

**Der Einfluss von trans-Zimtaldehyd
auf den
programmierten Zelltod
von Erythrozyten**

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

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

vorgelegt von

Theurer, Michael Dan

2016

Dekan:

Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. F. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
2 Grundlagen.....	3
2.1 Erythrozyten	3
2.2 Apoptose.....	4
2.2.1. Definition Apoptose	4
2.2.2. Merkmale der Apoptose	5
2.2.3. Ablauf der Apoptose.....	6
2.2.3.1 Der extrinsische Signalweg	7
2.2.3.2. Der intrinsische Signalweg	9
2.2.3.3 Der alternativ intrinsische Signalweg.....	11
2.3 Eryptose	11
2.3.1 Grundlagen der Eryptose	11
2.3.2. Signalwege der Eryptose	12
2.3.2.1. Ca ²⁺ -abhängiger Signalweg.....	13
2.3.2.2. Ca ²⁺ -unabhängiger Signalweg	15
2.3.4 Inhibitoren der Eryptose	15
2.3.4.1 Erythropoetin	16
2.3.4.2 Weiter bekannte Inhibitoren der Eryptose	16
2.3.5 Trigger der Eryptose	16
2.3.6 Caspasen.....	17
2.4 Trans-Zimtaldehyd.....	19
2.4.1 Geschichte und Vorkommen	19
2.4.2 Strukturformel von trans-Zimtaldehyd.....	20
2.4.4 Eigenschaften von trans-Zimtaldehyd.....	21
2.4.4.1 Antimutagene Eigenschaften	21
2.4.4.2 Proapoptische Eigenschaften	22
2.4.4.3 Antiproliferative Eigenschaften.....	22
2.4.4.4 Vasodilatatorischer Effekt.....	23
2.4.4.5 Antimikrobielle Wirkung.....	23
3 Ziel der Studie	24
4 Materialien	25
4.1 Erythrozyten	25
4.2 Substanzen	25
4.2.1 Trans-Zimtaldehyd	25
4.2.2 Annexin V FITC.....	26
4.2.3 Fluo-3 AM Ester	26
4.3 Verwendete Lösungen	27
4.3.1 CPD-Puffer.....	27
4.3.2 SAG-M-Lösung	28
4.3.3 Ringerlösung.....	28

4.3.4 Annexin Wash Buffer	29
5 Methoden.....	30
5.1 FACS Analyse – Durchflusszytometrie	30
5.2 Annexin V-Bindung und Vorwärtsstreulicht (forward scatter)	31
5.3 Messungen des intrazellulären Kalziums.....	31
5.4 Messung der Hämolyse	32
5.5 Statistik	32
6 Ergebnisse.....	33
6.1 Messung des intrazellulären Kalziums.....	33
6.2 Forward Scatter	36
6.3 Annexin V Bindung	38
6.4 Hämolyse	40
6.5 Annexin V Bindung unter Entzug von Kalzium.....	42
7 Diskussion.....	44
7.1 Diskussion der Versuchsabläufe	44
7.2 Diskussion Ergebnissteil.....	46
8 Zusammenfassung	49
9 Literaturverzeichnis.....	51
10 Veröffentlichungen.....	59
11 Erklärung zum Eigenteil	60
12 Danksagung.....	61

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APLT	Aminophospholipidtranslokase
APO1	Apoptosis Antigen 1
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
BH3	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain agonist
C	Kohlenstoff
Ca	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
ChTX	Charybdotoxin
Cl	Chlor
CPD (-Puffer)	Zitrat-Puffer (Citrat, Phosphat, Dextrose)
c-FLIPs	cellular FLICE inhibitory proteins
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low PI
DIC	disseminated intravascular coagulation
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death Receptor
EDAR	Ectodysplasin A Rezeptor
EPO	Erythropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorting
FADD	FAS-associated death domain
Fe	Eisen
FITC	Fluoreszenzthiozyanat
FLIP	FLICE inhibitor protein
FSC	Forward Scatter
H	Wasserstoff
HEPES	N-2- Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
K	Kalium
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Mg	Magnesium
mM	Millimolar
n	Probenzahl
N	Stickstoff
Na	Natrium
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NO	Stickoxid
O	Sauerstoff
P	Phosphat
PAF	Platelet activating factor
PC	Prokaspase
PGE	Prostaglandin E
PS	Phosphatidylserin
PTP	Permeability transition pores
RPM	Rounds Per Minute
S	Schwefel
SAG-M	Salzlösung, Adenin, Glukose, Mannitol
SEM	Standardfehler
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases

