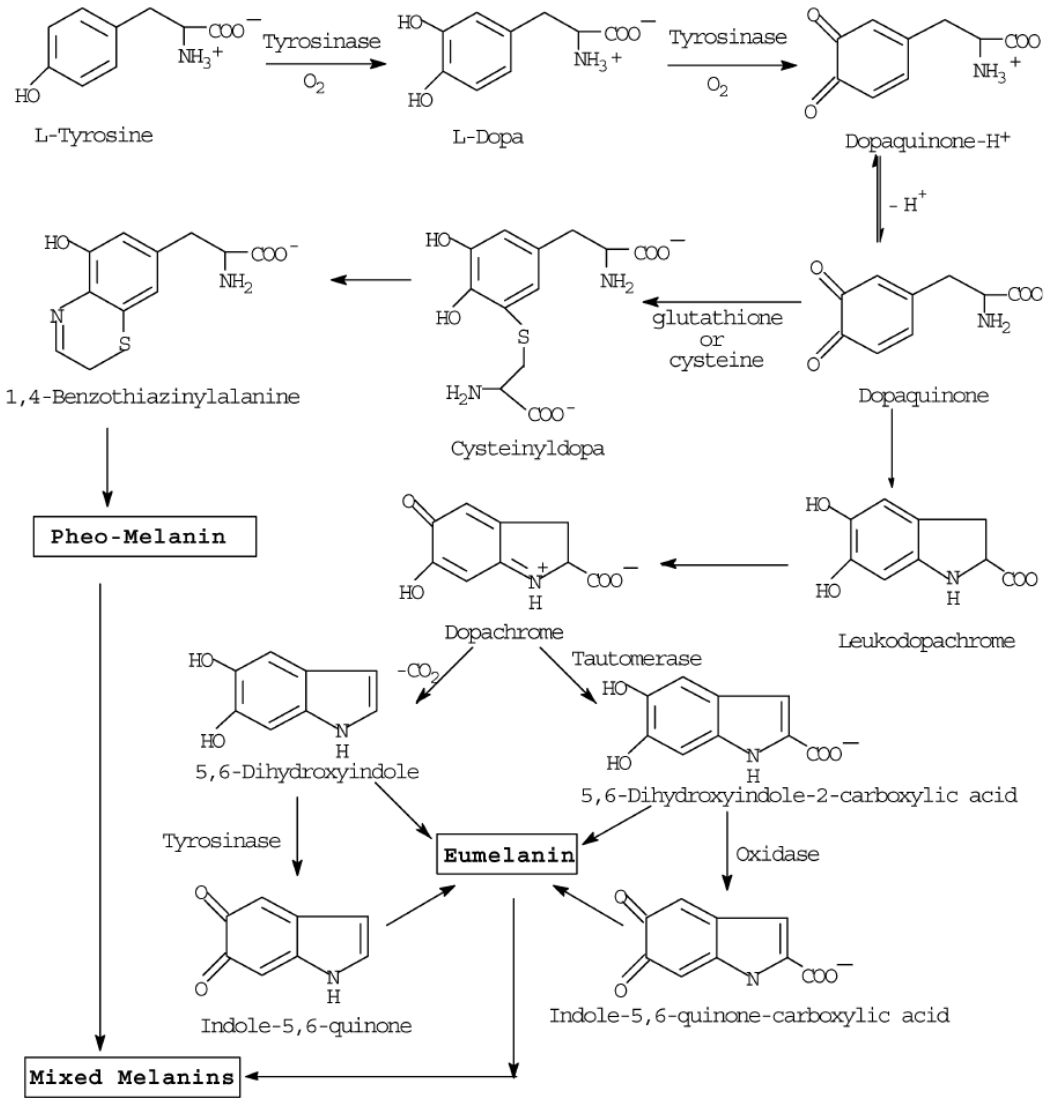

Abb. 5: Synthesewege von Eumelanin und Pheomelanin. Aus: [183]

1.5.2 Klinische Relevanz

Studien konnten zeigen, dass Tyrosinase mit unterschiedlichen Substanzen gemeinsam appliziert *in vivo* zytostatische Produkte generieren kann. So zum Beispiel bei der gemeinsamen Applikation von gamma-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzene [184]. Inkubation mit den Oxidationsprodukten der Tyrosinase konnte das Tumorwachstum muriner Leukämie- bzw. Melanomzellen blockieren [184]. Weitere Studien konzentrieren sich auf Melanomzellen und die Wachstumsinhibition durch Substrate der Tyrosinase [185, 186].
Möglicherweise interagiert das Enzym Tyrosinase mit den zellulären Mitochondrien und kann so apoptotisch aktiv sein [184]. Andererseits konnte auch die potentielle Mutagenität und Karzinogenität von Tyrosinase festgestellt werden [187-192].
Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Tyrosinase, aus der Sepiatinte des *Sepia officinalis* gewonnen, ein Anstieg der Caspase-3 in PC12 Zellen zur Folge hatte, der zur möglicherweise irreversiblen Apoptose führt [193]. Diese Ergebnisse sehen die Autoren Russo et al. [193] als mögliche Verwendung der Tyrosinase als proapoptotische Substanz in der Forschung und vielleicht auch für den klinischen Gebrauch. Da diese Caspase-3 auch während der Eryptose der roten Blutzellen ansteigt, hat man *in vitro* versucht, dies an gesundem Spenderblut mit Tyrosinase von Pilzen zu provozieren [12].

1.6 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Frage behandelt werden, ob die Erythrozyten dehydrierter Mäuse anfälliger für Stressoren werden und vermehrt eryptotisch zugrunde gehen. Die Erkenntnis, dass klothodefiziente Mäuse unter vermehrter Eryptose leiden und durch den Verlust von Klotho dehydriert sind, lässt die Hypothese nahelegen [169], dass Dehydratation auch zur Eryptose führt. Dazu wurden jeweils sechs Mäuse 36 h unter Wasserentzug gehalten, die Kontrollgruppe hatte Wasser ad libitum. Das entnommene Kapillarblut aus dem retroorbitalen Plexus der Mäuse konnte in vitro verschiedenen Stressoren (oxidativer Stress, hyperosmotischer Stress, Ionomycin, Energiedepletion)

ausgesetzt werden, um die Unterschiede zwischen hydrierten und dehydrierten Mäuseerythrozyten zu detektieren.

Tyrosinase, ein Enzym aus dem menschlichen Körper, das in *in vitro*-Experimenten auf sein apoptotisches Potential getestet wird und in Zellen die Caspase-3 erhöht [193], die auch in eryptotischen RBC erhöht ist, wird in den nachfolgenden Versuchen auf seine apoptotische Potenz an RBC getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Wasserdeprivation

2.1.1 Mäuse

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Gesetz für Tierschutz durchgeführt und von einem Votum der Ethikkommission befürwortet (PY-4/11).

Die Experimente wurden an männlichen C57Bl6 Mäusen (n=6 für jede Gruppe) im Alter von sieben Wochen durchgeführt. Die Mäuse erhielten Kontrollfutter (SSniff, Soest, Germany) während der Gesamtdauer des Experiments. Außerdem hatten die Mäuse Wasserzugang ad libitum oder wurden für 36 Stunden einem Wasserentzug ausgesetzt.

Um die Blutproben zu entnehmen, wurden die Mäuse mit Isoflurane (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim, Germany) leicht betäubt und 50-200µl Blut in heparinisierte Kapillaren aus dem retroorbitalen Plexus entnommen. Diese Blutproben wurden entweder sofort spontan gemessen (Abb. 9). Dafür wurden sie nicht zentrifugiert, sondern 4 µL Blut in 1 ml PBS direkt im FACS-Tube gelöst und gemessen.

Für die weiteren Versuche wurden die Mausblutproben zweimalig mit 8ml PBS gewaschen, danach bei 2000 g jeweils 10 min lang bei 22°C zentrifugiert, um die Blutkomponenten zu trennen. Plasma, Buffy Coat und PBS (Supernatant) wurden mit der Pipette abgenommen und für die Versuche nur das Erythrozytenkonzentrat verwendet.

2.1.2 Bestimmung der Plasmakonzentration

2.1.2.1 Plasmaosmolarität

Die Plasmaosmolarität wurde per Dampfdruck-Methode mit dem VAPRO 5520 Dampfdruck Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) bestimmt und ist in mmol/kg berechnet.

2.1.2.2 Calcitriol

Die Messung der Plasma-1,25$(OH)_2D_3$-Konzentrationen (IDS, Boldon, UK) wurde mit einem kommerziellen ELISA-Test-Kit gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und werden in pmol/l angegeben.

2.1.2.3 ADH

Die Messung des Plasma-Aldosteronspiegel (ADI, San Antonio, USA) wurde mit einem kommerziellen ELISA-Test-Kit gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und wird in pg/ml (Aldosteron) angegeben.

2.1.2.4 Kalzium im Serum

Die Serum-Kalzium-Konzentrationen wurden mittels photometrischer Methode bestimmt (FUJI FDC 3500i, Sysmex, Norsted, Germany).

2.1.3 Verwendete Lösungen

Alle Experimente wurden bei 37°C in Ringerlösung mit folgenden Komponenten durchgeführt (in mM): 125NaCl, 5KCl, 1$MgSO_4$, 32 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethansulfonic acid (HEPES)/NaOH (pH 7,4), 5 Glucose, 1 $CaCl_2$.

Bei gesondertem Hinweis ist zur Ringerlösung wahlweise 100µM tert-butyl-hydroxyl-peroxide (tert-BOOH, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) zur Induktion des oxidativen Stress oder 1µM Ionomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) zur Induktion des Kalziumeinstroms hinzugefügt worden.

Der pH-Wert der Ringerlösung wurde mit dem pH-Meter bestimmt und gegebenenfalls (bei Abweichung vom physiologischen pH-Wert) auf 7,4 kalibriert. Mit dem Osmometer wurde die Osmolarität der Lösung bestimmt und lag bei 290 mOsmol. Das Gleiche wurde bei der glukosefreien und der kalziumfreien Lösung und dem Annexin-Wash-Buffer gemacht. Auch bei der Lösung für den hyperosmotischen Schock wurde der pH auf 7,4 gebracht, die Osmolarität betrug jedoch 800 mOsmol. Alle Lösungen wurden zunächst unter

ständigem Rühren mit destilliertem Wasser gemischt und dann unter der sterilen Werkbank durch Millipore-Filter (Merck, Darmstadt, Germany) filtriert und anschließend bei +4 °C aufbewahrt, bis sie für Versuche benötigt wurden.

2.1.3.1 Ringerlösung

Erythrozyten sind Zellen, die über nur wenige Stoffwechselwege verfügen und deshalb in einem einfachen Elektrolytmedium wie der Ringerlösung überleben können. Dieses Medium gewährleistet die Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase.

In den folgenden Experimenten wurden die Erythrozyten *in vitro* mit einem Hämatokrit von 0,4% (1 ml Ringer mit 4 µl Erythrozytenkonzentrat) für 48 Stunden in Ringerlösung mit nachfolgendem Inhalt inkubiert (Tabelle 3).

Die Ringerlösung wurde mit der Puffersubstanz HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) versetzt. Es wird ein pH-Wert von 7,4 unter Zugabe von NaOH erzielt. Die Osmolarität beträgt 290 mOsmol/l.

Tabelle 3: Ringerlösung

	Menge für ca. 500ml [g]	***Konzentration [mM]***
NaCl	3,652	125
KCl	0,185	5
$MgSO_4$	0,148	1,2
HEPES	3,836	32,2
Glucose	0,45	5
$CaCl_2$	0,055	1
NaOH		nach Bedarf
H_2O	491,4 ml	

2.1.3.2 Glukosefreie Lösung

Um Eryptose zu induzieren wurden die Mäuseerythrozyten einem weiteren Stressor ausgesetzt: Sie wurden in glukosefreie Lösung gegeben. Durch diese Energiedepletion wurde der programmierte Zelltod induziert.

In diesem Falle wurde normale Ringerlösung ohne Glukose hergestellt, (s. 2.1.3.1.), es wird ein pH-Wert von 7,4 unter Zugabe von NaOH erzielt.

- Osmolarität betrug 290 mOsmol/l
- Inkubationszeit betrug 12 h

Tabelle 4: Glukosefreie Lösung

Substanz	***Menge für ca. 500ml [g]***	***Konzentration [mM]***
NaCl	3,652	125
KCl	0,185	5
$MgSO_4$	0,148	1,2
HEPES	3,836	32,2
$CaCl_2$	0,055	1
NaOH		nach Bedarf
H_2O	491,4 ml	

2.1.3.3 Hyperosmolare Lösung

Auch Hyperosmolarität als Stressor ist ein Trigger zum Zelltod. Die Zellen werden der hyperosmolaren Lösung ausgesetzt. Dies lässt durch den osmotischen Effekt Wasser aus der Zelle strömen und sie schrumpft. Für die hyperosmolare Lösung wurde der normalen Ringerlösung (vgl. 2.1.3.1) 800 mOsm/L Sacharose zugefügt.

- Osmolarität wurde mittels Osmometer geprüft
- Inkubationszeit beträgt 2 h

2.1.3.4 T-BOOH

Ebenso wie Hyperosmolarität und Energiedepletion wirkt oxidativer Stress als proapoptotischer Faktor. Zu der normalen Ringerlösung (vgl. 2.1.3.1) wurde mit 1µM Ionomycin, einem Ionophor für Kalzium versetzt. Ionophore sorgen im Allgemeinen dafür, dass spezifische Elektrolyte, eine ansonsten impermeable

Membran durchdringen können. die Ionomycin für einen Kalziumeinstrom in die Zelle, der wiederum den Mechanismus zur Eryptose einleitet.

- Osmolarität der Ringerlösung betrug 290 mOsm/L
- Inkubationszeit betrug 30 min.

2.1.3.5 Annexin- Wasch-Puffer

Annexin-Wasch-Puffer wurde als Trägerlösung für die Phosphatidylserinmessung sowie zum Verdünnen (1:50) des Annexin-V-Fluos (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) verwendet und unterscheidet sich von der normalen Ringerlösung nur durch den höheren Kalziumgehalt (Tabelle 5).

- Osmolarität beträgt 290 mOsml/L
- Inkubationszeit im Annexin-Wasch-Puffer (plus Annexin-V/ Fluo-3/AM) beträgt 30 min.

Tabelle 5: Annexin-Wasch-Puffer

Substanz	***Menge für ca. 500ml [g]***	***Konzentration [mM]***
NaCl	3,652	125
KCl	0,185	5
$MgSO_4$	0,148	1,2
HEPES	1,191	10
Glucose	0,45	5
$CaCl_2$	0,277	5
NaOH		Nach Bedarf
H_2O	495 ml	

2.2 Tyrosinase

2.2.1 Erythrozyten

Die ausgereiften Erythrozyten sind unter Verlust fast aller ihrer Zellorganellen zu teilungsunfähigen Zellen herangewachsen. Um dennoch ohne Zellkultur

experimentell mit ihnen arbeiten zu können, müssen für die Versuche Zellen von Blutspendern genommen werden.
Leukozytendepletierte Erythrozyten wurden freundlicherweise von der Blutbank der Universitätsmedizin Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der humanen Spendererythrozyten für die vorliegende Studie ist mit einem Votum (184/2003V) der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt. Die Blutproben sind von freiwilligen, gesunden Probanden entnommen worden, eine unterschriebene Einverständniserklärung liegt von allen Probanden vor.
Von den erhaltenen Blutproben werden 2 ml zweimalig mit 8 ml PBS gewaschen, danach bei 2000 g jeweils 10 min lang bei 22°C zentrifugiert, um die Blutkomponenten zu trennen. Plasma, Buffy Coat und PBS werden mit der Pipette abgenommen und die Erythrozytenkonzentrate in Eppendorf-Gefäßen bis zu den Experimenten bei + 4°C gelagert. Die Erythrozyten waren zu Versuchsbeginn nie älter als maximal 48 h.
Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37°C und mit einem Hämatokrit von 0,4% durchgeführt.

2.2.2 Verwendete Lösungen

2.2.2.1 Ringerlösung

Die Ringerlösung für humane Erythrozyten ist identisch mit der für murine Erythrozyten, diese wird in Kapitel 2.1.3.1 auf Seite 32 mit Tabelle 3 beschrieben.

2.2.2.2 Ca^{2+}-freie Lösungen

Auch in kalziumfreiem Milieu kann es zur kalziumunabhängigen Eryptose kommen. Somit kann man unterscheiden, ob es sich um den kalziumabhängigen bzw. um den kalziumunabhängigen Signalweg handelt.
In der Ca^{2+}-freien Lösungen wurde 1mM $CaCl_2$ durch 1mM glycol-bis(2-aminoethylether)-NNNN-tetraacetic acid (EGTA) ersetzt (Tabelle 6).
Die Ca^{2+}-freie Lösung wurde ebenfalls mit NaOH zu einem pH-Wert von 7,4 auftitriert und wies eine Osmolarität von 290 mOsmol/l aus.

Tabelle 6: Ca^{2+}-freie Lösungen

Substanz	***Menge für ca. 500ml [g]***	***Konzentration [mM]***
NaCl	3,652	125
KCl	0,185	5
$MgSO_4$	0,148	1,2
HEPES	3,836	32,2
Glucose	0,45	5
$CaCl_2$	-	-
NaOH		Nach Bedarf
H_2O	491,2 ml	

2.2.2.3 Annexin-Waschpuffer

Der Annexin-Waschpuffer für humane Erythrozyten ist identisch mit der für murine Erythrozyten, diese wird in Kapitel 2.1.3.5 auf Seite 34 mit Tabelle 5 beschrieben.

2.2.2.4 Phosphat-gepufferte Salzlösung

PBS-Lösung (Phosphate buffered Saline) wurde kommerziell erworben (Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.2.2.5 Tyrosinase

Tyrosinase von Pilzen wurde kommerziell erworben von Sigma-Aldrich, (Taufkirchen, Germany) und in den Konzentrationen 1, 5 und 7 U/ml Ringer verwendet.

Die erste Stammlösung enthielt 29,16 mg Tyrosinase und 1 ml destilliertes Wasser, die zweite Stammlösung wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass in 0,7 µl 1 U Tyrosinase vorhanden ist.

Für 1U/ml wurden 0,7 µl pro ml Ringerlösung pipettiert, für 5 U/ml 3,5 µl und für 7 U/ml entsprechend 4,9 µl.

Eine Ladekontrolle wurde bei jeweils allen Versuchen mit 4,9 µl destilliertem Wasser pro ml Ringerlösung durchgeführt. Alle unterschiedlichen Tyrosinase-

Konzentrationen und Kontrolllösungen wurden in Eppendorfgefäße verteilt. Ein Eppendorf wurde mit 1 ml der Lösung befüllt, dann wurden 4 µL Erythrozytenkonzentrat hinzugefügt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Der weitere Versuchsablauf wird im Folgenden in den einzelnen Unterpunkten abgehandelt.

2.2.3 Messung des intrazellulären Kalziums: Fluo-3/AM

Fluo-3/AM ist ein zellmembranpermeabler Ca^{2+}-Indikator, der fluoresziert und mithilfe des Durchflusszytometers Calibur gemessen werden kann.

Nach der Inkubationszeit (24 h) wurden die Erythrozyten mit Ringerlösung gewaschen und dann mit Fluo-3/AM (Calbiochem, Bad Soden, Germany) in Ringerlösung mit 5mM $CaCl_2$ und 5 µM Fluo-3/AM gefärbt (d.h. pro mL Annexin-Wash-Buffer kommen 5µL Fluo-3AM).

Die Zellen wurden für 30 min und bei 37°C inkubiert und angefärbt, um dann zweimal in Ringerlösung mit 5 mM $CaCl_2$ gewaschen zu werden.

Die Fluo-3/AM-gefärbten Erythrozyten wurden erneut in 200 µl Ringerlösung gegeben. Die kalziumabhängige Fluoreszensintensität wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm im Durchflusszytometer Calibur gemessen.

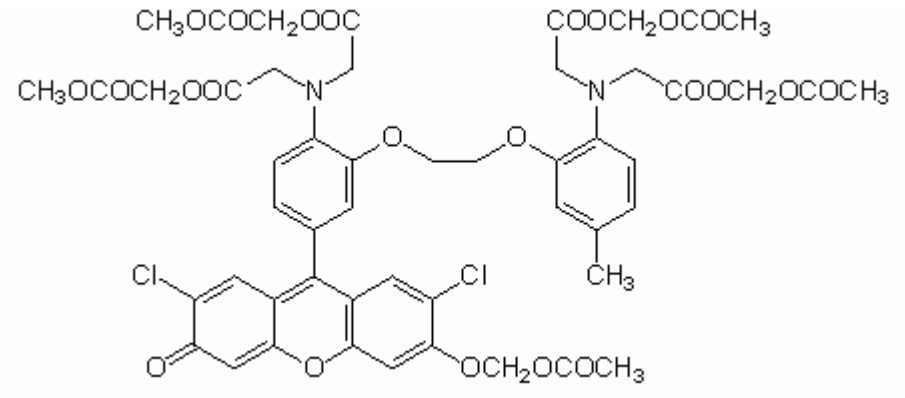

Abb. 6: Fluo-3/AM (Calbiochem, Germany)

2.2.4 Bestimmung der Ceramid- Bildung: Anti-Ceramide-Antikörper

Für die Bestimmung von Ceramid wurde ein monoklonaler antikörperbasierter Assay verwendet. Nach der regulären Inkubationszeit (24h) wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit 1 µg/mL Anti-Ceramide-Antikörper (clone MID

15B4, Alexis, Grünberg, Germany) in PBS mit 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) in einer 1:5 Verdünnung gefärbt.
Die Proben wurden zweimal gewaschen mit PBS-BSA. Anschließend wurden die Proben für 30 min mit einem polyklonalen Fluorescein Isothiocyanat (FITC), konjugiertem Ziegen-Anti-Maus IgG- und IgM-spezifischen Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Germany) in der Verdünnung 1:50 in PBS-BSA gefärbt. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch wiederholtes Waschen mit PBS-BSA entfernt.
Die Proben wurden bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm in dem Durchflusszytometer Calibur gemessen.