SSC	Side Scatter
TNFR	Tumor Necrose Faktor Rezeptor
TRAIL-R	TRAIL-Receptor
TRPC	Transient receptor potential channel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie der Apoptose [Eigene Darstellung an Anlehnung an (Ruckpaul et al., 2013)].....	6
Abbildung 2: Extrinsischer Signalweg, [Eigene Darstellung an Anlehnung an (Bajwa et al., 2012)].....	8
Abbildung 3: Intrinsischer Signalweg [Eigene Darstellung an Anlehnung an (Bajwa et al., 2012)].....	10
Abbildung 4: Signalwege der Eryptose (Florian Lang, 2009).....	13
Abbildung 5: Strukturformel von trans-Zimtaldehyd (Xue et al., 2011).....	20
Abbildung 6: Original Histogramm – Messung des intrazellulären Kalziums +/- 30 μ M trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013).....	34
Abbildung 7: Messung des intrazellulären Kalziums in Ringerlösung unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 μ M trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)...	35
Abbildung 8: Original Histogramm – Messung des Vorwärtsstreulichts +/- 30 μ M trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013).....	36
Abbildung 9: Messung des Vorwärtsstreulichts in Ringerlösung unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 μ M trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)...	37
Abbildung 10: Original Histogramm – Annexin V Bindung in Ringerlösung \pm 30 μ M trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013).....	38
Abbildung 11: Messung der Annexin V Bindung in Ringerlösung unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 μ M trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)...	39
Abbildung 12: Messung der Hämolyse unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 μ M trans-Zimtaldehyd (graue Balken) (Theurer et al., 2013)	40
Abbildung 13: Wirkung von Kalziumentzug auf trans-Zimtaldehyd induzierte Annexin V Bindung (Theurer et al., 2013).....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des CPD-Puffers	27
Tabelle 2: Zusammensetzung der SAG-M-Lösung	28
Tabelle 3: Zusammensetzung der Ringerlösung.....	28
Tabelle 4: Zusammensetzung des Annexin Wash Buffers.....	29

1 Einleitung

Schon seit jeher wird dem Blut eine besondere Bedeutung zugemessen. Bei großem Blutverlust schwinden sowohl Kraft als auch Bewusstsein. Bereits in der Antike galt es daher als Symbol des Lebens. Dank der modernen Forschung konnten die Aufgaben, welche das Blut in unserem Körper erfüllt, quantifiziert werden. So wissen wir heute, dass das Blut für den Sauerstofftransport unabdingbar ist. Doch dies ist bei weitem nicht seine einzige Funktion. So sind zum Beispiel auch Temperaturregulation, Transport der Stoffwechselprodukte, Regulation des pH-Wertes mithilfe des Kohlensäure-Puffers und ein Großteil der Immunabwehr Aufgaben des Blutes.

Das Blut lässt sich in Plasma und feste Bestandteile einteilen. Das Plasma besteht hauptsächlich aus Wasser und Elektrolyten, wohingegen die festen Bestandteile, auch zelluläre Bestandteile oder Hämatokrit genannt, in rote Blutkörperchen (Erythrozyten), weiße Blutkörperchen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) aufzuteilen sind. Sobald auch nur einer dieser Bestandteile vom physiologischen Zustand abweicht, kommt es zu pathologischen Erscheinungen: Krankheitsbilder entstehen. Im Falle einer Leukämie (Blutkrebs) werden vermehrt Leukozyten, ebenso wie deren noch nicht funktionstüchtigen Vorstufen, produziert, weshalb die übliche Blutbildung verdrängt und somit eingeschränkt wird. Das Blutbild wird somit pathologisch verändert. Es kommt zu Blässe, Schwäche und spontanen Blutungsneigungen.