2.3 Durchflusszytometrische Analyse

Das Durchflusszytometer wird in verschiedenen Bereichen der Medizin und Biologie verwendet, um Zellen und ihre Eigenschaften zu messen. Der Name FACS steht für Fluorescent Activated Cell Sorter. Der Begriff ist von der Firma Becton Dickinson patentrechtlich geschützt (FACS-Calibur from Becton Dickinson; Heidelberg, Germany) und beschreibt Geräte, die durchflusszytometrisch Zellen nach ihrer Klassifikation (anhand bestimmter Merkmale) trennen.
Mit dem Durchflusszytometer wird es ermöglicht, verschiedenste physiologische Prozesse und Morphologien der unterschiedlichen Zellen quantitativ und qualitativ zu bestimmen [194].
Die verschiedenen Färbungen mit Antikörpern und Enzymen ermöglichen es heute, viele Prozesse auf molekularer Ebene zu messen.
Das Prinzip der Messung beruht auf Laserstrahlen, die von den Zellen abgelenkt und dann detektiert werden können [194].
Um die Zellen messen zu können, muss der Durchfluss Zelle für Zelle geschehen, ähnlich wie bei Autos auf einer einspurigen Straße. Die zellhaltige Flüssigkeit wird dabei von einem sogenannten Hüllstrom umhüllt, wobei die beiden Flüssigkeiten sich nicht vermischen und dennoch gleichzeitig

beschleunigt werden. Das Prinzip heißt hydrodynamische Fokussierung und gewährleistet die Messung einzelner Zellen, dadurch dass immer nur eine einzelne Zelle im Innern des Hüllstroms befindlich ist.
Das Licht der Laserstrahlen wird in unterschiedliche Richtungen gestreut, von unterschiedlichen Detektoren (Photomultiplier) erfasst und kann dementsprechend unterschiedliche zelluläre Eigenschaften messen. Der Detektor des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter) steht beinahe in Flussrichtung der Zellsuspension (07°- 10° zum Winkel) und misst die Zellgröße, indem es die Beugung des Lichts auf der Zelloberfläche detektiert.
Das Seitwärtsstreulicht wird von der Seite im 90° Winkel detektiert und misst Attribute wie Struktur und Granularität [195].
In den folgenden Versuchen wurde unter anderem mithilfe von Farbstoffen, sogenannte Fluorochrome, die Phosphatidylserin-Exposition und der Kalziumeinstrom in die Zelle gemessen. Fluorochrome sind meist Antikörper-gekoppelt und somit in der Lage, an bestimmte Bestandteile, zum Beispiel Cluster of Differentiation (CD) zu binden [196]. Mit der Energie der Laserstrahlen werden die Farbstoffe angeregt, auf ein höheres Energieniveau gehoben und fluoreszieren dann, geben also die Energie in Form von Licht wieder an die Umwelt ab. Die Intensität dieses Lichts kann dann mittels eines weiteren Detektors gemessen werden, um herauszufinden, ob die zu messenden Attribute in der Zelle vorhanden sind oder nicht (beispielsweise PS auf dem äußeren Bilayer der Membran). Bei dem verwendeten Durchflusszytometer wird mit einem gekühlten Argon-Ionen-Laser gearbeitet, der eine Wellenlänge von 488 nm besitzt (im menschlich sichtbaren Spektrum liegt dies bei blau), zusätzlich verfügt es über einen roten Diodenlaser mit der Emissionswellenlänge von 635 nm. Mithilfe von vier verschiedenen Kanälen können bis zu vier Färbungen gleichzeitig detektiert werden, jedoch muss die Emissionswellenlänge der einzelnen Färbungen weit genug auseinander liegen. In diesem Falle wird eine Emission des FL1-Kanals bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen.
Alle Eigenschaften, das heißt Forward Scatter, Sideward Scatter und die Fluoreszenzdetektion, können während eines Durchflusses gemessen werden,

da das Durchflusszytometer FACS Calibur der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) die verschiedenen Laser hintereinander geschaltet hat und die Fluoreszenz in einem anderen Kanal (FL1) gemessen wird [195].
Die Messergebnisse werden dann in einem Dot Plot aufgetragen (s. Abb. 7), wobei jeder Punkt im Dot Plot einer gemessenen Zelle entspricht.

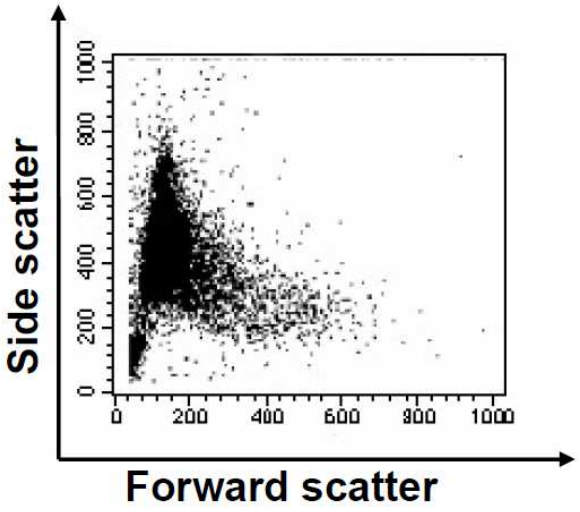

Abb. 7: Dot Plot einer durchflusszytometrischen Analyse: X-Achse zeigt den Side scatter, Y-Achse den Forward Scatter. Aus: Physiologisches Institut Tübingen

2.3.1 Durchführung der Versuche

Alle Versuche wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Die verschiedenen Konzentrationen von Tyrosinase wurden in 10-ml-Falcons mit der Ringerlösung (bzw. chloridfreie Lösung) gemischt und dann mit jeweils 1 ml in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Zu dieser Lösung wurde dann jeweils 4 µl Erythrozytenkonzentrat von unterschiedlichen Spendern mit unterschiedlichen Blutgruppen gegeben (n=4).
Die Proben wurden im Inkubator bei 37°C 24 h inkubiert und dann direkt weiterverarbeitet.
Für das Färben der Zellen mit Annexin-V und Fluo-3/AM wurden jeweils 150 µl der Proben entnommen und bei 20° für 3 min unter 1600 Umdrehungen pro Minute in einem 96-Wells-Plate abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Zell-Pellet wurde pro Well jeweils 200 µl von der Annexin-V-Lösung (5µL Annexin-V auf 1mL AWB, 1:500) beziehungsweise der Fluo-3/AM-Lösung (5µL Fluo-3/AM auf 1mL AWB, 1:500) hinzugefügt. Darauf folgte die Inkubation für 20 min bei 37°C im Inkubator. Gemessen wurden alle Proben im FACS

Calibur, die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest von Becton Dickinson.

2.3.2 Messung der Phosphatidylserin-Exposition

Wie bereits im Einleitungsteil erwähnt, ist ein für fast alle menschlichen Zellen charakteristisches Kriterium der Apoptose die Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Membranschicht. Die kalziumabhängig aktivierte Scramblase exponiert das eigentlich im inneren Layer gelegene Phophatidylserin auf das äußere Layer. Dies ist wiederum ein Signal für Makrophagen, solche Zellen zu eliminieren [23]. Auch die Erythrozyten nutzen die Exposition von Phosphatidylserin, um auf ihr Zugrundegehen aufmerksam zu machen ,[20].
Als eine der ersten Veränderungen, die eine Zelle vom Stadium der gesunden, funktionierenden zur apoptotischen durchläuft, gilt die PS-Exposition [197]. Dieser Tatsache ist es geschuldet, dass die PS-Expositionsmessung eine sehr sensitive Methode zur Eryptosemessung ist.
Im Falle von *in vitro* stimulierter Apoptose kann die PS-Exposition genutzt werden, um apoptotische Zellen nachzuweisen. Dies wird mithilfe eines Proteins (Annexin-V, VACalpha) aus der Familie der Annexine gemacht, die dafür bekannt sind, Phospholipide kalziumabhängig binden zu können [197]. Ein Kalziumentzug führt zur verminderten Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin. Dies wurde bei der Zusammensetzung des AWB, der Trägerlösung des Versuchs berücksichtigt. Sie enthält mehr Kalzium als Ringerlösung [198].
Zur Detektion wird das Annexin-V an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, in den Versuchen wurde Annexin-V-Fluos der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) verwendet. Annexin-V ist an FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppelt [197], das bei einer Wellenlänge von 521 nm angeregt wird und im FL1-Kanal bei 530 nm gemessen werden kann.

2.3.3 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Eine herausragende Rolle beim programmierten Zelltod von Erythrozyten nimmt der Kalziumeinstrom in die Zelle ein. Durch den Anstieg von Kalzium kommt es

zu verschiedenen Mechanismen die in ihrer Folge das apoptotische Absterben der Zelle ermöglichen. Zum einen wird die membranständige Scramblase aktiviert, die PS an der äußeren Zellmembran exponiert. Zum anderen werden kalziumabhängige Kaliumkanäle (Gardos-Kanäle) aktiviert und Kalium strömt aus der Zelle. Die Hyperpolarisation bewirkt einen Chloridausstrom und Wasser folgt dem osmotischen Gefälle, sodass es zur Zellschrumpfung kommt [20].
Mit Fluo-3/AM kann dieses intrazelluläre Kalzium mit dem Durchflusszytometer messbar gemacht werden.[199] Fluo-3/AM dringt in die Zelle ein und wird dort von Esterasen zu Fluo-3 hydrolysiert. Da Fluo-3 nicht membranpermeabel ist, wird sichergestellt, dass nur intrazelluläres Kalzium gemessen wird.
In den folgenden Experimenten wurde Fluo-3-AM der Firma Merck KGaA, (Darmstadt, Germany) verwendet und die Lagerung erfolgte bei +4°C unter Lichtausschluss. Die Exzitationswellenlänge der Messungen betrug 488 nm, gemessen wurde mit dem FL1-Kanal bei 530 nm.[200]

2.4 Statistik

Die Daten sind als arithmetisches Mittel ± SEM ausgedrückt. Wie in den Legenden der Schaubilder angegeben, wurde die statistische Analyse mit ANOVA mit Tukey's test als post-test und *t*-test gemacht. N entspricht der Anzahl von verschiedenen Erythrozytenproben, die untersucht wurden. Dadurch, dass verschiedene Erythrozytenproben in unterschiedlichen Experimenten genutzt wurden, sind sie unterschiedlich sensibel auf die diversen Trigger der Eryptose; für Kontrollen und Testkonditionen wurden jeweils die gleichen Erythrozytenproben verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Dehydratation

3.1.1 Messgrößen der Dehydratation

In der folgenden Abb. 8 A-D finden sich zum einen die Plasmaosmolarität, die ADH- und Calcitriol-Konzentrationen und die Serumkalziumkonzentrationen. In Abb. 8 A ist zu erkennen, dass die Kontrollgruppe der Mäuse (also jene, die Wasser ad libitum hatten und in der Grafik mit weißen Balken dargestellt sind) bei ca. 280 mmol/kg liegt, wohingegen die dehydrierten Mäuse (36 h ohne Wasser, in der Grafik mit schwarzen Balken dargestellt) eine durchschnittliche Plasmaosmolarität von ca. 310 mmol/kg aufwiesen, folglich den Serum Marker der Dehydratation aufwiesen. Ebenso haben sich sowohl die ADH (Abb. 8 B) als auch die Calcitriol-Konzentrationen (Abb. 8 C) bei den dehydrierten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Das ADH stieg von im Mittel von ca. 550pg/ml auf über 1200 pg/ml, die Konzentration von Calcitriol stieg von ca. 170 pmol/L im Mittel auf 310 pmol/L im Mittel. Die Kalziumplasmakonzentration der Mäuse der Kontrollgruppe betrug im Mittel 9,25 mg/dl und stieg bei den dehydrierten Mäusen auf 10,25mg/dl im Mittel an.

Alle Balken zeigen das arithmetische Mittel an und wurden mit n=5-6 ermittelt.

* ($p<0.05$), **($p<0.01$) und *** ($p<0.001$) stellen die Signifikanz zwischen den hydrierten Mäusen (Kontrollgruppe) und den dehydrierten Mäusen dar.

Diese Messungen wurden gemacht, um den Effekt des 36-stündigen Wasserentzugs quantifizierbar zu machen und die erfolgreiche Dehydrierung der Versuchsmäuse im Vergleich zu den Kontrollgruppen-Mäusen zu bestätigen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung der Calcitriol-Konzentration kommt. Dies kann der Dehydratation und der nachfolgenden Abnahme der Transkription von Klotho zu Grunde gelegt werden. Die Abnahme von Klotho kann zumindest teilweise durch die Zunahme von Aldosteron und ADH erklärt werden [178].

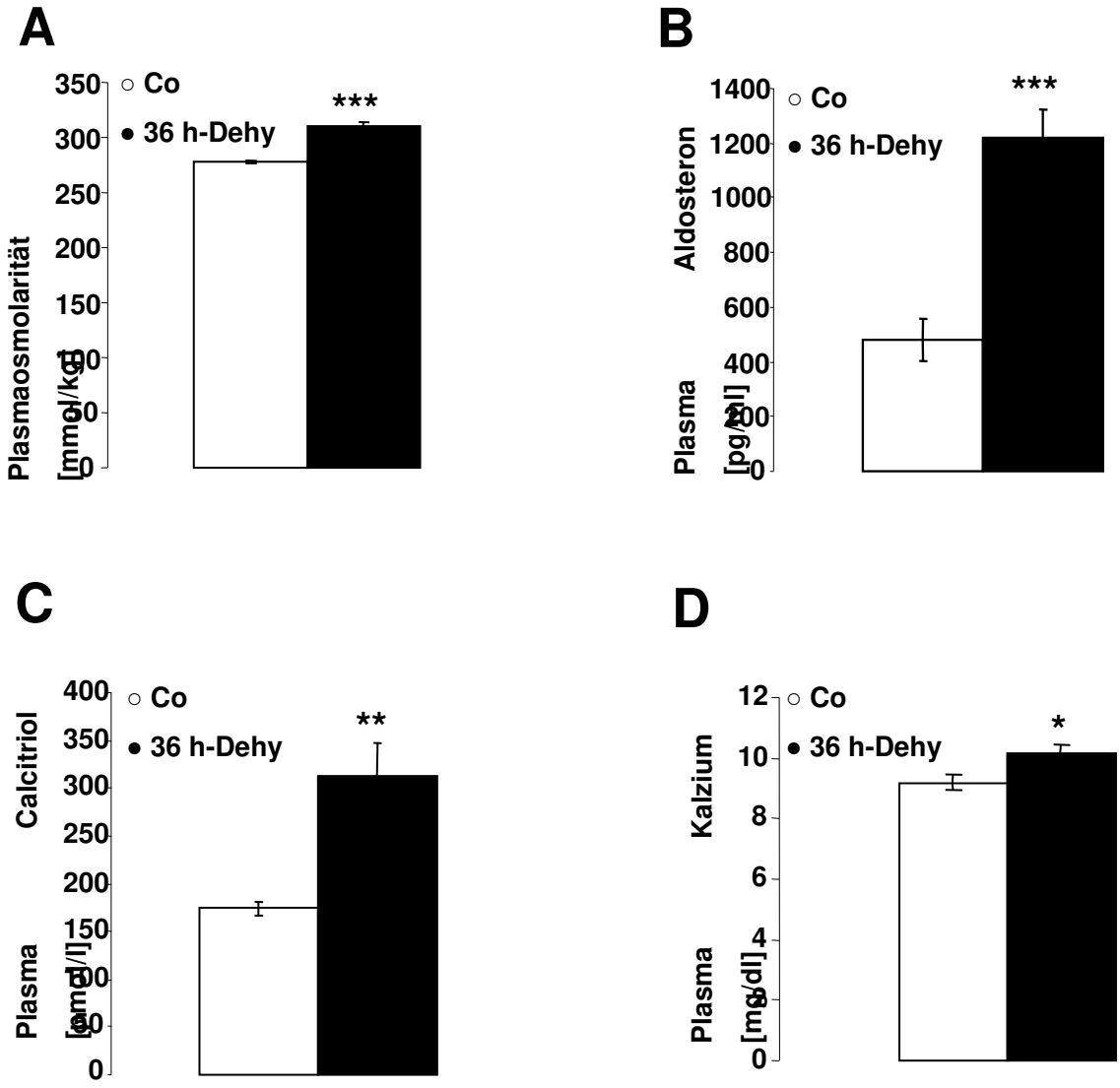

Abb. 8: A: Plasmaosmolarität, B Plasmaaldosteronkonzentration C Plasmacalcitriolkonzentration und D Plasmakalziumkonzentration jeweils der Kontrollgruppe (weiße Balken) und dehydrierte Mäuse (schwarze Balken). Die Balken zeigen das arithmetische Mittel, * ($p<0.05$), **($p<0.01$) und *** ($p<0.001$) stellen die Signifikanz zwischen den hydrierten Mäusen (Kontrollgruppe) und den dehydrierten Mäusen dar.

3.1.2 Phosphatidylserin-Exposition der murinen Erythrozyten

Die Phosphatidylexposition ist einer der markantesten Veränderungen, die Zellen im Ablauf der Apoptose unterlaufen. So war diese Zellveränderung auch bei den dehydrierten Mäusen zu beobachten. Zunächst wurde jedoch sowohl das frisch abgenommene Blut der beiden Gruppen (Kontrolle und 36 h-dehydrierte) als auch das Blut nach 48 h Inkubation in Ringerlösung untersucht.

Bei dem frisch nach der Entnahme gemessenen Blut konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (grauer Bereich) und den dehydrierten Mäusen (schwarze Linie) gemessen werden (s. Abb. 9).

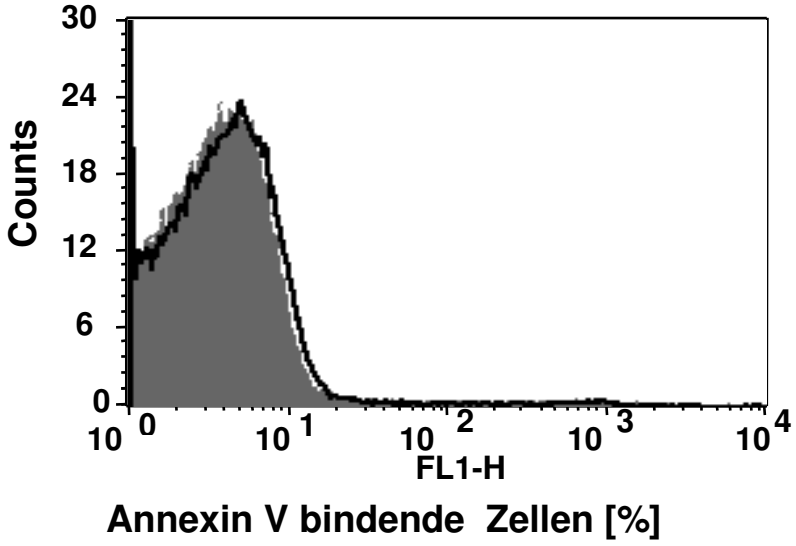

Abb. 9: Repräsentatives Histogramm zum Effekt der PS-Exposition bei spontaner Messung bei der Kontrollgruppe (grauer Bereich) und der 36h-dehydrierten Mäuse (schwarze Linie).

Bei dem Blut, das 48 Stunden lang bei 37°C mit Ringerlösung inkubiert wurde, konnte zunächst ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den dehydrierten Mäusen gemessen werden. In Abb. 10 sieht man ein repräsentatives Histogramm des Durchflusszytometers mit dem grauen Bereich für die Kontrollgruppe und der schwarzen Linie für die dehydrierten Mäuse. Der zweite Anstieg (x-Achse) liegt bereits im Messbereich der eryptotischen Erythrozyten im FL1-Kanal.