In den kernhaltigen Zellen des Körpers kann mithilfe eines Vorgangs namens Apoptose eine pathologische Zellveränderung im Normalfall verhindert werden. Die Apoptose ist der suizidale, programmierte Zelltod. Wird eine entartete Zelle ausfindig gemacht, erhält sie ein Signal und die Apoptose setzt ein und macht sie unschädlich, bevor sie weiter proliferieren kann. Folglich spielt die Regulation der Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Krebserkrankungen (Cory & Adams, 2002).

Um die Apoptose durchzuführen sind Zellkern und Mitochondrien vonnöten. Erythrozyten verlieren im Laufe ihrer Reifung beides. Lange war man daher der Meinung, lediglich Milz und Leber seien für den Abbau alter Erythrozyten

zuständig. In den letzten Jahren, wurden neue Erkenntnisse erschlossen, welche beweisen, dass auch Erythrozyten zu einem suizidalen, programmierten Zelltod befähigt sind (Bratosin et al., 2001). Dieser Vorgang ist heute unter dem Name der Eryptose bekannt (K. S. Lang et al., 2005a).

Die Erythrozyten haben, wie zuvor beschrieben, wichtige Aufgaben im Körper auszuführen. Für den Sauerstofftransport sind sie unabdingbar. Somit kommt es bei vermehrter Eryptose zu einem Krankheitsbild namens Anämie (Blutarmut), bei welchem der Körper nicht mit ausreichend Sauerstoff versorgt wird. Es gibt viele Stoffe, welche die Eryptose inhibieren oder auslösen. Die Untersuchung der Auswirkung von Trans-Zimtaldehyde auf die Eryptose ist das Thema dieser Dissertation.

2 Grundlagen

2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten, welche auch als rote Blutkörperchen bezeichnet werden, können sich nicht mehr teilen. Beim Erwachsenen entstehen sie im roten Knochenmark im Verlauf der Hämatopoese aus pluripotenten Stammzellen, den myeloiden Progenitoren. Die Entwicklung der Erythrozyten, die Erythropoese, wird vom Hormon Erythropoetin der Niere stimuliert. Dieses wird zum Beispiel bei Sauerstoffmangel vermehrt ausgeschüttet. Aber auch die Hormone Testosteron, Kortisol und Somatotropin steigern die Erythropoese. Am sechsten Tag der Erythropoese stößt der Normoblast, eine Vorläuferzelle der Erythrozyten, seinen Zellkern aus und wird somit zum Retikulozyten. Ohne Zellkern sind diese flexibel genug um durch die Schlitze der Knochenmarksinus zu entweichen und somit in das Blut zu gelangen. Dort entwickeln sie sich innerhalb eines Tages durch Verlust von Mitochondrien und Ribosomen weiter zu reifen Erythrozyten. Dieser Verlust war auch unter anderem Grund der Annahme, Erythrozyten seien nicht zur Apoptose befähigt.

An der inneren Membran der Mitochondrien finden Zitratzyklus und oxidative Phosphorylierung statt. Erythrozyten fehlen diese, weshalb sie ihren Energiebedarf, also die Herstellung von ATP, lediglich über anaerobe Glykolyse decken können.

Durchschnittlich haben Erythrozyten einen Durchmesser von 7,5 μm . Seine bikonkave Form hat der Erythrozyt aufgrund seines Membranskeletts. Dieses besteht aus einem Netz aus Spektrin-Filamenten, welche durch kurze Aktin-Filamente zusammen gehalten werden. Adapterproteine wie Ankyrin und β -Spektrin vermitteln und helfen bei der Verankerung des Netzes an den integralen Proteinen der Plasmamembran wie Bande 3-Tetramer und Glykophorin.