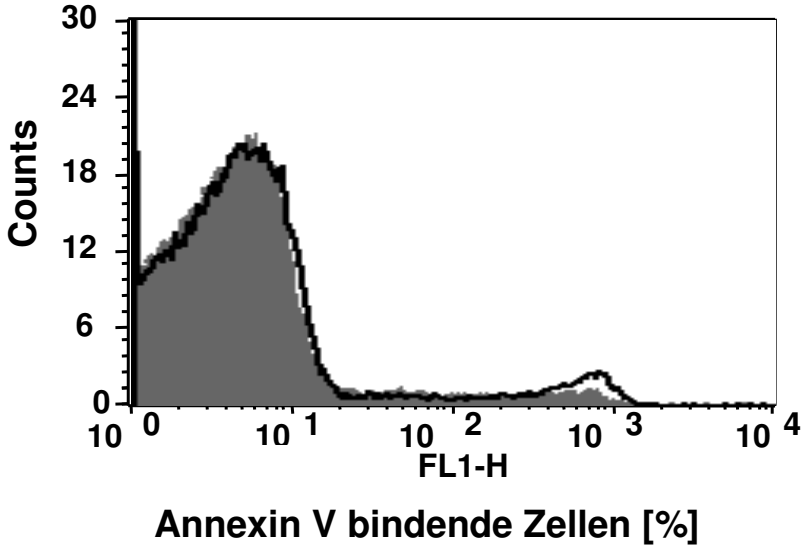

Abb. 10: Repräsentatives Histogramm zum Effekt der PS-Exposition nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung bei der Kontrollgruppe (grauer Bereich) und der 36-h-dehydrierten Mäuse (schwarze Linie).

Nach dieser Erkenntnis wurde der Versuch um eine Messung 24 h nach Expositionsbeginn erweitert. In der folgenden Abb. 11 wird das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung der in Ringerlösung inkubierten Mäuseerythrozyten (Kontrolle und 36h-Dehydratation) zum Zeitpunkt 0 – 24 h – 48 h aufgezeigt. Dieser Versuch zeigte einen signifikanten Anstieg der PS-Expostion der dehydrierten Mäuse im Vergleich zu den hydrierten Mäusen nach spontaner Messung und Inkubation der Mauserythrozyten.

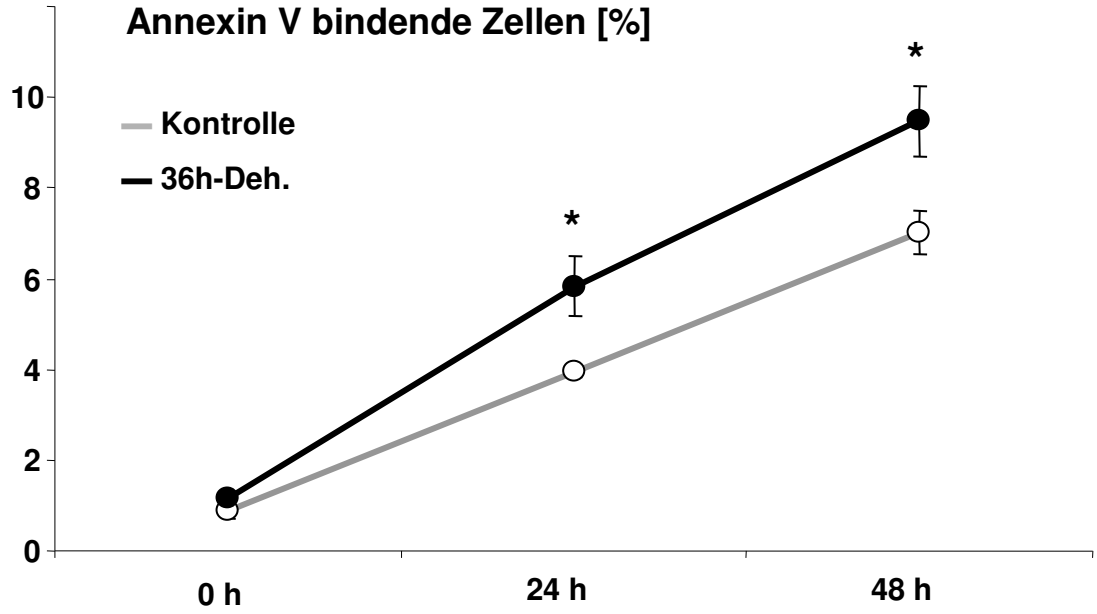

Abb. 11: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6) zeigen das Annexin V Bindungsverhalten der hydrierten (graue Linie) im Vergleich zu den dehydrierten Mäusen (schwarze Linie) im Abstand von jeweils 24 Stunden (0 H- 24H- 48H) * ($p<0.05$) weist den signifikanten Unterschied zwischen hydrierten und dehydrierten Mäsuen aus. (ANOVA)

Die weiteren Versuche sollten zeigen, ob die Mauserythrozyten der dehydrierten Mäuse sensitiver auf die bekannten Trigger der Eryptose: Ionomycinexposition, oxidativer Stress, hyperosmotischer Schock und Energiedepletion reagieren als die Erythrozyten der Kontrollgruppe, also den hydrierten Mäusen.

3.1.3 Energiedepletion

Energiedepletion, das wie in der Einleitung schon erwähnt ein Trigger der Eryptose ist, konnte auch in den Versuchen mit den dehydrierten Mauserythrozyten als Trigger der Eryptose identifiziert werden. Der 12-stündige Aufenthalt der Erythrozyten in glukosefreier Lösung wird hier als repräsentatives Histogramm des Durchflusszytometers dargestellt (Abb. 12 und 13). Abb. 12 zeigt die PS-Exposition der hydrierten Mäuseerythrozyten (grauer Bereich) und der dehydrierten (schwarze Linien) nach 12-stündiger Inkubation in normaler Ringerlösung, also mit Glukose.

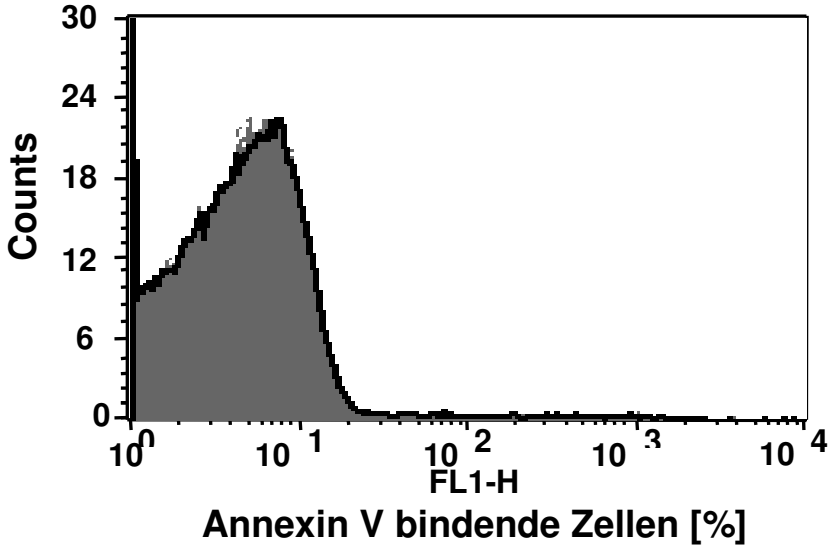

Abb. 12: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V bindenden Zellen nach 12-stündiger Exposition der Mauserythrozyten (grauer Schatten- Kontrollgruppe, schwarze Linie- dehydrierte Mäuse) in Ringerlösung.

Abb. 13 zeigt in derselben Konfiguration ein repräsentatives Histogramm nach 12-stündiger Inkubation in glukosefreier Lösung.

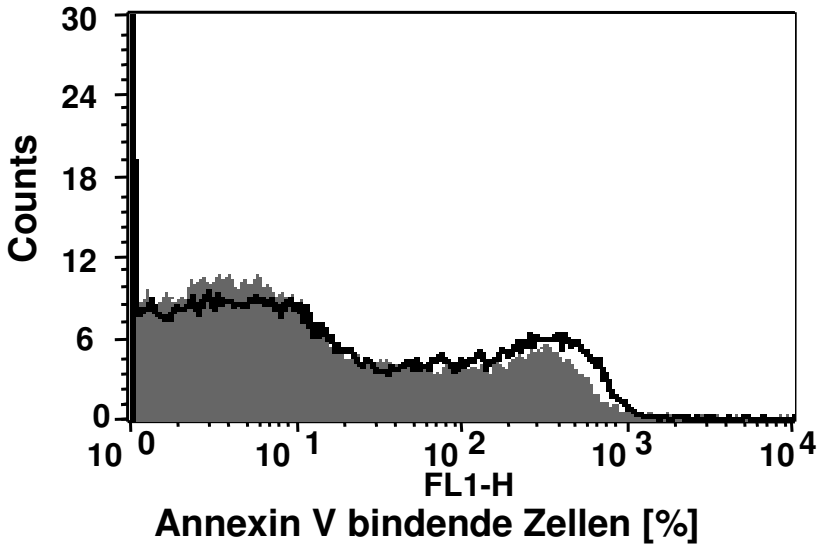

Abb. 13: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V bindenden Zellen nach 12-stündiger Exposition der Mauserythrozyten (grauer Schatten- Kontrollgruppe, schwarze Linie- dehydrierte Mäuse) in glukosefreier Lösung.

In Abb. 14 kann der Unterschied der PS-Exposition sowohl zwischen den hydrierten und dehydrierten Mauserythrozyten erkannt werden als auch zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe unter Energiedepletion. Es zeigt

sich, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den hydrierten Mauserythrozyten mit und ohne Glukose als auch zwischen den dehydrierten Mauserythrozyten mit und ohne Glukose gibt. Dies gibt Aufschluss darüber, dass der Versuchsaufbau funktioniert und beide Mauserythrozyten ohne Glukose Schaden nehmen. Bei den beiden rechten Balken der Abb. 14 ist der signifikante Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (hydrierte Mäuse) und den dehydrierten Mauserythrozyten zu beachten. Dargestellt wird es in Prozent der exponierenden Zellen und dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung.

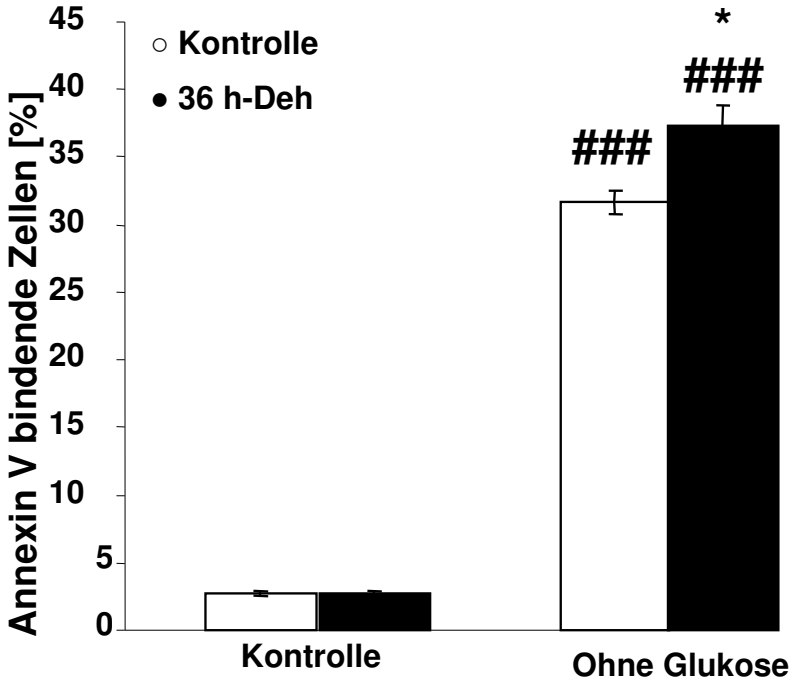

Abb. 14: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6) der Kontrolle (12-stündige Exposition in Ringerlösung, linke Balken) und der energiedepletierten Erythrozyten (12-stündige Exposition in glukosefreier Umgebung, rechte Balken) jeweils der Kontrollgruppenmäuse (weiße Balken) und der dehydrierten Mauserythrozyten (schwarze Balken). *($p<0.05$) zeigt den signifikanten Unterschied zu den Erythrozyten der hydrierten Mäuse, ###($p<0.001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Ringerlösung an (ANOVA).

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass Energiedepletion für Erythrozyten ein Trigger zur PS-Exposition darstellt und dass Erythrozyten dehydrierter Mäuse stärker anfällig für diesen Trigger des eryptotischen Zelltodes sind.

3.1.4 Ionomycin

Ionomycin konnte als starker Trigger der PS-Expostion der Erythrozyten identifiziert werden [132]. Im folgenden Versuch wurde getestet, ob die Potenz von Ionomycin auf die durch Dehydrierung bereits vorgeschädigten Erythrozyten von Mäusen zunimmt.

Die repräsentativen Histogramme in den Abb. 15 und 16 zeigen zum einen die 30-minütige Exposition der Erythrozyten von hydrierten (grauer Bereich) als auch von dehydrierten (schwarze Linie) Mäusen in physiologischem Milieu (Ringerlösung) (Abb. 15).

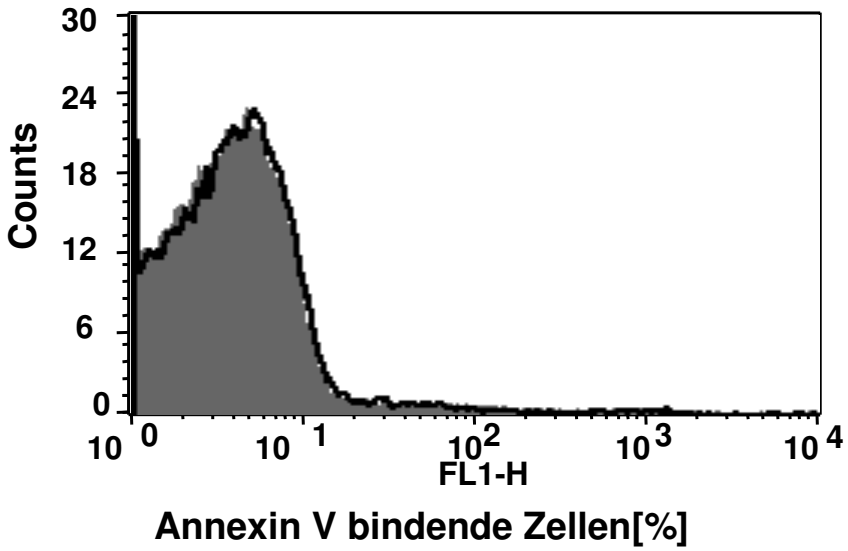

Abb. 15: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V-bindenden Zellen des FACS mit hydrierten (grauer Bereich) und dehydrierten (schwarze Linie) Mauserythrozyten nach 30-minütiger Inkubation in Ringerlösung.

Und zum anderen die Ergebnisse einer 30-minütigen Exposition in 1 µM des Kalziumionophors Ionomycin (Abb. 16).

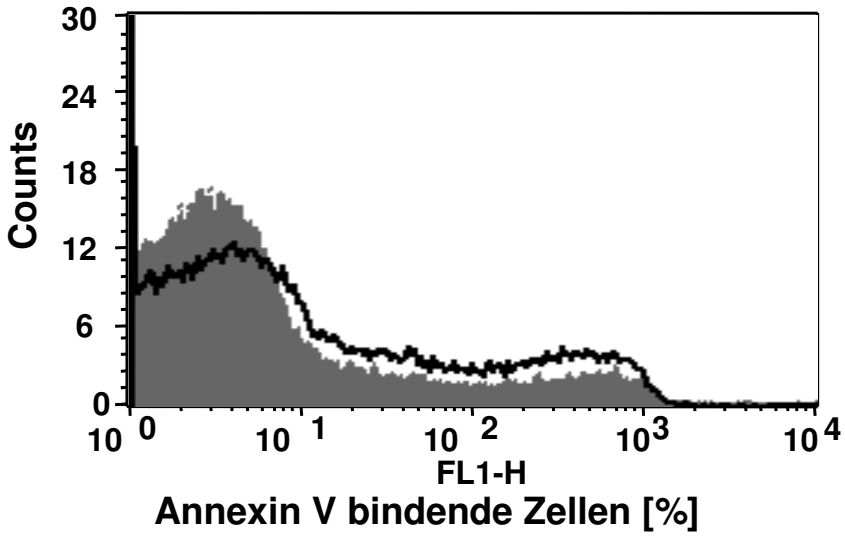

Abb. 16: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V-bindenden Zellen des FACS mit hydrierten (grauer Bereich) und dehydrierten (schwarze Linie) Mauserythrozyten nach 30-minütiger Inkubation in Ringerlösung mit 1µM des Kalziumionophor Ionomycin.

In Abb. 17 kann die Phoyphatidylserinexposition sowohl zwischen der Kontrollgruppe, die 30 min in Ringerlösung inkubierte und der Ionomycingruppe, die 30 min in Ringerlösung und 1µM Ionomycin inkubierte, unterschieden werden (linke Balken bzw. rechte Balken), als auch zwischen den Erythrozyten aus den hydrierten Mäusen (weiße Balken) und den dehydrierten Mäusen (schwarze Balken). Dargestellt wird es in Prozent der exponierenden Zellen und dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung.

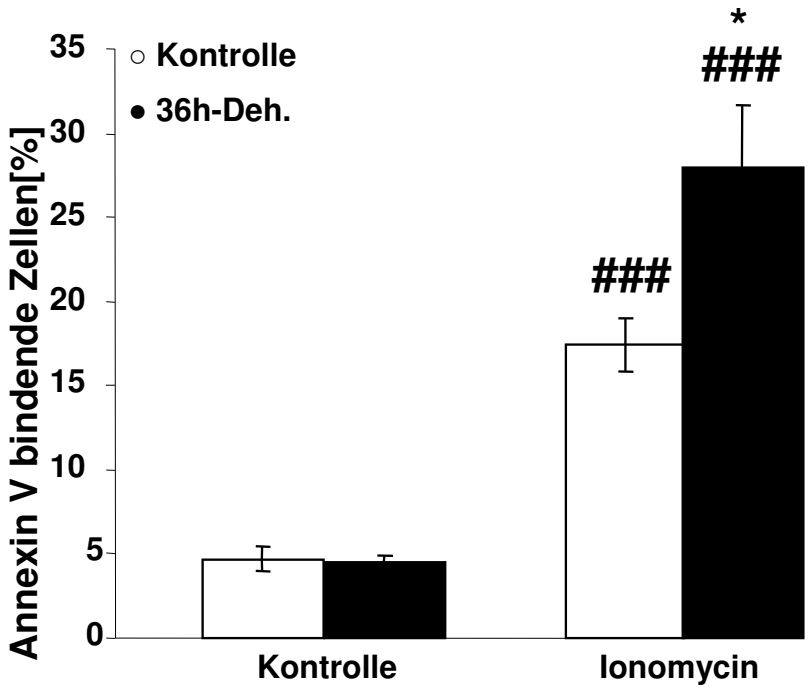

Abb. 17: Arithmetische Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=6) der Phosphatidylserin-Exposition der Mauserythrozyten in der Kontrolle links (30-minütige Exposition in Ringerlösung) und der 1µM Ionomycin enthaltenden Ringerlösung rechts. Die hydrierten Kontrollmäuse sind in den weißen Balken dargestellt, die dehydrierten Mäuse mit den schwarzen Balken.* ($p<0.05$) zeigt den signifikanten Unterschied zu hydrierten Mäusen an, ### ($p<0.001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Kontrolle in Abwesenheit von Ionomycin an (ANOVA).

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass die Anwesenheit von 1 µM des Kalziumionophors Ionomycin für Erythrozyten ein Trigger zur PS-Exposition darstellt und dass Erythrozyten dehydrierter Mäuse stärker anfällig für diesen Trigger des eryptotischen Zelltodes sind.

3.1.5 Hyperosmotischer Schock

Wie bereits weiter oben erwähnt ist der hyperosmotische Schock, der auch im Nierenmark physiologischerweise vorkommt, ein Trigger der Phosphatidylserin-Exposition der humanen und murinen Erythrozyten, der mit einem eryptotischen Zugrundegehen einhergeht. Im folgenden Versuch sollte gezeigt werden, dass die Erythrozyten dehydrierter Mäuse sensitiver auf einen hyperosmotischen Schock mit PS-Exposition reagieren als Mauserythrozyten der hydrierten Kontrollgruppe. In Abb. 18 ist ein repräsentatives Histogramm der PS-Exposition der Mauserythrozyten der hydrierten Kontrollgruppe (grauer Bereich) und der dehydrierten Mäuse (schwarze Linie) nach 2-stündiger Inkubation in

Ringerlösung zu sehen. Nur wenige Erythrozyten zeigen eine Annexin V Bindung und somit PS-Exposition.

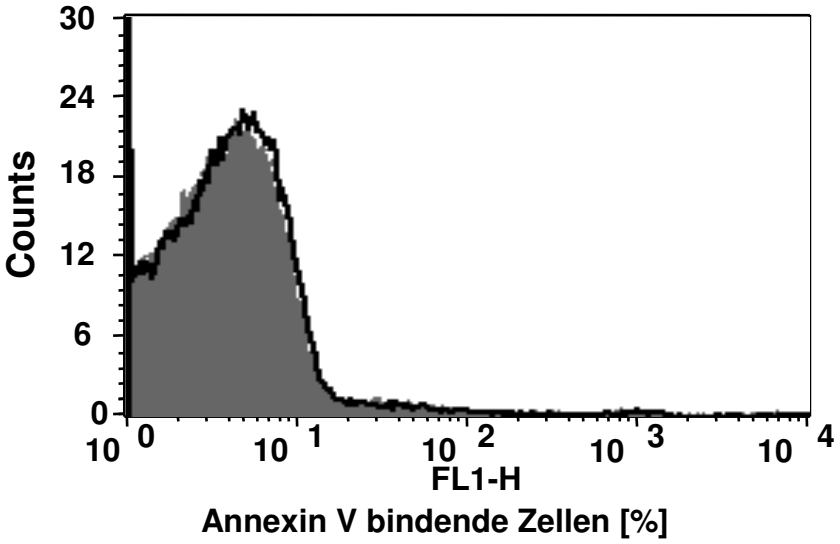

Abb. 18: Repräsentatives Histogramm der Annexin V bindenden Zellen in % der hydrierten Mäuse (grauer Bereich) und der dehydrierten Mäuse (schwarze Linie) nach 2-stündiger Exposition in Ringerlösung.

In Abb. 19 ist ein repräsentatives Histogramm der PS-Exposition der Mauserythrozyten der hydrierten Kontrollgruppe (grauer Bereich) und der dehydrierten Mäuse (schwarze Linie) nach 2-stündiger Inkubation in Ringerlösung und 800 mOsm Saccharose zu sehen. Die Erythrozyten zeigen bei beiden Gruppen (hydriert und dehydriert) einen Anstieg der PS-Exposition.

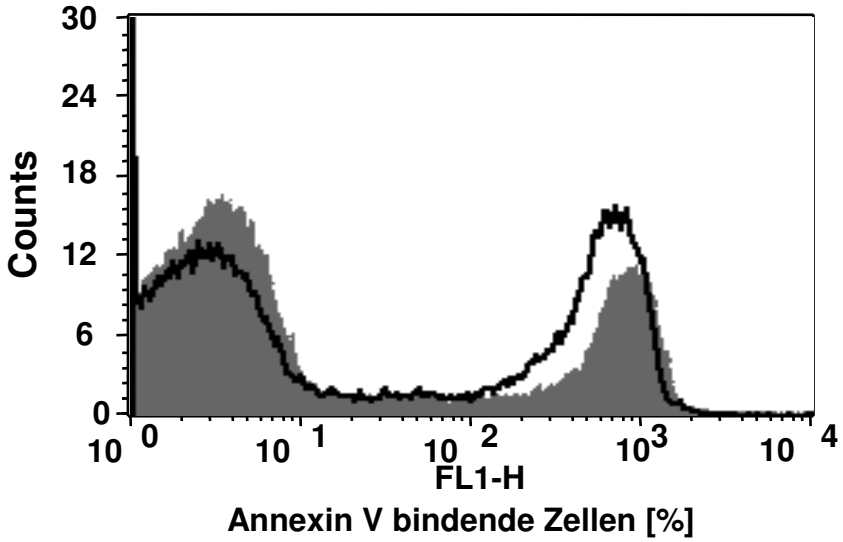

Abb. 19: Repräsentatives Histogramm der Annexin V bindenden Zellen in % der hydrierten Mäuse (grauer Bereich) und der dehydrierten Mäuse (schwarze Linie) nach 2-stündiger Exposition in Ringerlösung mit 800 mOsm Saccharose.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Abb. 20 festgehalten; es kann die Phosphatidylserin-Exposition sowohl zwischen der Kontrollgruppe, die 2 Stunden in Ringerlösung inkubierte und der 800mOsm-Gruppe, die 2 Stunden in Ringerlösung und 800 mOsm Saccharose inkubierte, unterschieden werden (linke Balken bzw. rechte Balken), als auch zwischen den Erythrozyten aus den hydrierten Mäusen (weiße Balken) und den dehydrierten Mäusen (schwarze Balken). Dargestellt wird es in Prozent der exponierenden Zellen und dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung.

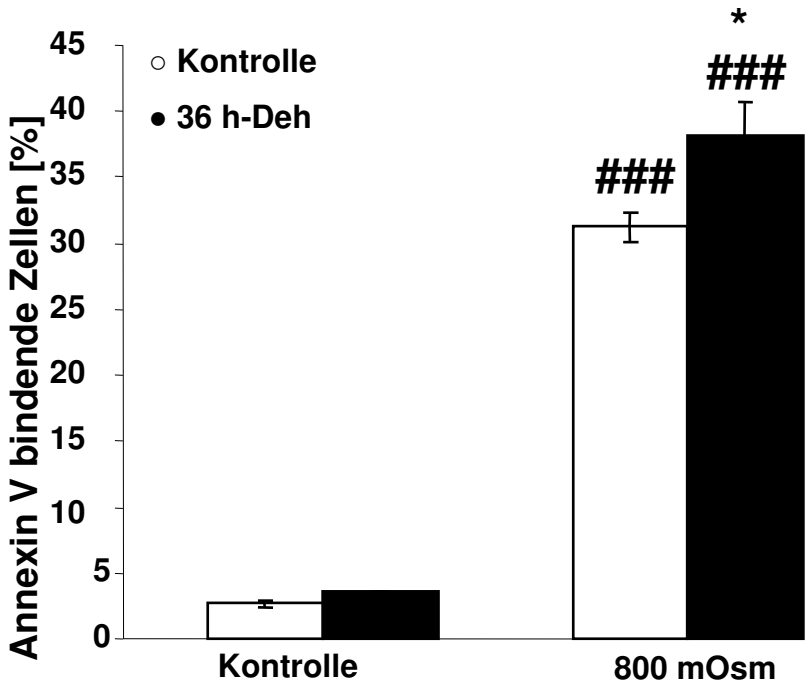

Abb. 20: Arithmetische Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=6) der Phosphatidylserin-Exposition der Mauserythrozyten in der Kontrolle links (2-stündige Exposition in Ringerlösung) und der 800 mOsm enthaltenden Ringerlösung rechts. Die hydrierten Kontrollmäuse sind in den weißen Balken dargestellt, die dehydrierten Mäuse mit den schwarzen Balken.* ($p<0.05$) zeigt den signifikanten Unterschied zu hydrierten Mäusen an, ### ($p<0.001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Kontrolle in isotonem Milieu an (ANOVA).

3.2 Tyrosinase

Die Ergebnisse der folgenden Versuche sollten beweisen, dass Tyrosinase aus Pilzen *in vitro* an humanen Erythrozyten ein eryptotisches Geschehen auslöst. Eines der signifikantesten Merkmale der Apoptose in Erythrozyten ist die Phosphatidylserinexpostition an der äußeren Membranschicht, die mit Messungen mittels des Durchflusszytometers und einer AnnexinV(FITC) Färbung bestimmt werden kann. Weitere Merkmale, die man mittels des FACS messbar machen kann, sind der Kalziumeinstrom (Fluo-3AM) und die Zellgröße, die mittels des Forward Scatter ermittelt wird.

3.2.1 Phosphatidylserin-Exposition: Annexin V

Die PS-Exposition an der Zellmembranaußenseite gehört mit zu den markantesten Ereignissen bei der Apoptose zellkernloser RBC. Im folgenden Originalhistogramm (Abb. 21) wird die Annexin V-Bindung der Erythrozyten gezeigt, die 24 h in Ringerlösung inkubiert wurden.

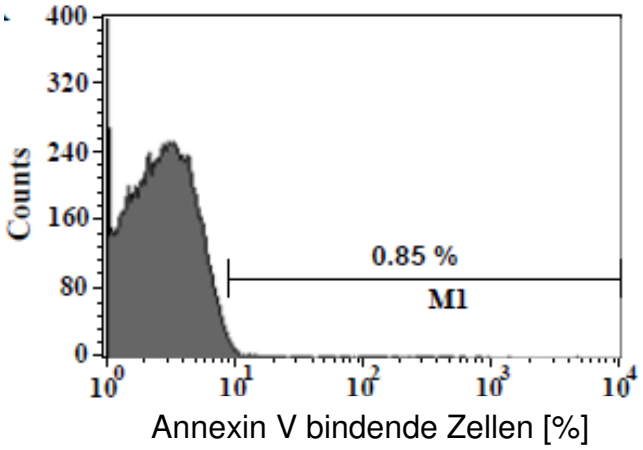

Abb. 21: Repräsentatives Histogramm der Annexin V-Bindung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung. M1 ist das Gate der Annexin V-bindenden Zellen.

In Abb. 22 sieht man im Vergleich zu Abb. 21 ein repräsentatives Histogramm der Annexin V-Bindung der Erythrozyten nach 24 h Inkubationszeit in Ringerlösung mit 7 U/ml Tyrosinase von Pilzen

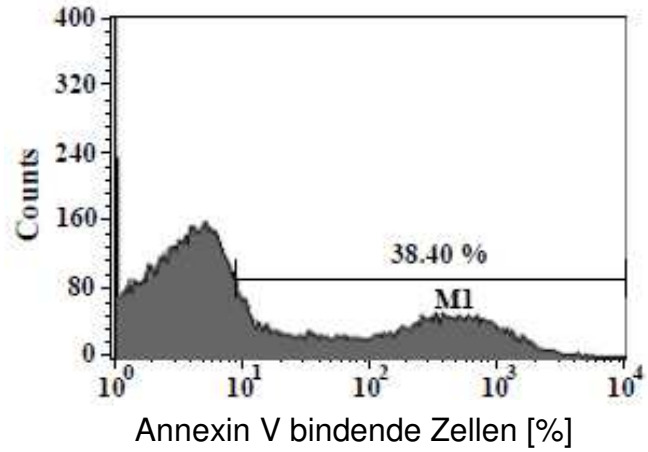

Abb. 22: Repräsentatives Histogramm der Annexin V Bindung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung mit 7 U/ml Tyrosinase von Pilzen. Im M1 Gate werden die Annexin V-bindenden Zellen detektiert und gezählt.

Die Ergebnisse werden in Abb. 23 zusammengefasst. Sie zeigt die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichungen der prozentualen Anzahl der Zellen, die Annexin V binden, also der Zellen, die PS am äußeren Membranblatt exponieren und eryptotisch zugrunde gehen. Der weiße Balken stellt die Kontrolle dar: Erythrozyten die nur in Ringerlösung suspendiert wurden. Die schwarzen Balken stellen die unterschiedlichen getesteten Tyrosinasekonzentrationen 1 – 5 – 7 U/ml dar und der graue Balken die

Ladekontrolle mit derselben Menge an Lösungssubstanz (destilliertes Wasser) wie für 7 U/ml Tyrosinase benötigt wurde.

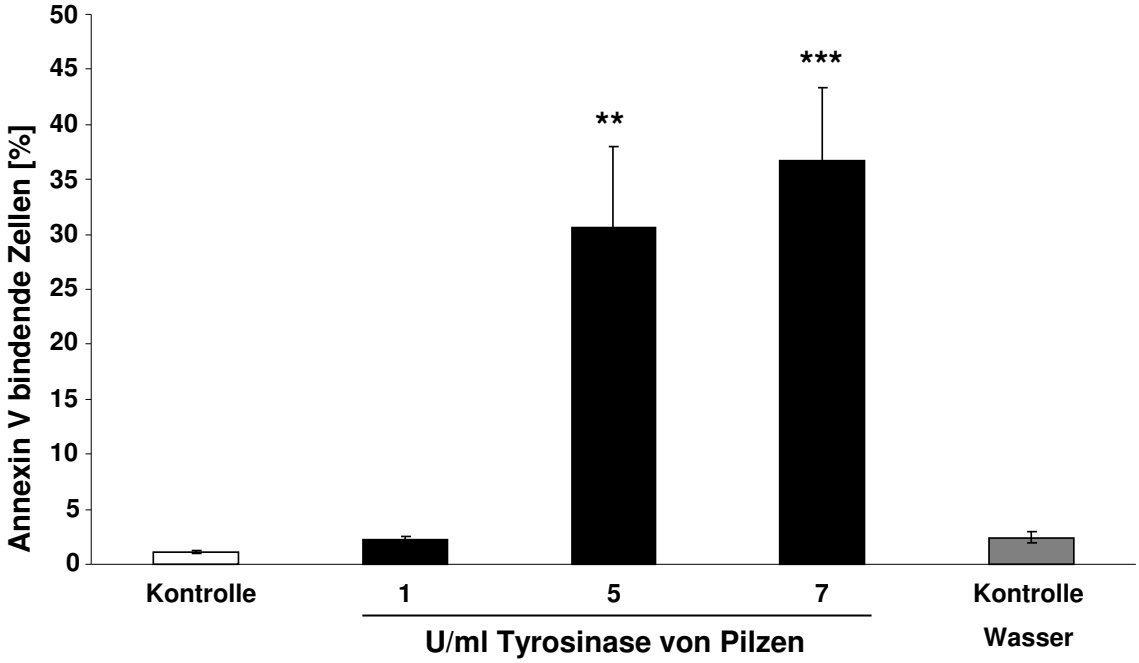

Abb. 23: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4) der Annexin V- bindenden Zellen nach 24 h Inkubation in Ringerlösung (weißer Balken), in Ringerlösung mit 1, 5, 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und in Ringerlösung mit 4,9 µL destilliertem Wasser je ml Ringerlösung als Ladekontrolle (grauer Balken). ** ($p<0,01$) und *** ($p<0,001$) zeigen die Signifikanz zur Abwesenheit von Tyrosinase an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tyrosinase die PS-Exposition der RBC ab einer Konzentration von 5 U/ml signifikant steigert und somit eines der wichtigen Merkmale der Eryptose induziert.

3.2.2 Zellgröße: Forward Scatter

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Eryptose, aber auch der Apoptose allgemein, ist die Zellschrumpfung. Die Zellgröße der Erythrozyten kann im FACS mithilfe des Forward Scatter, dem senkrecht einfallenden Laserstrahl gemessen werden. Abb. 24 zeigt ein repräsentatives Histogramm der Erythrozyten nach 24 h Inkubation in Ringerlösung (grauer Bereich) und 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie).

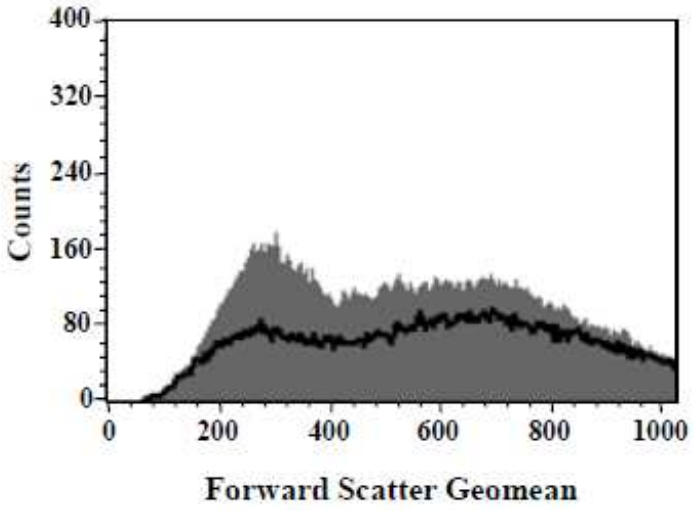

Abb. 24: Repräsentatives Histogramm des Forward Scatter von Erythrozyten, die 24h in Ringer ohne Tyrosinase (grauer Bereich) oder mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie) inkubiert waren.

Die folgende Abb. 25 zeigt das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung von Erythrozyten, die 24 h in Ringerlösung als Kontrolle (weißer Balken), in 1, 5, 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) oder Ringerlösung und 4,9µL destilliertes Wasser als Ladekontrolle (grauer Balken) inkubiert wurden. Die Tendenz zeigt paradoxerweise ein steigendes Zellvolumen, es erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Weitere Experimente wurden gemacht, um herauszufinden, ob Tyrosinase möglicherweise Erythrozyten vor dem Effekt von Kalziumeinstrom, induziert durch Ionomycin schützt. Durch den Kalziumeinstrom schrumpfen die Zellen. Tyrosinase kann diesen Effekt nicht verhindern und somit sank die Zellgröße (gemessen durch den Forward Scatter) nach 30-minütiger Inkubation mit 1 µM Ionomycin von 518 ± 6 GeoMean (n=4) in der Kontrolle auf 134± 5 GeoMean (n=4) nach Inkubation mit 7 U/ml Tyrosinase. Tyrosinase kann also die Zellschrumpfung nach ionomycininduziertem Kalziumeinstrom nicht verhindern.

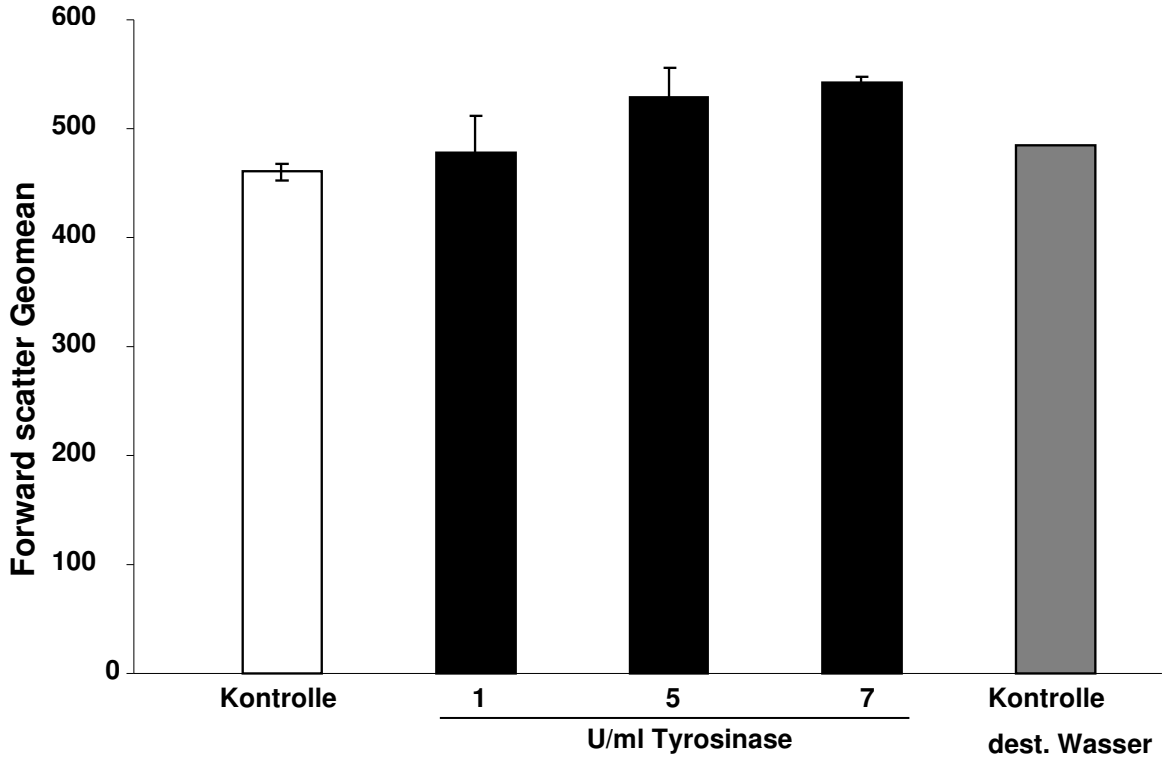

Abb. 25: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) vom normalisierten Geomean des Forward Scatter nach der 24 h Inkubation der Erythrozyten mit (schwarze Balken) oder ohne (weißer und grauer Balken) Tyrosinase.

Zusammenfassend kann anhand der Daten eine Tendenz der Zellvergrößerung festgestellt werden, die nicht mit der Eryptose erklärbar ist. Die Ergebnisse erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

3.2.3 Zytosolische Kalziumkonzentrationen: Fluo-3AM

Der Kalziumeinstrom in die RBC ist ein weiteres Merkmal der Eryptose, das mit Hilfe des Durchflusszytometers messbar gemacht wird. Zur Färbung wird Fluo-3AM verwendet, eine Substanz, die zellmembrangängig ist und intrazellulär von Esterasen zu Fluo-3 geschnitten wird, das durch diese Modifikation nicht mehr zellmembrangängig ist, also die Zelle nicht mehr verlassen kann. Fluo-3 bindet irreversibel an das zytosolische Kalzium und kann mittels Durchflusszytometers detektiert werden. Die folgende Abb. 26 zeigt ein repräsentatives Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenzmessung im FL1-Kanal des Durchflusszytometers nach 24-stündiger Inkubationszeit in Ringerlösung (grauer Bereich) und in Ringerlösung mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linien).

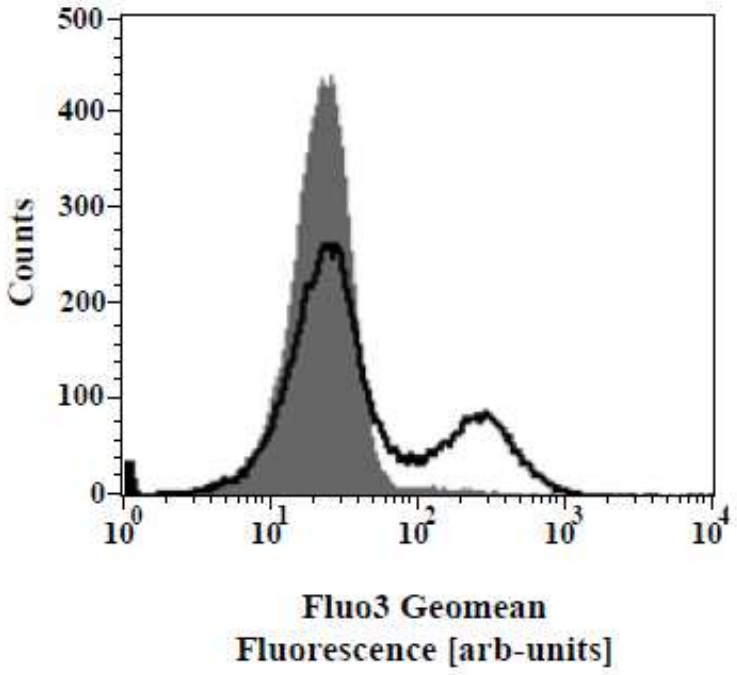

Abb. 26: Repräsentatives Histogramm von Fluo-3-Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation ohne (grauer Bereich) und mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie).

In Abb. 27 wird verdeutlicht, dass der Effekt des Kalziumeinstroms statistische Signifikanz erreicht. Dargestellt werden die arithmetischen Mittelwerte mit der Standardabweichung von den Erythrozytenproben, die jeweils 24 h mit folgenden Substanzen inkubierten: Ringerlösung (weißer Balken), Ringerlösung mit jeweils 1, 5 oder 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) oder Ringerlösung mit 4,9 µL destilliertem Wasser (grauer Balken) als Ladekontrolle.

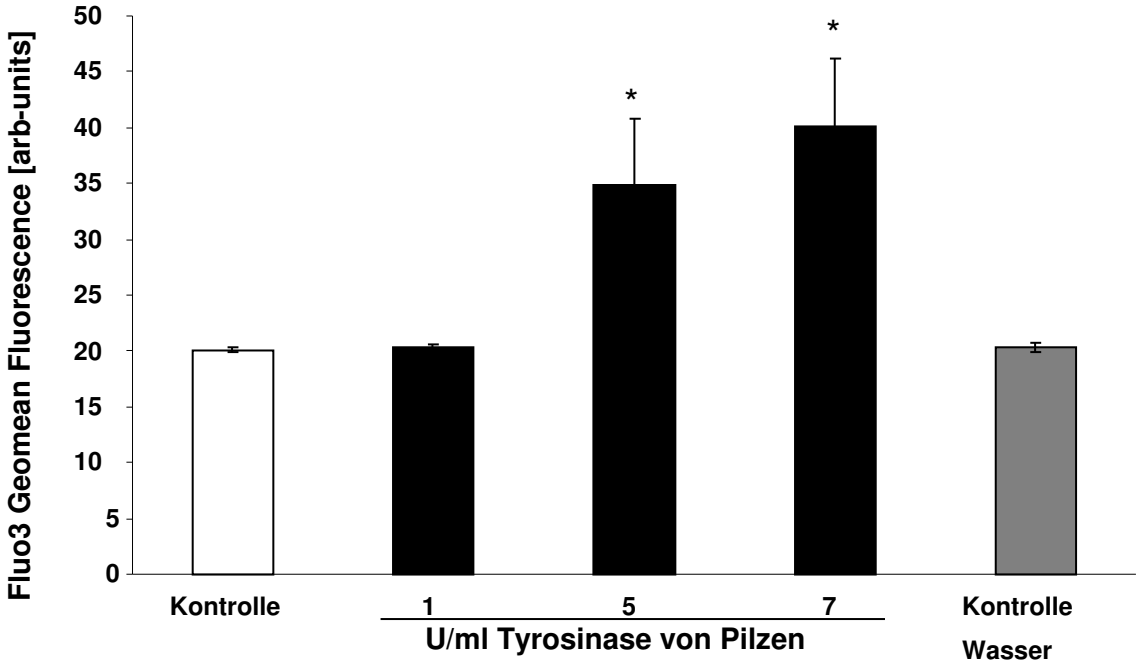

Abb. 27: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=4) der Fluo3- Fluoreszenz (arbitrary units) nach 24-stündiger Inkubation mit Ringerlösung (weißer Balken) mit 1,5 oder 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und 4,9 µL destilliertem Wasser als Ladungskontrolle (grauer Balken). * ($p < 0,05$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase (ANOVA).

Es konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der Fluo3-positiven RBC gemessen werden. Nach 24-stündiger Exposition von Tyrosinase kann man an den Erythrozyten also einen Kalziumeinstrom detektieren, der ebenfalls ein Merkmal der Eryptose darstellt.

3.2.4 Kalziumunabhängige Zellmembranschrumpfung: Annexin V

Eine weitere Versuchsanordnung wurde entworfen, um den Effekt von extrazytosolischer Präsenz von Kalzium auf die Posphatidylserin-Exposition der humanen Erythrozyten zu untersuchen. Dazu wurden Spendererythrozyten jeweils mit und ohne Tyrosinase (7 U/ml) in kalziumhaltigen (1 mM Kalzium) und kalziumfreien (1 mM EGTA Kalziumchelator) Milieu 24 Stunden inkubiert. Abb. 28 zeigt ein repräsentatives Histogramm der Annexin V-bindenden Zellen nach 24 h Inkubation der Spendererythrozyten mit (schwarze Linie) und ohne Tyrosinase (grauer Bereich) in Ringerlösung.

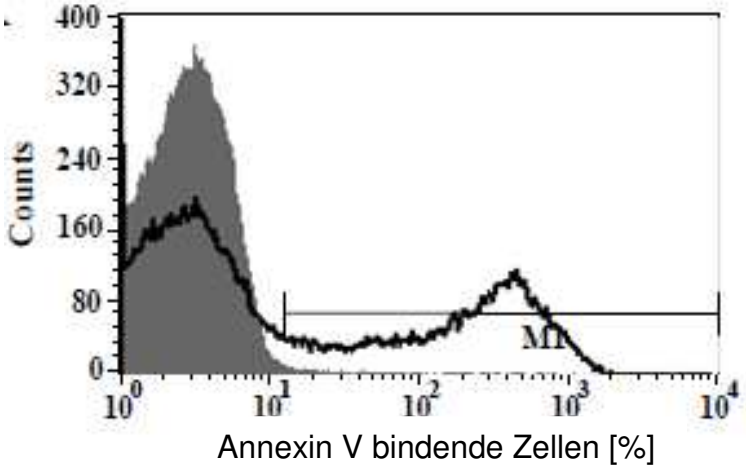

Abb. 28: Repräsentatives Histogramm der Annexin V-bindenden Zellen des Durchflusszytometers nach 24-stündiger Inkubation mit Ringerlösung (grauer Bereich) und Ringerlösung plus 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie).

Abb. 29 zeigt ein repräsentatives Histogramm der Annexin V-bindenden Zellen nach 24-stündiger Inkubation der Spendererythrozyten mit (schwarze Linie) und ohne Tyrosinase (grauer Bereich) in kalziumfreier und 1 mM EGTA –haltiger Lösung.

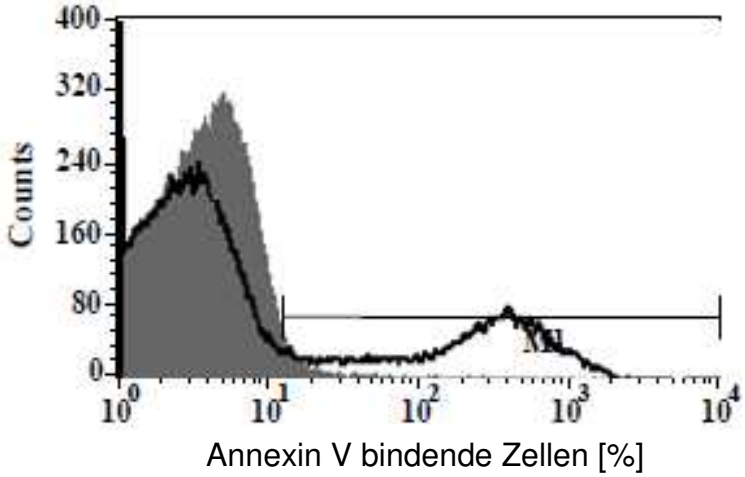

Abb. 29: Repräsentatives Histogramm der Annexin V-bindenden Zellen des Durchflusszytometers nach 24-stündiger Inkubation mit kalziumfreier Lösung (grauer Bereich) und kalziumfreier Lösung plus 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie). Anstatt 1mM Ca^{2+} enthält die Lösung 1mM EGTA.

In Abb. 30 werden die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Annexin V-bindenden Zellen nach 24-stündiger Exposition von kalziumhaltiger Ringerlösung mit und ohne 7U/ml Tyrosinase abgebildet (linke Balken). Die rechten Balken stellen die Mittelwerte mit Standardabweichungen

der Annexin V-bindenden Zellen nach 24-stündiger Exposition mit und ohne 7U/ml Tyrosinase im kalziumfreien, EGTA-haltigen Milieu dar.

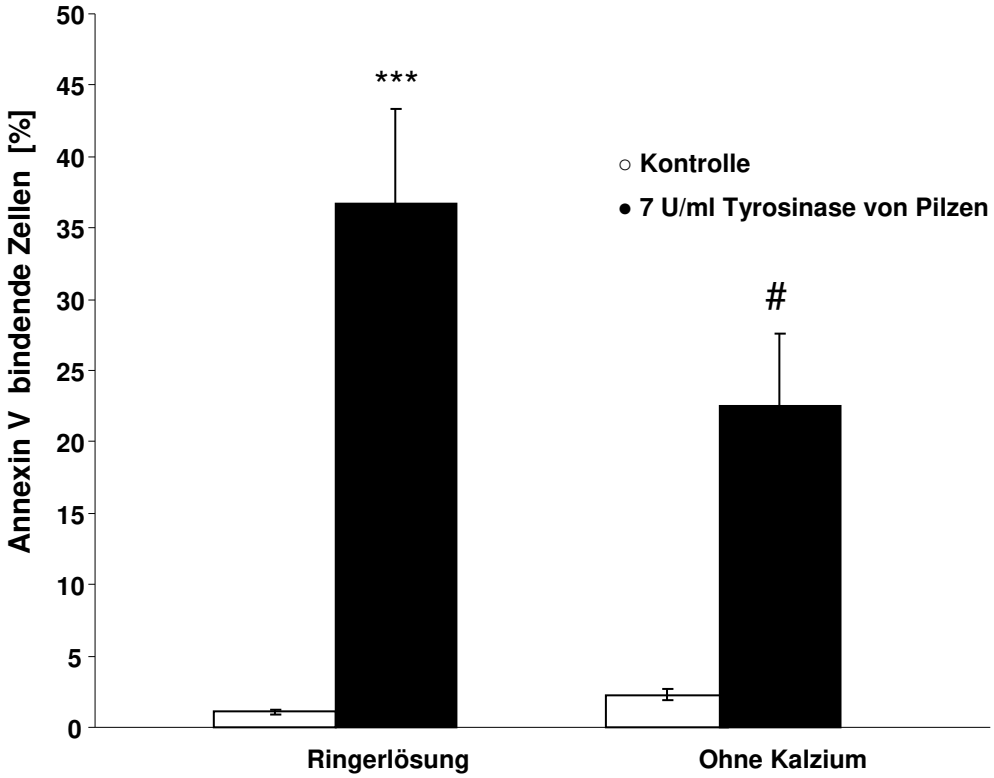

Abb. 30: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4) von Annexin V- bindenden humanen Erythrozyten nach 24 stündiger Inkubation in Ringerlösung mit 7U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und ohne Tyrosinase (weißer Balken) auf der linken Seite und nach 24 stündiger Inkubation in kalziumfreier Lösung mit 7U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und ohne Tyrosinase (weißer Balken) auf der rechten Seite. *** ($p<0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase, # ($p<0,05$) zeigt den signifikanten Unterschied zur kalziumfreien Lösung mit Tyrosinase.

Die Ergebnisse zeigen, dass das intrazelluläre, also das zytosolische Kalzium in den Erythrozyten sowohl in Ringerlösung als auch im kalziumfreien Milieu nach Tyrosinase-Exposition ansteigt. Zwar ist der Effekt im kalziumfreien Milieu geringer, dennoch kann daraus geschlossen werden, dass der Kalziumeinstrom nicht der einzige Signalweg der Eryptose sein kann und die PS-Exposition noch anderen Mechanismen unterworfen ist.

3.2.5 Ceramid-Bildung: Ceramid-abhängige Fluoreszenz

Nachdem es auch im kalziumfreien Milieu zu einer Phosphatidylserin-Exposition an den Erythrozyten kommt, die Tyrosinase ausgesetzt waren, liegt die Überlegung nahe, dass es noch andere Signalwege (außer dem

Kalziumeinstrom) der Eryptose geben muss, die eine PS-Exposition triggern und somit den erythrozytären Zelltod auslösen. Einer der Signalwege beinhaltet die Ceramid-Bildung in den Erythrozyten, einem Molekül, das im Zelltodprogramm vieler Körperzellen messbar ist, in etwa vergleichbar mit den Caspasen. Ceramid kann mithilfe des Durchflusszytometers und eines Anti-Ceramid-Antikörpers an der Erythrozytenmembran nachgewiesen werden.
In Abb. 31 ist ein repräsentatives Histogramm einer Ceramid-Sättigungs-Messung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie) zu sehen. Es zeigt den Anstieg der Ceramid-Sättigung bei Zellen, die in Tyrosinase inkubiert wurden.

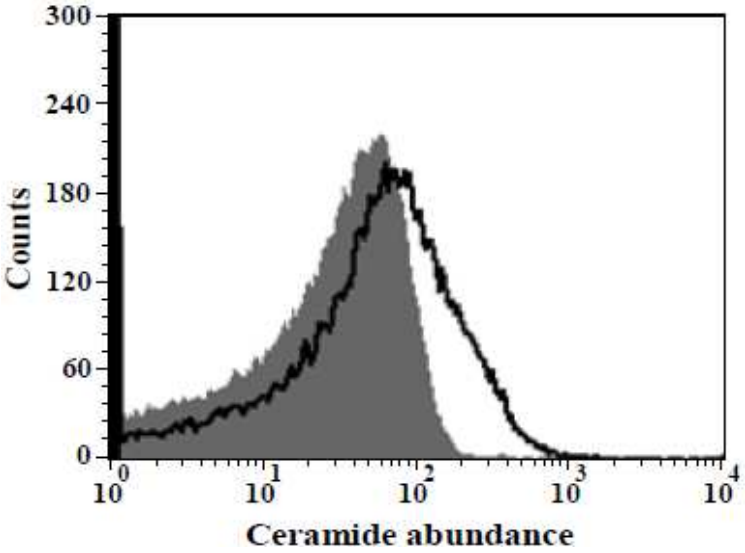

Abb. 31: Repräsentatives Histogramm einer Ceramid-Sättigungs-Messung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (grauer Bereich) und mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie).

In Abb. 32 sind die Ergebnisse der Messung als Balkendiagramm mit dem arithmetischen Mittelwert und der Standardabweichung zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anwesenheit von 7 U/ml Tyrosinase die Ceramid-Bildung statistisch signifikant erhöht.

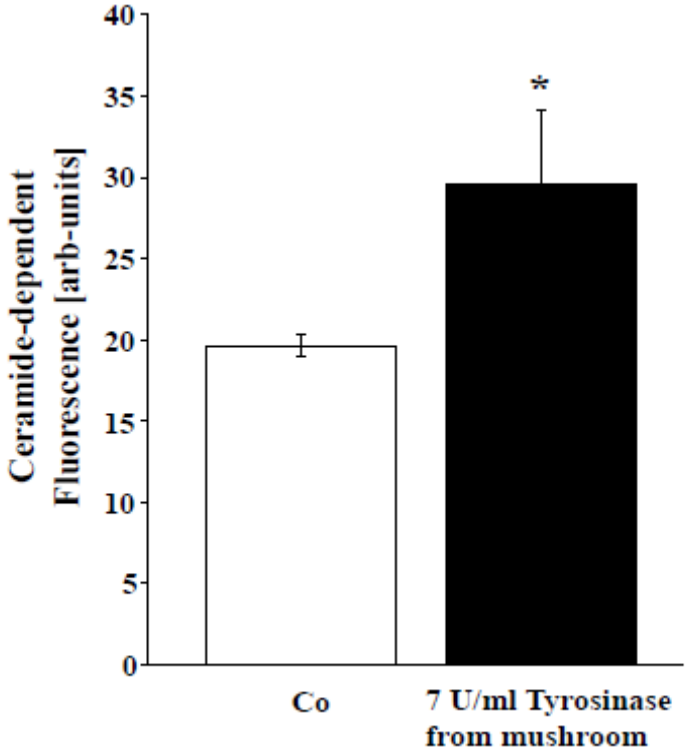

Abb. 32: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) der Ceramid-abhängigen Fluoreszenzmessung nach 24-stündiger Inkubation mit (schwarzer Balken) und ohne (weißer Balken) 7 U/ml Tyrosinase. *(p<0,01) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase an (*t*-Test).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass nach 24-stündiger Inkubation mit 7 U/ml Tyrosinase die Ceramid-Bildung an der Erythrozytenmembran deutlich und signifikant erhöht ist im Vergleich zu den Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung.
Ceramidbildung stellt also einen weiteren Mechanismus des erythrozytären programmierten Zelltodes dar, der bei Erythrozyten mit PS-Exposition auch ohne Kalziumeinstrom einhergeht.

3.2.6 Ionomycin-induzierte Eryptose: Forward Scatter

Das Kalziumionophor Ionomycin ist für die Erythrozyten ein Trigger zur Eryptose. Es wirkt über Kanäle, die aktiviert werden und Kalzium in die Zelle einströmen lassen. Dieser Einstrom wiederum setzt die Eryptose-Kaskade in Gang mit PS-Exposition und Zellmembran-Scrambling. In Abb. 33 sind die linken Balken die Kontrollgruppe, die 24 Stunden nach Inkubation in

Ringerlösung mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC) des Durchflusszytometers gemessen wurden. Rechts befinden sich die Balken, die nach 24-stündiger Inkubation mit 1µM Ionomycin und Ringerlösung gemessen wurden.

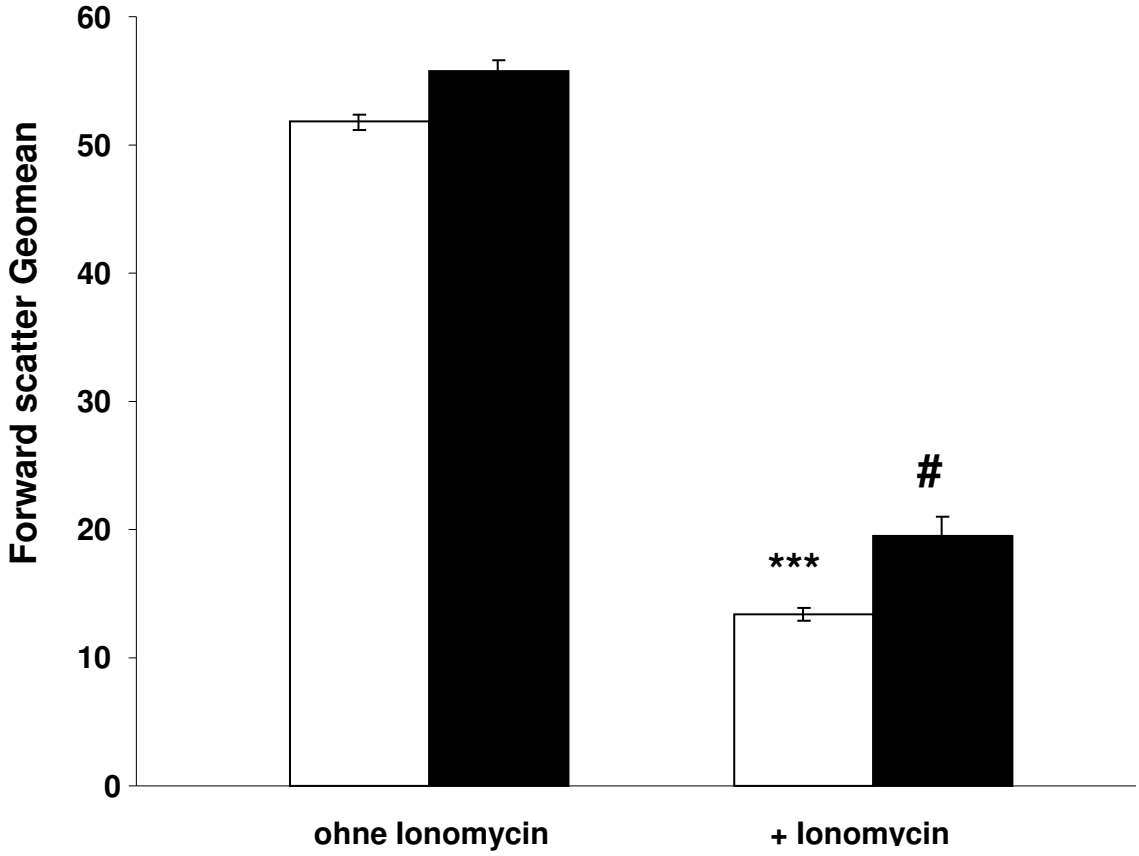

Abb. 33: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) nach 60-minütiger Inkubation in Ringerlösung (linke Balken) und Ringerlösung mit 1 µM Ionomycin (rechte Balken, jeweils mit (schwarze Balken) 7 U/ml Tyrosinase und ohne (weiße Balken). *** ($p<0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Ionomycin an, # ($p< 0,05$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase an.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Alle im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen ausgeführt. Der pH-Wert der Ringerlösung wurde mit dem pH-Meter bestimmt und gegebenenfalls auf 7,4 auftitriert. Mit dem Osmometer wurde die Osmolarität der Lösung bestimmt und lag bei 290 mOsmol/l. Das Gleiche wurde bei der glukosefreien und der calciumfreien Lösung gemacht. Auch bei der Lösung für den hyperosmotischen Schock wurde der pH auf 7,4 auftitriert, die Osmolarität betrug jedoch 800 mosmol/l. Das pH-Meter wurde regelmäßig mit einer Standardlösung geeicht. Alle Lösungen lagerten bei +4 °C, bis sie für Versuche benötigt wurden.

Alle Versuche wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt, die vor und nach der Benutzung gereinigt wurde. Alle Gefäße, die für die Versuche benutzt wurden, waren autoklaviert. Die Proben wurden bei 37°C im Inkubator aufbewahrt. Das FACS wurde vor Beginn der Versuche mit destilliertem Wasser gespült und danach mit Reinigungslösungen von Zellresten befreit. Eine leichte Verunreinigung der Proben durch die Sterilbank, der benutzten Gefäße oder des FACS ist trotz all dieser Maßnahmen immer möglich.

Erythrozytenkonzentrate wurden jeden Tag frisch von der Blutbank Tübingen abgeholt und bis Versuchsbeginn bei +4 °C gelagert.

Alle benutzten Chemikalien wurden luftdicht und lichtgeschützt gelagert, je nach Angabe des Herstellers bei +4 bis -20 °C.

Da das FACS Calibur als Messgerät kleinste Bestandteile einer Zellsuspension messen soll, ist es wichtig, das Gerät möglichst frei von störenden Faktoren zu lagern. Es steht auf einem schwingungsarmen Tisch und in einem abgedunkelten Raum, um Vibrationen und Streulicht zu vermeiden, die die Messungen stören könnten. Messfehler können so minimiert werden.

Die Funktion „Gating“ am FACS Calibur ist eine Methode, um nur eine bestimmte, ausgewählte Population zu messen und die Messung einzelner Zellteile und toter Zellen zu unterdrücken. Wichtig ist hierbei, diese Einstellung

über die gesamte Versuchsdauer beizubehalten, um immer gleich bleibende Ergebnisse zu erhalten.

4.2 Dehydratation

Bei Klotho-defizienten Mäusen können verschiedene mit der Defizienz vergesellschaftete Mechanismen beobachtet werden. Klotho hat Einfluss auf die Lebensspanne der Tiere [170, 178] und hat insbesondere einen negativen Effekt auf die Bildung von Calcitriol, der aktiven Form des Vitamin D [163]. Bei Klotho-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Eryptose-Rate identifiziert werden [169]. Dieser Effekt auf Erythrozyten konnte durch eine Vitamin-D-reiche Diät abgeschwächt werden [169]. Da Klotho-defiziente Mäuse unter anderem an Dehydratation leiden [178, 201] sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der alleinige Trigger von Dehydratation ausreichend ist, um die Eryptoserate von dehydrierten Mäusen zu erhöhen [201]. Diese Versuche wurden *in vivo* an Mäusen durchgeführt um ein annähernd genaues Modell zum menschlichen Organismus zu generieren. Als Erweiterung dieses Versuches könnte man in Zukunft die Erythrozyten dehydrierter Patienten (Exikose) direkt untersuchen, um vom Tiermodell zur klinischen Studie zu gelangen. Als Vorteil hat der Tierversuch jedoch die absolut gleichen Bedingungen unter denen die Mäuse dehydriert wurden (36 Stunden Wasserentzug) und die dadurch resultierenden gut verwertbaren und vergleichbaren Ergebnissen.

Die Dehydratation wurde bei den 36 Stunden wasserdepletierten Mäusen mithilfe verschiedener Parameter im Vergleich zu den Kontrollmäusen gemessen. Hierbei handelte es sich unter anderem um ADH, Aldosteron, die Serumosmolarität und Kalzium [201]. So konnte mittels der Serummarker objektiviert werden, dass die Mäuse unter 36 Stunden Wasserentzug tatsächlich eine manifeste Dehydratation erlitten und die Pathophysiologie der Erythrozyten dieser Mäuse mit der der Kontrollmäuse verglichen werden kann. ADH, Aldosteron und die Serumosmolarität steigen im dehydrierten Zustand der Mäuse stark an, unter anderem ein Regulationsmechanismus der Niere und der Hypophyse, um den Wasserverlust über den Harn einzudämmen. Es können also die Kontrollmäuse mit den Versuchsmäusen verglichen werden, da es

einen signifikanten Unterschied zwischen den dehydrierten und den hydrierten Mäusen hinsichtlich der ausgewählten Parameter der Dehydratation gibt.
Eryptose ist ein physiologischer Vorgang, der bislang nur lückenhaft verstanden ist, bei dem es jedoch, ähnlich wie bei der Apoptose kernhaltiger Zellen, zu verschiedenen physiologischer Vorgang kommt, die zu dem kontrollierten selbstmordartigen Tod eines Erythrozyten führen [5]. Als wichtigstes Merkmal der Eryptose gilt die Phosphatidylserin-Exposition an der Außenseite der Membran [16]. Phosphatidylserin, ein Molekül, das bei lebenden Zellen an der Innenseite der Membran lokalisiert ist, wird beim Prozess der Eryptose nach außen verlagert und kann durch enzymatische Aktivität nicht mehr reponiert werden [127]. Dieses Geschehen kann mittels des Fluoreszenzmarker Annexin V und Messung durch Durchflusszytometrie messbar gemacht werden [197].
Im spontan nach der Abnahme gemessenen Blut gibt es kaum einen Unterschied in der Phosphatidylserin-Exposition der Erythrozyten hydrierter und dehydrierter Tiere. Allerdings soll hier bemerkt werden, dass Phosphatidylserin-exponierende Zellen sehr schnell aus dem zirkulierenden Blut entfernt werden und somit keine Aussage über die wahre Eryptoserate getroffen werden kann [143]. Nach Inkubationszeiten in vitro von 24 h beziehungsweise 48 h kann jedoch ein signifikanter Anstieg der PS-Exposition der Erythrozyten der dehydrierten Mäuse im Vergleich zu den hydrierten Tieren gemessen werden. Dies spricht für eine deutlich erhöhte Eryptose bei den dehydrierten Tieren, da die PS-Exposition als signifikantes Merkmal der erythrozytären Apoptose angesehen wird. Denkbar wäre, dass es im murinen Organismus zu einem Erkennen und zum Abbau der Phosphatidylserin-markierten Erythrozyten durch das retikulo-endotheliale System kommt. Dies würde erklären, warum in dem spontan nach der Blutentnahme gemessenen Blut keine signifikante Differenz zwischen dem Anteil der PS-exponierenden Zellen der Kontrollgruppe und der Gruppe der dehydrierten Mäuse messbar gemacht werden konnte. Lagert man diese Erythrozyten dann außerhalb des murinen Organismus, steigt bei den dehydrierten Mäusen der PS-exponierende Teil der Erythrozyten signifikant stärker an als bei der Kontrollgruppe, da es kein PS-erkennendes System gibt, durch das die Erythrozyten eliminiert werden könnten.

Da das frisch entnommene Mausblut für alle Versuche vom Plasma getrennt wurde, also nur Erythrozytenkonzentrate verwendet wurden, kann der Effekt von Plasmakomponenten, wie zum Beispiel Hormone und Plasmaosmolarität vernachlässigt werden. Die Erythrozyten hydrierter und dehydrierter Mäuse wurden außerdem in der gleichen Ringerlösung behandelt.

Erythrozyten bereits auf unterschiedlichste Art und Weise geschädigter Organismen können besonders sensibel auf verschiedene Trigger der Eryptose reagieren. Als Schädigung konnten bisher zahlreiche Xenobiotika identifiziert werden [20, 155] aber auch viele Erkrankungen zum Beispiel Sichelzellanämie [7], Eisenmangelanämie [8] Hyperthermie [111] und Sepsis [151].

Einer der stärksten Trigger der Eryptose ist der Kalziumionophor Ionomycin, indem es die Phosphatidylserin- Asymmetrie der Erythrozytenmembran zerstört [117]. Um dies zu untersuchen wurden im Versuch die Erythrozyten *ex vivo* Ionomycin ausgesetzt, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den Erythrozyten dehydrierter Mäuse und hydrierter Mäuse erkennbar wurde. Die Erythrozyten dehydrierter Mäuse reagieren auf die Exposition von Ionomycin mit einer signifikant höheren Zahl an Annexin V-exponierenden Zellen als die Erythrozyten hydrierter Mäuse. Dies zeigt, dass die Erythrozyten dehydrierter Mäuse sensibler auf zellulären Stress reagieren und eryptotisch unter Phosphatidylserin-Exposition zu Grunde gehen.

Durch Mangel an Energielieferanten leidet jede Zelle früher oder später. Da Erythrozyten nur über begrenzte Stoffwechselwege verfügen und nur Glukose als Energielieferant nutzen können, kann auch ein glukosefreies Milieu zum Zelltod führen [3]. Dieser Mechanismus wurde in den vorangegangenen Versuchen genutzt und dient als Stressor, um den erythrozytären programmierten Zelltod hervorzurufen. Die Versuche zeigen, dass nach einer Inkubation in glukosefreiem Milieu die Zellen vermehrt zu Grunde gehen (Abb. 14). Auch hier wird dies mit dem Marker Phosphatidylserin an der Zellmembranaußenseite bestimmt. Die Erythrozyten dehydrierter Mäuse wiesen eine signifikant höhere Rate an PS-exponierenden Zellen auf als die Erythrozyten hydrierter Mäuse. Dies belegt, dass die Erythrozyten hydrierter

Mäuse eine höhere Resistenz gegenüber dem Stressor der Eryptose, dem Glukosemangel, haben als Erythrozyten dehydrierter Mäuse.

Erythrozyten müssen einige wichtige Eigenschaften besitzen, um ihrer Aufgabe des Sauerstofftransports gerecht zu werden. Dazu zählt unter anderem die osmotische Resistenz. Die roten Blutzellen müssen mehrmals stündlich das Nierenmark passieren, in dem eine Osmolarität von bis zu 1200 mOsmol herrscht [110]. Dass die Erythrozyten dehydrierter Mäuse diese Resistenz nicht mehr in dem physiologischen Maße besitzen zeigt der vorhergehende Versuch. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Erythrozyten hydrierter Mäuse hohe Osmolaritäten (800 mOsmol) besser ertragen als die Erythrozyten dehydrierter Tiere (Abb. 20). Dies wurde ebenfalls mittels der Phosphatidylserin-Exposition an der Außenseite der Membran im Durchflusszytometer bestimmt. Folglich verlieren die Erythrozyten dehydrierter Mäuse also partiell ihre osmotische Resistenz, was sie unter anderem im hyperosmolaren Nierenmark weniger widerstandsfähig macht und sie somit womöglich zu einem eryptotischen oder auch hämolytischen Untergang zwingt.

Erythrozyten sind tagtäglich oxidativem Stress ausgesetzt. Aufgrund ihrer Aufgabe des Sauerstofftransports gilt es, das Überleben des Erythrozyten mittels reduktiver Äquivalente zu sichern [3]. Dass oxidativer Stress zum vorzeitigen Ableben und zur Eryptose der Erythrozyten führt, konnte bereits mehrfach gezeigt werden [6, 144]. Auch bei den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Erythrozyten dehydrierter Mäuse deutlich stärker mit Phosphatidylserin-Exposition an der Membranaußenseite auf den Trigger t-BOOH (starkes Oxidans) reagieren als die Erythrozyten hydrierter Tiere. Im Vergleich zu Erythrozyten, die in physiologischem Milieu inkubiert waren zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Erythrozyten dehydrierter Tiere deutlich stärker mit dem programmierten Zelltod auf oxidativen Stress reagieren als die Erythrozyten hydrierter Tiere.

Die Sensibilisierung der Erythrozyten dehydrierter Mäuse auf Stimuli der Eryptose kann bei verschiedenen Krankheitsbildern eine klinische Bedeutung gewinnen, bei denen ebenfalls eine erhöhte Eryptoserate als Mitverursacher

einer hämolytischen Anämie identifiziert werden konnte. Diese Patienten sollten als Schlussfolgerung der hier durchgeführten Versuche unbedingt vor Dehydrierung geschont werden und es sollte, wenn nötig und unter den gegebenen Bedingungen möglich, ausreichend Wasser substituiert werden, um einem Zustand der Dehydratation vorzubeugen und so eventuell durch Eryptose zusätzlich hervorgerufene Erythrozytenverluste zu minimieren. Wie schon beschrieben haben zahlreiche Xenobiotika und auch zahlreiche systemische Erkrankungen Einfluss auf den erythrozytären programmierten Zelltod [20, 143], sodass hier die Dehydratation nur als einer von vielen Triggern dargestellt werden soll. Gerade im klinischen Setting und bei Patienten, die unter Umständen viele Pharmaka benötigen, kann die Ursache einer Anämie sehr vielfältig sein, sodass man den Vorgang der Eryptose unbedingt mit berücksichtigen sollte und im Rahmen der Symptome und Komedikation des Patienten betrachten sollte. Schlussfolgernd aus den Ergebnissen dieser Arbeit soll betont werden, dass durch Dehydratation bereits vorgeschädigte Erythrozyten sensibler auf verschiedene bekannte Trigger der Eryptose reagieren. Da diese Trigger (wie zum Beispiel Hyperosmolarität oder Energiedepletion) gerade auch im klinischen Setting eine Rolle spielen und viele Xenobiotika in vorangegangenen Publikationen als Triggerfaktoren der Eryptose ausgemacht werden konnten, beweist einmal mehr die klinische Relevanz des hier zugrunde liegenden Mechanismus, der Eryptose durch Dehydratation.

Dehydratation hat einen leichten Effekt auf die Erythrozyten der Mäuse, der grundlegend dadurch charakterisiert ist, daß Phosphatidylserin-Exposition an der Membranaußenseite erfolgt. Möglicherweise spielt dabei auch ein enormer Einstrom von Kalzium in die Zelle eine Rolle. Dieser Effekt wird durch verschiedene äußere Einflüsse wie oxidativen Stress, Energiedepletion und hyperosmotischen Schock stimuliert.

4.3 Tyrosinase

Eines der wichtigsten Kennzeichen der Eryptose ist die Phosphatidylserin-Exposition am äußeren Membranblatt der Erythrozyten [16]. Dieses und andere Kennzeichen wurden im vorangegangenen Ergebnisteil nach einer Exposition der Spendererythrozyten mit Tyrosinase von Pilzen untersucht (Kapitel 3.2). Tyrosinase gilt als endogenes Enzym, das in der Haut des Menschen einige Reaktionen der Melanin-Produktion katalysiert [183].

Dieser Versuchsteil wurde im Gegensatz zu dem Versuchsteil zur Dehydratation zunächst an humanen Erythrozyten *in vitro* getestet um eine grundsätzliche Vorstellung zu der Wirkung und dem Ausmaß der Zellschädigung von Tyrosinase an menschlichen Zellen zu erlangen, insbesondere hinsichtlich der möglichen Verwendung als Pharmakon. Weiterführende Versuche wären im Rahmen von Tierstudien denkbar, allerdings muss aufgrund der Ergebnisse dieser Studie mit dem Auftreten von Eryptose in nicht unbeträchtlichem Maße gerechnet werden.

Die Inkubation der Erythrozyten über 24 Stunden in 5 und 7 U/mL Tyrosinase und Ringerlösung zeigt einen sehr deutlichen, statistisch signifikanten Anstieg der Phosphatidylserin-Exposition, einem der wichtigsten Zeichen der Eryptose (Abb. 23).

Die Phosphatidylserin-Exposition ist Folge von verschiedenen intrazellulären Mechanismen wie zum Beispiel einer erhöhten Funktion der Scramblase [132] und einer gehemmten Funktion der Translokase [65, 127], beides Enzyme der Biomembran humaner Zellen, die unter anderem durch intrazelluläre Kalziumkonzentrationen reguliert werden. Kalzium stimuliert die Scramblase, die wiederum PS auf die Außenseite exponiert [132], und inhibiert die Translokase, die PS wieder nach innen zurückverlagert [65, 135]. Da das Zellmembran-Scrambling auch im Erythrozyten kalziumabhängig funktioniert, wurde in weiteren Versuchen das intrazelluläre Kalzium gemessen. Neben dem Anstieg der PS-Exposition der Erythrozyten zeigt sich auch ein statistisch signifikanter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der mithilfe von Fluo3-AM/ Fluo3 gemessen wurde. Dies beweist, dass Tyrosinase einen

Kalziumeinstrom in die Erythrozyten ermöglicht und somit die PS-Exposition und das Zellmembran-Scrambling triggert.
Es wurden noch weitere Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob das eryptotische Geschehen auch kalziumunabhängig ablaufen kann. Die Spendererythorozyten wurden also sowohl in kalziumhaltiger als auch in kalziumfreier und mit und ohne Tyrosinase inkubiert. Die Ergebnisse zeigen zwar eine signifikante Abnahme der Phosphatidylserin-Exposition nach kalziumfreier Inkubation, es bleibt jedoch ein signifikanter Rest eryptotischer Zellen im Vergleich zu den Zellen, die ohne Tyrosinase inkubiert waren (Abb. 30). Dies bedeutet, dass es noch einen weiteren Mechanismus geben muss, bei dem Erythroyten PS an der Membran exponieren und zugrundegehen, der kalziumunabhängig verläuft. Dieser Vorgang lässt sich mindestens zum Teil mit der Ceramid-Bildung [112] erklären, einem Spaltprodukt der Sphingomyelinase aus Phospholipiden der inneren Zellmembran [138]. Dieser Mechanismus konnte bewiesen werden, indem Erythrozyten oxidativem Stress, der unselektiv alle Kationenkanäle öffnet, und Amilorid, der alle Kanäle inhibiert, ausgesetzt wurden [117]. Trotzdem konnte eine PS-Exposition gemessen werden.
Dieser Mechanismus sollte weiter untersucht werden: Auch bei einer Exposition der Erythrozyten mit Tyrosinase konnte ein Anstieg der Ceramid-Bildung beobachtet werden, der statistisch signifikant höher war als nach Inkubation in Ringerlösung.
Ein weiteres Kennzeichen der Eryptose ist die Zellschrumpfung [20]. Dieser Parameter wird mithilfe des Forward Scatter gemessen und gibt Aufschluss über die Zellgröße. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 7 U/ml Tyrosinase kam es aus noch ungeklärten Mechanismen eher zu einer Erhöhung des Zellvolumens, die allerdings statistisch nicht signifikant war.
Dies ist nicht mit der gängigen Lehrmeinung zur Eryptose erklärbar, als mögliche Erklärung wäre zum Beispiel andere, nicht beschriebene Wirkungen auf Ionenkanäle an der Erythrozytenmembran durch Tyrosinase, die einen Ioneneinstrom in die Zelle unter osmotischer Mitnahme von Wasser induzieren. Diesen Mechanismus gilt es jedoch weiter zu erforschen um die physiologische Grundlage des Anstiegs des Zellvolumens zu objektivieren. Um

herauszufinden, ob Tyrosinase den eryptotischen Effekt von Ionomycin inhibieren kann wurden weitere Versuche durchgeführt, die aber zeigten, dass Tyrosinase den Effekt von Ionomycin als stark apoptotisch [106, 118] wirkendes Kalzium-Ionophor nicht inhibieren kann, sondern eher einen additiv toxischen Effekt hat. Die PS-Exposition nach Tyrosinase und Ionomycin-Exposition ist signifikant größer als die PS-Exposition nach Inkubation nur mit Ionomycin (Abb.33).

Die durchgeführte Studie belegt, dass Tyrosinase das Zellmembran Scrambling aktiviert und somit eine Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Membran der Erythrozyten bewirkt. Ab einer Konzentration von 5 U/mL Tyrosinase kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium- und Ceramid-Konzentration. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führt normalerweise zu einer Aktivierung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle [20], die wiederum zu K^+-Ausstrom, Hyperpolarisation der Zellmembran, Cl^- Ausstrom und so zu KCl-Verlust führt und mit osmotisch reguliertem Wasserverlust einhergeht [20]. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tyrosinase die kalziumabhängigen Kaliumkanäle blockiert, die Chloridkanäle inhibiert oder über einen anderen, noch unbekannten Mechanismus die Zunahme des Zellvolumens reguliert. Bei der Exposition des Kalziumionophors Ionomycins ließ sich jedoch kein schützender Effekt der Tyrosinase durch die Inhibition oben genannter Kanäle erkennen. Zwar handelt es sich nur um einen leichten und nicht signifikanten Anstieg des Zellvolumens, wenn aber die Zellschwellung zunimmt und die Zellen dadurch platzen, kann es zu Hämoglobin-Ablagerungen nach massiver Hämolyse in den Nierentubuli kommen, da Hämoglobin durch die Glomerula filtriert wird [108].

Eryptotische Zellen können durch phagozytotische Zellen erkannt und entfernt werden [20]. So können betroffene Zellen schnell aus dem zirkulierenden Blut entfernt werden. Eine erhöhte Eryptoserate durch verschiedene Xenobiotika kann mit einer erhöhten Anämie einhergehen, der das eryptotische Zugrundegehen und das Entfernen der roten Blutzellen zugrunde liegt [20]. Phosphatidylserin-Exposition ist allerdings nicht nur ein Signal für Phagozyten, markierte Zellen zu eliminieren [109], sondern auch ein Ligand des

endothelialen CXCL16/SR-PSO-Rezeptor [202]. Das Binden von suizidalen Erythrozyten an der Endothelwand führt zu Störungen der Mikrozirkulation und die Exposition von Phosphatidylserin führt zu einer erhöhten Rate an Blutgerinnung und kann thrombotische Geschehen hervorrufen [26, 203].

5 Zusammenfassung

Die Eryptose stellt einen Mechanismus der kernlosen Erythrozyten dar, der analog zur Apoptose der kernhaltigen Körperzellen betrachtet werden kann. Da es den Erythrozyten aufgrund ihrer histologischen und physiologischen Eigenschaften an Zellorganellen wie Mitochondrien und Zellkern mangelt, diese aber für den regulären Prozess der Apoptose in kernhaltigen Zellen benötigt werden, entdeckte man erst vor kurzem die Fähigkeit der Erythrozyten zum programmierten Zelltod, der sogenannten Eryptose.

Wie bei den kernhaltigen Zellen stellt die Phosphatidylserin-Exposition an der Zellmembranaußenseite eines der wichtigsten morphologischen Merkmale dar. Außerdem kommt es bei den Erythrozyten zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle und nachfolgendem Kaliumausstrom mit Hyperpolarisation und Chloridausstrom aus der Zelle. Osmotisch folgt diesem Gradienten Wasser, welches zu einer Schrumpfung der Zelle führt. Das zytosolische Kalzium und die Ceramid-Bildung stimulieren des Weiteren die Verlagerung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran.

Bisher konnten viele Xenobiotika als auch verschiedene Krankheitsbilder wie Nierenversagen, Malariainfektionen oder Eisenmangelanämie identifiziert werden, die eine erhöhte Eryptoserate *in vitro* bzw. *in vivo* aufweisen.

In dieser Arbeit wurde zum einen die Sensibilisierung von murinen Erythrozyten nach vorhergehender Dehydratation der Mäuse untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Phosphatidylserin-Exposition an der Zellmembranaußenseite bei den dehydrierten Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Phosphatidylserin-Exposition ließ sich auch vermehrt nach massivem Kalziumeinstrom durch Ionomycin, Hyperosmolarität, Energiedepletion und oxidativem Stress beobachten. Dehydratation kann also unter bestimmten Umständen mit erhöhtem programmierten Zelltod der Erythrozyten einhergehen.

Tyrosinase, ein endogenes Enzym, das unter anderem als Therapie (zusätzlich zu anderen Substanzen) von Malignomen vorgeschlagen wurde, zeigte in unseren Versuchen einen stark eryptotischen Effekt. In verschiedenen

Dosierungen triggert Tyrosinase den Kalziumeinstrom in die Erythrozyten, was zu einer nachfolgenden Phosphatidylserin-Exposition an der Zellmembranaußenseite, dem Scrambling, führt. Auch die Ceramid-Menge an der Zellmembranoberfläche konnte bei Tyrosinase-Exposition erhöht gemessen werden. Tyrosinase kann als weitere Substanz mit potenziell eryptotischer Wirkung auf die Blutzellen angesehen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Cohen, J.J., *Apoptosis.* Immunol Today, 1993. **14**(3): p. 126-30.
2. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
3. Bossi, D. and B. Giardina, *Red cell physiology.* Mol Aspects Med, 1996. **17**(2): p. 117-28.
4. Werre, J.M., et al., *The red cell revisited--matters of life and death.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50**(2): p. 139-45.
5. Bratosin, D., et al., *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria.* Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1143-56.
6. Lang, K.S., et al., *Mechanisms of suicidal erythrocyte death.* Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(5): p. 195-202.
7. Lang, F. and S.M. Qadri, *Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes.* Blood Purif, 2012. **33**(1-3): p. 125-30.
8. Kempe, D.S., et al., *Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes.* Faseb j, 2006. **20**(2): p. 368-70.
9. Alzoubi, K., et al., *Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Sulforaphane.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014.
10. Jacobi, J., et al., *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mitotane.* Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(5): p. 1516-26.
11. Nishioka, K., *Particulate tyrosinase of human malignant melanoma. Solubilization, purification following trypsin treatment, and characterization.* Eur J Biochem, 1978. **85**(1): p. 137-46.
12. Frauenfeld, L., et al., *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mushroom tyrosinase.* Toxins (Basel), 2014. **6**(3): p. 1096-108.
13. Lang, E., et al., *Inhibition of suicidal erythrocyte death by blebbistatin.* Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(2): p. C490-8.
14. Myssina, S., et al., *Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2750-7.
15. Shaik, N., A. Lupescu, and F. Lang, *Inhibition of suicidal erythrocyte death by probucol.* J Cardiovasc Pharmacol, 2013. **61**(2): p. 120-6.
16. Lang, F., E. Lang, and M. Foller, *Physiology and pathophysiology of eryptosis.* Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 308-14.
17. Schmidt/Lang, *Physiologie des Menschen*. 2013: Schmidt/Lang.
18. Daugas, E., C. Cande, and G. Kroemer, *Erythrocytes: death of a mummy.* Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1131-3.
19. Bosman, G.J., F.L. Willekens, and J.M. Werre, *Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?* Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(1-3): p. 1-8.
20. Lang, E., S.M. Qadri, and F. Lang, *Killing me softly - suicidal erythrocyte death.* Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1236-43.

21. Barvitenko, N.N., N.C. Adragna, and R.E. Weber, *Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance.* Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(1-4): p. 1-18.
22. Pauling, L. and C.D. Coryell, *The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1936. **22**(4): p. 210-6.
23. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.* J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
24. Arroyo, A., et al., *NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance.* J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49965-75.
25. Fadok, V.A., et al., *Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells.* J Immunol, 1992. **149**(12): p. 4029-35.
26. Zwaal, R.F., P. Comfurius, and E.M. Bevers, *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(9): p. 971-88.
27. Lutz, H.U., *Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50**(2): p. 107-16.
28. Bosman, G.J., et al., *Storage-related changes in erythrocyte band 3: not a case for the Diego blood group antigens.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(2): p. 195-200.
29. Lang, P.A., et al., *Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel.* Cell Physiol Biochem, 2006. **18**(1-3): p. 151-64.
30. Dunn, C.D. and L.N. Smith, *The effect of dehydration on erythroid progenitor cells in mice.* Exp Hematol, 1980. **8**(5): p. 620-5.
31. Glucksmann, A., *Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.* Biol Rev Camb Philos Soc, 1951. **26**(1): p. 59-86.
32. Vogt, C., *Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete. (Alytes obstetricians)*, in *Jent und Gassman*. 1842: Solothurn. p. 130.
33. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
34. Bellairs, R., *Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy.* J Anat, 1961. **95**(Pt 1): p. 54-60.3.
35. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.* Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
36. Sulston, J.E., *Post-embryonic development in the ventral cord of Caenorhabditis elegans.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1976. **275**(938): p. 287-97.
37. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans.* Cell, 1986. **44**(6): p. 817-29.

38. Hedgecock, E.M., J.E. Sulston, and J.N. Thomson, *Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans.* Science, 1983. **220**(4603): p. 1277-9.
39. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature.* Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
40. Samali, A., et al., *Apoptosis: cell death defined by caspase activation.* Cell Death Differ, 1999. **6**(6): p. 495-6.
41. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases.* Trends Biochem Sci, 1997. **22**(8): p. 299-306.
42. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis.* Biochem J, 1997. **326 (Pt 1)**: p. 1-16.
43. Reed, J.C., *Dysregulation of apoptosis in cancer.* J Clin Oncol, 1999. **17**(9): p. 2941-53.
44. Fadeel, B. and S. Orrenius, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.* J Intern Med, 2005. **258**(6): p. 479-517.
45. Saunders, J.W., Jr., *Death in embryonic systems.* Science, 1966. **154**(3749): p. 604-12.
46. Nossal, G.J., *Negative selection of lymphocytes.* Cell, 1994. **76**(2): p. 229-39.
47. Goodnow, C.C., *Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2264-71.
48. Lowe, S.W. and A.W. Lin, *Apoptosis in cancer.* Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 485-95.
49. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
50. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy.* Cell, 2002. **108**(2): p. 153-64.
51. Herr, I. and K.M. Debatin, *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy.* Blood, 2001. **98**(9): p. 2603-14.
52. Xin, M., et al., *Small-molecule Bax agonists for cancer therapy.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 4935.
53. Castedo, M., et al., *Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 19-28.
54. Gougeon, M.L., *Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 392-404.
55. Roshal, M., Y. Zhu, and V. Planelles, *Apoptosis in AIDS.* Apoptosis, 2001. **6**(1-2): p. 103-16.
56. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
57. Dawson, T.M. and V.L. Dawson, *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease.* Science, 2003. **302**(5646): p. 819-22.
58. Tatton, W.G., et al., *Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation.* Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S61-70; discussion S70-2.

59. Eckert, A., et al., *Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1627-34.
60. Yuan, J. and B.A. Yankner, *Apoptosis in the nervous system.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 802-9.
61. Thorburn, A., J. Thorburn, and A.E. Frankel, *Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins.* Apoptosis, 2004. **9**(1): p. 19-25.
62. Reed, J.C., *Apoptosis-based therapies.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(2): p. 111-21.
63. Savill, J., et al., *Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.* Nature, 1990. **343**(6254): p. 170-3.
64. Cohen, J.J., et al., *Apoptosis and programmed cell death in immunity.* Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 267-93.
65. McIntyre, J.A., *Antiphospholipid antibodies in implantation failures.* Am J Reprod Immunol, 2003. **49**(4): p. 221-9.
66. Golstein, P., D.M. Ojcius, and J.D. Young, *Cell death mechanisms and the immune system.* Immunol Rev, 1991. **121**: p. 29-65.
67. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.* Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-42.
68. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
69. Denault, J.B. and G.S. Salvesen, *Caspases.* Curr Protoc Protein Sci, 2002. **Chapter 21**: p. Unit 21.8.
70. Zhivotovsky, B., et al., *Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis.* Cell Death Differ, 1999. **6**(7): p. 644-51.
71. Gerner, C., et al., *Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation.* Cell Death Differ, 2002. **9**(6): p. 671-81.
72. Kaufmann, S.H. and W.C. Earnshaw, *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 42-9.
73. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Apoptosis control by death and decoy receptors.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 255-60.
74. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
75. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points.* Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
76. Gupta, S., et al., *A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis.* Immun Ageing, 2006. **3**: p. 5.
77. Gross, A., et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death.* J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1156-63.
78. Schulze-Osthoff, K., et al., *Apoptosis signaling by death receptors.* Eur J Biochem, 1998. **254**(3): p. 439-59.
79. Adams, J.M., *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis.* Genes Dev, 2003. **17**(20): p. 2481-95.

80. Susin, S.A., N. Zamzami, and G. Kroemer, *Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 151-65.
81. Lassus, P., X. Opitz-Araya, and Y. Lazebnik, *Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization.* Science, 2002. **297**(5585): p. 1352-4.
82. Gulbins, E., et al., *Physiology of apoptosis.* Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(4): p. F605-15.
83. Kroemer, G., *The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways.* Cell Death Differ, 1998. **5**(6): p. 547.
84. van Gurp, M., et al., *Mitochondrial intermembrane proteins in cell death.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 487-97.
85. Orrenius, S., *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death.* Toxicol Lett, 2004. **149**(1-3): p. 19-23.
86. Halestrap, A.P., G.P. McStay, and S.J. Clarke, *The permeability transition pore complex: another view.* Biochimie, 2002. **84**(2-3): p. 153-66.
87. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death.* Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 835-40.
88. Lorenzo, H.K., et al., *Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death.* Cell Death Differ, 1999. **6**(6): p. 516-24.
89. Miramar, M.D., et al., *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16391-8.
90. Susin, S.A., et al., *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process.* J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 381-94.
91. Hill, M.M., C. Adrain, and S.J. Martin, *Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows.* Mol Interv, 2003. **3**(1): p. 19-26.
92. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.* Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
93. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.* Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-6.
94. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 395-419.
95. Lee, J.M. and A. Bernstein, *Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene.* Cancer Metastasis Rev, 1995. **14**(2): p. 149-61.
96. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis.* Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
97. Duckett, C.S., et al., *Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 608-15.
98. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.* Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
99. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.* Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.

100. Chittenden, T., et al., *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions.* Embo j, 1995. **14**(22): p. 5589-96.
101. Ruiz-Vela, A., et al., *Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases.* EMBO Rep, 2005. **6**(4): p. 379-85.
102. Mathias, S. and R. Kolesnick, *Ceramide: a novel second messenger.* Adv Lipid Res, 1993. **25**: p. 65-90.
103. Richter, C. and P. Ghafourifar, *Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria.* Biochem Soc Symp, 1999. **66**: p. 27-31.
104. Liu, J., B.S. Beckman, and M. Foroozesh, *A review of ceramide analogs as potential anticancer agents.* Future Med Chem, 2013. **5**(12): p. 1405-21.
105. Berg, C.P., et al., *Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis.* Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1197-206.
106. Lang, F., et al., *Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte.* Pflugers Arch, 2003. **447**(2): p. 121-5.
107. Lang, F., et al., *Mechanisms and significance of eryptosis.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(7-8): p. 1183-92.
108. Harrison, H.E., et al., *THE PATHOGENESIS OF THE RENAL INJURY PRODUCED IN THE DOG BY HEMOGLOBIN OR METHEMOGLOBIN.* J Exp Med, 1947. **86**(4): p. 339-56.
109. Arese, P., F. Turrini, and E. Schwarzer, *Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes.* Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(4-6): p. 133-46.
110. Lang, F., et al., *Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes.* Acta Physiol (Oxf), 2006. **187**(1-2): p. 191-8.
111. Foller, M., et al., *Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death.* Eur J Clin Invest, 2010. **40**(6): p. 534-40.
112. Lang, F., et al., *Ceramide in suicidal death of erythrocytes.* Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(1): p. 21-8.
113. Foller, M., et al., *TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes.* Cell Physiol Biochem, 2008. **21**(1-3): p. 183-92.
114. Foller, M., S.M. Huber, and F. Lang, *Erythrocyte programmed cell death.* IUBMB Life, 2008. **60**(10): p. 661-8.
115. Kojima, S., *[Characteristic feature in transport of erythrocyte membrane].* Nihon Rinsho, 1996. **54**(9): p. 2364-9.
116. Duranton, C., S.M. Huber, and F. Lang, *Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells.* J Physiol, 2002. **539**(Pt 3): p. 847-55.
117. Lang, K.S., et al., *Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes.* Cell Death Differ, 2003. **10**(2): p. 249-56.
118. Lang, P.A., et al., *Role of Ca2+-activated K+ channels in human erythrocyte apoptosis.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(6): p. C1553-60.
119. Gardos, G., *The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes.* Biochim Biophys Acta, 1958. **30**(3): p. 653-4.

120. Maher, A.D. and P.W. Kuchel, *The Gardos channel: a review of the Ca2+-activated K+ channel in human erythrocytes.* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1182-97.
121. Brugnara, C., *Erythrocyte membrane transport physiology.* Curr Opin Hematol, 1997. **4**(2): p. 122-7.
122. Browning, J.A., J.C. Ellory, and J.S. Gibson, *Pathophysiology of red cell volume.* Contrib Nephrol, 2006. **152**: p. 241-68.
123. Myssina, S., et al., *Cl- channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca(2+)-induced erythrocyte 'apoptosis'.* Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 241-8.
124. Lang, K.S., et al., *Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl.* Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(6): p. F1046-53.
125. Li, Q., et al., *Prostaglandin E2 stimulates a Ca2+-dependent K+ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability.* J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18651-6.
126. Schneider, J., et al., *Suicidal erythrocyte death following cellular K+ loss.* Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(1-4): p. 35-44.
127. Woon, L.A., et al., *Ca2+ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts.* Cell Calcium, 1999. **25**(4): p. 313-20.
128. Boas, F.E., L. Forman, and E. Beutler, *Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3077-81.
129. Messmer, U.K. and J. Pfeilschifter, *New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells.* Bioessays, 2000. **22**(10): p. 878-81.
130. Fadeel, B., *Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance.* Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(2): p. 269-75.
131. Seigneuret, M. and P.F. Devaux, *ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3751-5.
132. Dekkers, D.W., et al., *Comparison between Ca2+-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells.* Biochem J, 2002. **362**(Pt 3): p. 741-7.
133. Yang, Y., et al., *Specific binding of red blood cells to endothelial cells is regulated by nonadsorbing macromolecules.* J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 40489-95.
134. Turitto, V.T. and H.J. Weiss, *Red blood cells: their dual role in thrombus formation.* Science, 1980. **207**(4430): p. 541-3.
135. Mandal, D., et al., *Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39460-7.
136. Melloni, E., et al., *Cytosolic calcium dependent neutral proteinase of human erythrocytes: the role of calcium ions on the molecular and catalytic properties of the enzyme.* Biochem Biophys Res Commun, 1982. **107**(3): p. 1053-9.
137. Chan, S.L. and M.P. Mattson, *Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death.* J Neurosci Res, 1999. **58**(1): p. 167-90.

138. Goldkorn, T., et al., *H2O2 acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells.* J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 21)**: p. 3209-20.
139. Schiffmann, S., et al., *Ceramide metabolism in mouse tissue.* Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(8): p. 1886-94.
140. Ogretmen, B. and Y.A. Hannun, *Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 604-16.
141. Uchida, Y., *Ceramide signaling in mammalian epidermis.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 453-62.
142. Lang, K.S., et al., *Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes.* Cell Death Differ, 2004. **11**(2): p. 231-43.
143. Lang, F., et al., *Eryptosis, a window to systemic disease.* Cell Physiol Biochem, 2008. **22**(5-6): p. 373-80.
144. Lang, F., et al., *Oxidative stress and suicidal erythrocyte death.* Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(1): p. 138-53.
145. Wood, B.L., D.F. Gibson, and J.F. Tait, *Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations.* Blood, 1996. **88**(5): p. 1873-80.
146. Kirk, K., *Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte.* Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 495-537.
147. Kasinathan, R.S., et al., *Inhibition of eryptosis and intraerythrocytic growth of Plasmodium falciparum by flufenamic acid.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007. **374**(4): p. 255-64.
148. Bobbala, D., et al., *Effect of anandamide in Plasmodium Berghei-infected mice.* Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(3): p. 355-62.
149. Siraskar, B., et al., *Effect of amphotericin B on parasitemia and survival of plasmodium berghei-infected mice.* Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(3): p. 347-54.
150. Abed, M., et al., *Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease.* J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 871-9.
151. Kempe, D.S., et al., *Suicidal erythrocyte death in sepsis.* J Mol Med (Berl), 2007. **85**(3): p. 273-81.
152. Sopjani, M., M. Foller, and F. Lang, *Gold stimulates Ca2+ entry into and subsequent suicidal death of erythrocytes.* Toxicology, 2008. **244**(2-3): p. 271-9.
153. Niemoeller, O.M., et al., *Stimulation of eryptosis by aluminium ions.* Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **217**(2): p. 168-75.
154. Kiedaisch, V., et al., *Zinc-induced suicidal erythrocyte death.* Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1530-4.
155. Lang, E., et al., *Effect of thioridazine on erythrocytes.* Toxins (Basel), 2013. **5**(10): p. 1918-31.
156. Atchley, D.W., *Dehydration and Medical Shock.* Bull N Y Acad Med, 1934. **10**(3): p. 138-50.
157. Maccordick, A.H., *Dehydration Anaemia.* Can Med Assoc J, 1924. **14**(5): p. 416-7.

158. Dunn, C.D., *Effect of dehydration on erythropoiesis in mice: relevance to the "anemia" of space flight.* Aviat Space Environ Med, 1978. **49**(8): p. 990-3.
159. Bonadio, W.A., et al., *Efficacy of measuring BUN in assessing children with dehydration due to gastroenteritis.* Ann Emerg Med, 1989. **18**(7): p. 755-7.
160. Gray, J., *Gastrointestinal infection.* Practitioner, 1989. **233**(1469): p. 784-6.
161. Herold, G., *Innere Medizin*. 2013, Köln: Dr. med. Gerd Herold. 575 ff.
162. Mota, F. and M.L. Perez-Ricardez, *[Control of diarrheal diseases in Mexico and Latin America].* Bol Med Hosp Infant Mex, 1989. **46**(5): p. 360-7.
163. Dermaku-Sopjani, M., et al., *Downregulation of NaPi-IIa and NaPi-IIb Na-coupled phosphate transporters by coexpression of Klotho.* Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(2): p. 251-8.
164. Hu, M.C., et al., *Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism.* Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 503-33.
165. Kuro-o, M., *Overview of the FGF23-Klotho axis.* Pediatr Nephrol, 2010. **25**(4): p. 583-90.
166. Tang, C., et al., *Hydration-sensitive gene expression in brain.* Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(6): p. 757-68.
167. Torres, P.U., et al., *Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism.* Kidney Int, 2007. **71**(8): p. 730-7.
168. Tuohimaa, P., *Vitamin D and aging.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **114**(1-2): p. 78-84.
169. Kempe, D.S., et al., *Accelerated suicidal erythrocyte death in Klotho-deficient mice.* Pflugers Arch, 2009. **458**(3): p. 503-12.
170. Zacchia, M. and G. Capasso, *Dehydration: a new modulator of klotho expression.* Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(4): p. F743-4.
171. Hu, M.C., et al., *Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule.* Faseb j, 2010. **24**(9): p. 3438-50.
172. Yoshida, T., T. Fujimori, and Y. Nabeshima, *Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene.* Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 683-9.
173. Carpinelli, M.R., A.K. Wise, and R.A. Burt, *Vitamin D-deficient diet rescues hearing loss in Klotho mice.* Hear Res, 2011. **275**(1-2): p. 105-9.
174. Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing.* Nature, 1997. **390**(6655): p. 45-51.
175. Fukuchi, Y., *The aging lung and chronic obstructive pulmonary disease: similarity and difference.* Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(7): p. 570-2.
176. Maltese, G. and J. Karalliedde, *The putative role of the antiageing protein klotho in cardiovascular and renal disease.* Int J Hypertens, 2012. **2012**: p. 757469.

177. Nikolov, I.G., et al., *Impact of disturbances of calcium and phosphate metabolism on vascular calcification and clinical outcomes in patients with chronic kidney disease.* Blood Purif, 2009. **27**(4): p. 350-9.
178. Tang, C., et al., *Downregulation of Klotho expression by dehydration.* Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(4): p. F745-50.
179. Kleeman, C.R. and M.P. Fichman, *The clinical physiology of water metabolism.* N Engl J Med, 1967. **277**(24): p. 1300-7.
180. Robertson, G.L., *Vasopressin in osmotic regulation in man.* Annu Rev Med, 1974. **25**: p. 315-22.
181. Li, Y.C., et al., *Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **89-90**(1-5): p. 387-92.
182. Zhou, C., et al., *Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1alpha-hydroxylase knockout mice.* Kidney Int, 2008. **74**(2): p. 170-9.
183. Seo, S.Y., V.K. Sharma, and N. Sharma, *Mushroom tyrosinase: recent prospects.* J Agric Food Chem, 2003. **51**(10): p. 2837-53.
184. Vogel, F.S., et al., *gamma-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzene, an inducer of cryptobiosis in Agaricus bisporus and a source of specific metabolic inhibitors for melanogenic cells.* Cancer Res, 1977. **37**(4): p. 1133-6.
185. Wick, M.M., A. Rosowsky, and J. Ratliff, *Antitumor effects of L-glutamic acid dihydroxyanilides against experimental melanoma.* J Invest Dermatol, 1980. **74**(2): p. 112-4.
186. Wick, M.M. and G. Fitzgerald, *Inhibition of reverse transcriptase by tyrosinase generated quinones related to levodopa and dopamine.* Chem Biol Interact, 1981. **38**(1): p. 99-107.
187. Papaparaskeva-Petrides, C., C. Ioannides, and R. Walker, *Contribution of phenolic and quinonoid structures in the mutagenicity of the edible mushroom Agaricus bisporus.* Food Chem Toxicol, 1993. **31**(8): p. 561-7.
188. Papaparaskeva, C., C. Ioannides, and R. Walker, *Agaritine does not mediate the mutagenicity of the edible mushroom Agaricus bisporus.* Mutagenesis, 1991. **6**(3): p. 213-7.
189. Walton, K., et al., *Bioactivation of mushroom hydrazines to mutagenic products by mammalian and fungal enzymes.* Mutat Res, 1997. **381**(1): p. 131-9.
190. Walton, K., et al., *The metabolism and bioactivation of agaritine and of other mushroom hydrazines by whole mushroom homogenate and by mushroom tyrosinase.* Toxicology, 2001. **161**(3): p. 165-77.
191. Walton, K., R. Walker, and C. Ioannides, *Effect of baking and freeze-drying on the direct and indirect mutagenicity of extracts from the edible mushroom Agaricus bisporus.* Food Chem Toxicol, 1998. **36**(4): p. 315-20.
192. Toth, B., *Mushroom toxins and cancer (review).* Int J Oncol, 1995. **6**(1): p. 137-45.
193. Russo, G.L., et al., *Toxicity of melanin-free ink of Sepia officinalis to transformed cell lines: identification of the active factor as tyrosinase.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(2): p. 293-9.
194. McCarthy D.A., M.M.G., *Cytometric analysis of cell phenotype and*

function. 2001: Cambridge University Press.
195. Brunsting, A. and P.F. Mullaney, *Differential light scattering from spherical mammalian cells.* Biophys J, 1974. **14**(6): p. 439-53.
196. Darzynkiewicz Z., R.J.P., Crissman H.A., *Flow Cytometry*, ed. 2. 1994, San Diego: Academic Press.
197. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
198. Andree, H.A., et al., *Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers.* J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 4923-8.
199. Andrews, D.A., L. Yang, and P.S. Low, *Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells.* Blood, 2002. **100**(9): p. 3392-9.
200. Shapiro, H.M., *Practical Flow Cytometry*. 4 ed. 2003, New York: Wiley-Liss.
201. Abed, M., et al., *Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation.* Kidney Blood Press Res, 2013. **37**(6): p. 567-78.
202. Borst, O., et al., *Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX.* Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(4): p. C644-51.
203. Andrews, D.A. and P.S. Low, *Role of red blood cells in thrombosis.* Curr Opin Hematol, 1999. **6**(2): p. 76-82.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: (A) Familie der Caspasen (B) 3D-Struktur der Caspasen (C) Precursor-Molekül und aktives Enzym mit markierten katalytischen Arealen: das aktive Enzym liegt als Dimer vor, die durch hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind [69]..... 13
Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose. Weitere Erklärungen vgl. 1.2.3.2 und 1.2.3.3 Aus:[76] 15
Abb. 3: Trigger der Eryptose, schematisch dargestellt, aus: [114] 18
Abb. 4: Inhibition und Stimulation der Enzyme Translokase und Scramblase (selbst erstellt). Kalzium inhibiert die Translokase und stimuliert die Aktivität der Scramblase [132]. Dies führt zu einer Phosphatidylserin-Exposition. Caspase-3 inhibiert die Translokase[135] , Ceramid stimuliert die Scramblase. Beides führt zur PS-Exposition. 21
Abb. 5: Synthesewege von Eumelanin und Pheomelanin. Aus: [183] 27
Abb. 6: Fluo-3/AM (Calbiochem, Germany)..... 37
Abb. 7: Dot Plot einer durchflusszytometrischen Analyse: X-Achse zeigt den Side scatter, Y-Achse den Forward Scatter. Aus: Physiologisches Institut Tübingen 40
Abb. 8: A: Plasmaosmolarität, B Plasmaaldosteronkonzentration C Plasmacalcitriolkonzentration und D Plasmakalziumkonzentration jeweils der Kontrollgruppe (weiße Balken) und dehydrierte Mäuse (schwarze Balken). Die Balken zeigen das arithmetische Mittel, * ($p<0.05$), **($p<0.01$) und *** ($p<0.001$) stellen die Signifikanz zwischen den hydrierten Mäusen (Kontrollgruppe) und den dehydrierten Mäusen dar..... 44
Abb. 9: Repräsentatives Histogramm zum Effekt der PS-Exposition bei spontaner Messung bei der Kontrollgruppe (grauer Bereich) und der 36h-dehydrierten Mäuse (schwarze Linie)..... 45
Abb. 10: Repräsentatives Histogramm zum Effekt der PS-Exposition nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung bei der Kontrollgruppe (grauer Bereich) und der 36-h-dehydrierten Mäuse (schwarze Linie). 46

Abb. 11: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6) zeigen das Annexin V Bindungsverhalten der hydrierten (graue Linie) im Vergleich zu den dehydrierten Mäusen (schwarze Linie) im Abstand von jeweils 24 Stunden (0 H- 24H- 48H) * ($p<0.05$) weist den signifikanten Unterschied zwischen hydrierten und dehydrierten Mäsuen aus. (ANOVA) 47
Abb. 12: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V bindenden Zellen nach 12-stündiger Exposition der Mauserythrozyten (grauer Schatten- Kontrollgruppe, schwarze Linie- dehydrierte Mäuse) in Ringerlösung..... 48
Abb. 13: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V bindenden Zellen nach 12-stündiger Exposition der Mauserythrozyten (grauer Schatten- Kontrollgruppe, schwarze Linie- dehydrierte Mäuse) in glukosefreier Lösung. 48
Abb. 14: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6) der Kontrolle (12-stündige Exposition in Ringerlösung, linke Balken) und der energiedepletierten Erythrozyten (12-stündige Exposition in glukosefreier Umgebung, rechte Balken) jeweils der Kontrollgruppenmäuse (weiße Balken) und der dehydrierten Mauserythrozyten (schwarze Balken). *($p<0.05$) zeigt den signifikanten Unterschied zu den Erythrozyten der hydrierten Mäuse, ###($p<0.001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Ringerlösung an (ANOVA). 49
Abb. 15: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V-bindenden Zellen des FACS mit hydrierten (grauer Bereich) und dehydrierten (schwarze Linie) Mauserythrozyten nach 30-minütiger Inkubation in Ringerlösung. 50
Abb. 16: Repräsentatives Histogramm der Annexin-V-bindenden Zellen des FACS mit hydrierten (grauer Bereich) und dehydrierten (schwarze Linie) Mauserythrozyten nach 30-minütiger Inkubation in Ringerlösung mit 1µM des Kalziumionophor Ionomycin. 51
Abb. 17: Arithmetische Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=6) der Phosphatidylserin-Exposition der Mauserythrozyten in der Kontrolle links (30-minütige Exposition in Ringerlösung) und der 1µM Ionomycin enthaltenden Ringerlösung rechts. Die hydrierten Kontrollmäuse sind in den weißen Balken dargestellt, die dehydrierten Mäuse mit den schwarzen Balken.* ($p<0.05$) zeigt den signifikanten Unterschied zu hydrierten Mäusen an, ### ($p<0.001$) zeigt

den signifikanten Unterschied zur Kontrolle in Abwesenheit von Ionomycin an (ANOVA). 52
Abb. 18: Repräsentatives Histogramm der Annexin V bindenden Zellen in % der hydrierten Mäuse (grauer Bereich) und der dehydrierten Mäuse (schwarze Linie) nach 2-stündiger Exposition in Ringerlösung..... 53
Abb. 19: Repräsentatives Histogramm der Annexin V bindenden Zellen in % der hydrierten Mäuse (grauer Bereich) und der dehydrierten Mäuse (schwarze Linie) nach 2-stündiger Exposition in Ringerlösung mit 800 mOsm Saccharose. 54
Abb. 20: Arithmetische Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=6) der Phosphatidylserin-Exposition der Mauserythrozyten in der Kontrolle links (2-stündige Exposition in Ringerlösung) und der 800 mOsm enthaltenden Ringerlösung rechts. Die hydrierten Kontrollmäuse sind in den weißen Balken dargestellt, die dehydrierten Mäuse mit den schwarzen Balken.* ($p<0.05$) zeigt den signifikanten Unterschied zu hydrierten Mäusen an, ### ($p<0.001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Kontrolle in isotonem Milieu an (ANOVA)... 55
Abb. 21: Repräsentatives Histogramm der Annexin V-Bindung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung. M1 ist das Gate der Annexin V-bindenden Zellen. 56
Abb. 22: Repräsentatives Histogramm der Annexin V Bindung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung mit 7 U/ml Tyrosinase von Pilzen. Im M1 Gate werden die Annexin V-bindenden Zellen detektiert und gezählt. 56
Abb. 23: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4) der Annexin V- bindenden Zellen nach 24 h Inkubation in Ringerlösung (weißer Balken), in Ringerlösung mit 1, 5, 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und in Ringerlösung mit 4,9 µL destilliertem Wasser je ml Ringerlösung als Ladekontrolle (grauer Balken). ** ($p<0,01$) und *** ($p<0,001$) zeigen die Signifikanz zur Abwesenheit von Tyrosinase an. 57
Abb. 24: Repräsentatives Histogramm des Forward Scatter von Erythrozyten, die 24h in Ringer ohne Tyrosinase (grauer Bereich) oder mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie) inkubiert waren. 58

Abb. 25: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) vom normalisierten Geomean des Forward Scatter nach der 24 h Inkubation der Erythrozyten mit (schwarze Balken) oder ohne (weißer und grauer Balken) Tyrosinase. 59
Abb. 26: Repräsentatives Histogramm von Fluo-3-Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation ohne (grauer Bereich) und mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie). 60
Abb. 27: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=4) der Fluo3-Fluoreszenz (arbitrary units) nach 24-stündiger Inkubation mit Ringerlösung (weißer Balken) mit 1,5 oder 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und 4,9 µL destilliertem Wasser als Ladungskontrolle (grauer Balken). * ($p < 0,05$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase (ANOVA). 61
Abb. 28: Repräsentatives Histogramm der Annexin V-bindenden Zellen des Durchflusszytometers nach 24-stündiger Inkubation mit Ringerlösung (grauer Bereich) und Ringerlösung plus 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie). 62
Abb. 29: Repräsentatives Histogramm der Annexin V-bindenden Zellen des Durchflusszytometers nach 24-stündiger Inkubation mit kalziumfreier Lösung (grauer Bereich) und kalziumfreier Lösung plus 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie). Anstatt 1mM Ca^{2+} enthält die Lösung 1mM EGTA. 62
Abb. 30: Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4) von Annexin V- bindenden humanen Erythrozyten nach 24 stündiger Inkubation in Ringerlösung mit 7U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und ohne Tyrosinase (weißer Balken) auf der linken Seite und nach 24 stündiger Inkubation in kalziumfreier Lösung mit 7U/ml Tyrosinase (schwarze Balken) und ohne Tyrosinase (weißer Balken) auf der rechten Seite. *** ($p<0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase, # ($p<0,05$) zeigt den signifikanten Unterschied zur kalziumfreien Lösung mit Tyrosinase. 63
Abb. 31: Repräsentatives Histogramm einer Ceramid-Sättigungs-Messung nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (grauer Bereich) und mit 7 U/ml Tyrosinase (schwarze Linie). 64
Abb. 32: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) der Ceramid-abhängigen Fluoreszenzmessung nach 24-stündiger Inkubation mit

(schwarzer Balken) und ohne (weißer Balken) 7 U/ml Tyrosinase. *(p<0,01) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase an (*t*-Test). 65
Abb. 33: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) nach 60-minütiger Inkubation in Ringerlösung (linke Balken) und Ringerlösung mit 1 µM Ionomycin (rechte Balken, jeweils mit (schwarze Balken) 7 U/ml Tyrosinase und ohne (weiße Balken). *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Ionomycin an, # (p< 0,05) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Tyrosinase an..... 66

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Morphologische Kriterien der Apoptose aus: [2, 63, 64] 10
Tabelle 2: Morphologische Kriterien der Nekrose Aus: [1, 66, 67]..... 11
Tabelle 3: Ringerlösung 32
Tabelle 4: Glukosefreie Lösung..... 33
Tabelle 5: Annexin-Wasch-Puffer..... 34
Tabelle 6: Ca^{2+}-freie Lösungen 36

9 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Dissertationsschrift enthält zwei verschiedene Versuchsteile, die in zwei Veröffentlichungen publiziert wurden. Alle Arbeiten wurden von Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang als habilitierter Betreuer und von Dr. med. Majed Abed im Labor betreut:

9.1 Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation

Die Konzeption und Ausarbeitung der Studie lag in den Händen von Dr.med. Majed Abed (Laborleiter). Er konzipierte den Versuchsaufbau und organisierte die notwendigen Versuchstiere. Martina Feger kümmerte sich um die Tiere, sorgte für deren Wasserentzug vor Versuchsbeginn und entnahm das Kapillarblut der Tiere. Majed Abed führte die Versuche zur Plasmakonzentrationsbestimmung und Leonie Frauenfeld (Doktorandin) die Plasmaosmolaritätsbestimmung durch. Kousi Alzoubi und Leonie Frauenfeld führten die Versuche zur Sensitivierung der Mäuseerythrozyten zu Phosphatidylserin-Exposition der murinen Erythrozyten, hyperosmotischem Schock, oxidativen Stress, Ionomycin und Energiedepletion am FACS durch. Tatjana Pakladok nahm die unveröffentlichen Fotos der Erythrozyten mit dem Elektronenmikroskop auf. Die Graphen wurden von Majed Abed und Leonie Frauenfeld erstellt, ebenso wie die Originalhistogramme.

9.2 Stimulation of Cell Membrane Shrinkage by Mushroom Tyrosinase

Die Konzeption und Ausarbeitung der Studie führte Leonie Frauenfeld durch. Sie übernahm die Literaturrecherche gemeinsam mit Majed Abed. Die Versuche zur Phosphatidylserin-Exposition: Annexin V, Zellgröße, zytosolische Kalziumkonzentrationen und kalziumunabhängige Zellmembranschrumpfung übernahm Leonie Frauenfeld. Die Versuche zur

Ceramid-Bildung übernahmen Leonie Frauenfeld und Kousi Alzoubi. Die Graphen und Originalhistogramme wurden von Leonie Frauenfeld und Majed Abed erstellt.

Für die statistische Auswertung sind Leonie Frauenfeld und Majed Abed verantwortlich. Die Veröffentlichungen wurden von Prof. Dr. med. Florian Lang verfasst und von Leonie Frauenfeld und Majed Abed Korrektur gelesen.

10 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

1.)Frauenfeld, L., et al., Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mushroom tyrosinase. Toxins (Basel), 2014. **6**(3): p. 1096-108.

2.) Abed, M., et al., Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation. Kidney Blood Press Res, 2013. **37**(6): p. 567-78.

11 Danksagung

Herrn Prof. Florian Lang danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Voraussetzungen, es zu bearbeiten. Ich bedanke mich für die sehr guten Bedingungen, unter denen ich im Labor arbeiten konnte, bei optimaler Betreuung, mit vielen Freiheiten und der Möglichkeit, eine offene Diskussion mit ihm über die Arbeit zu führen.

Besonderen Dank schulde ich dem Laborleiter Herrn Dr. med. Majed Abed vom Physiologischen Institut der Universität Tübingen, der mir zum Verständnis vieler Quellen verhalf und mir wichtige sachliche Hinweise gab, sowie meine Laborarbeit fachkundig beurteilte und in zahlreichen Diskussionen die Ergebnisse diskutierte. Die Versuche waren nicht immer von Erfolg gekrönt, aber Majed Abeds Verständnis und Überzeugung von guter wissenschaftlicher Arbeit halfen mir sehr, mit Freude an der Arbeit zu bleiben.

Ebenso danke ich Khousi Al Zoubi, Markus Arnold, Rosi Bissinger, Elisabeth Lang und besonders Paola Modicano und Janin Jacobi für die sehr gute Zusammenarbeit im Labor und die hilfreiche Unterstützung. Vielen Dank für die schönen und anstrengenden Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben!
Auch allen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts gilt mein Dank, insbesondere Leijla Subasic, Tanja Loch und Uwe Schüler.
Danke, Dr. rer. nat. José Hurst und Dr med. Majed Abed für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zu ihrer Vollendung notwendig waren.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Birgitt Scheuermann-Frauenfeld und Horst Frauenfeld und meinem Bruder Anian Frauenfeld bedanken, die mir in all den Jahren immer geholfen haben und zur Seite standen. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.
Danke Philipp.

12 Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Frauenfeld, Leonie Antonia Sophie
Geburtsdatum:	09.07.1990
Geburtsort:	Heidelberg
Familienstand:	ledig
Mutter:	Dr. phil. Birgitt Scheuermann
Vater:	Dr. jur. Horst Friedrich Frauenfeld

SCHULISCHER WERDEGANG

1996 – 2000	Hauhecken-Grundschule, Heidelberg-Wieblingen
2000 – 2009	Elisabeth-von-Thadden-Schule, Heidelberg-Wieblingen
2009	Allgemeine Hochschulreife, Note 1,6

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

Sommersemester 2010	Beginn des Studiums Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
30.03.2012	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0
16.04.2015	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note 2,0
18.05.2016	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note 1,0
05.07.2016	Approbation als Ärztin