Die bikonkave Form ist einerseits Oberflächenvergrößerung um an der Zelle einen besseren Gasaustausch zu ermöglichen und gleichzeitig eine sehr bewegliche Form um die Passage durch dünne Kapillaren zu ermöglichen. Diese Flexibilität nimmt jedoch im Laufe der Zeit ab, weshalb ca. 120 Tage alte Erythrozyten bei der Erythrozytenmauserung der Milz in Endothelspalten stecken bleiben, wo sie von Makrophagen entfernt werden.

Während ihrer Zirkulationszeit im Blut sind Erythrozyten für den Sauerstofftransport und ca. 30% des Kohlenstoffdioxidtransports verantwortlich. Des Weiteren helfen sie bei der Aufrechterhaltung des pH-Wertes des Blutes.

Um Sauerstoff transportieren zu können, besitzen Erythrozyten das Coenzym Hämoglobin, welches die rote Farbe der Erythrozyten ausmacht. Ein Hämoglobinmolekül besteht aus vier Proteinketten mit je einem Molekül Häm, einem vierzähligen Liganden, welches über vier koordinative Bindungen mit einem Fe^{2+} -Ion einen Chelatkomplex bildet. An die freie Koordinationsstelle bindet das Sauerstoffmolekül reversibel und kann somit transportiert und im Körper wieder abgegeben werden.

2.2 Apoptose

2.2.1. Definition Apoptose

Das griechisch stämmige Wort Apoptose setzt sich aus „apo“ und „ptosis“, dt. „weg“ und „Fall“, zusammen.

Wie zuvor erwähnt handelt es sich bei der Apoptose um den programmierten, suizidalen Zelltod.

Gründe für die Auslösung der Apoptose können sowohl physiologisch als auch pathologisch sein. Zu diesen Stimuli gehören unter anderem virale Infektion, Entwicklungsfehler und Beschädigungen.

Man muss zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Das leichteste Erkennungsmerkmal für die Nekrose sind die fünf Entzündungserscheinungen

rubor, calor, dolor, tumor und functio laesa. Bei der Apoptose hingegen kommt es zu keiner Entzündung, da die apoptotische Zelle mithilfe von Makrophagen und Lysosomen abgebaut wird bevor Zellbestandteile freigesetzt werden können.

2.2.2. Merkmale der Apoptose

Die Apoptose wird durch Caspasen (Cysteinyll Aspartat-spezifische Proteinasen) vermittelt. Sobald sie durch proapoptotische Stimuli aktiviert werden sind sie in der Lage über 70 Kernmatrixproteine zu spalten, wodurch der Zellkern schrumpft. Anschließend wird der Kern fragmentiert.

Des Weiteren kommt es zu einer Chromatinverdichtung und durch Auflösung der Zellkontakte wird die apoptotische Zelle vom Zellverband isoliert.

Durch Abschnürung entstehen sogenannte Apoptosekörperchen. Diese enthalten Zytoplasma und teilweise auch Fragmente des Zellkerns, wobei die Abschnürung und somit auch die Verteilung der Fragmente zufällig erfolgt. Der Teilschritt der Ausstülpung des Zytoplasma an der Membran bei der Bildung dieser Apoptosekörperchen wird auch als Blebbing bezeichnet (Kataoka & Tsuruo, 1996).

Wie zuvor erwähnt werden apoptotische Zellen durch Makrophagen phagozytiert. Um von diesen als suizidale Zelle erkannt zu werden, wird das Phospholipid Phosphatidylserin, welches sich bei vitalen eukaryontischen Zellen vor allem auf der Innenseite der Membran befindet, zur Außenseite exponiert.

Auch die Apoptosekörperchen werden phagozytiert. Somit gelangen keine zellulären Bestandteile nach Extrazellulär und eine Entzündung wird verhindert. Durch das Phagozytieren der apoptotischen Zelle werden des Weiteren antiinflammatorische Stimuli freigesetzt. Zu diesen gehören Cytokine und Wachstumsfaktor- β (Chaurio et al., 2009).

2.2.3. Ablauf der Apoptose

Es existieren mehrere Signalvarianten der Apoptose. Diese sind der extrinsische-, und der intrinsische Signalweg, wobei hier zu vermerken sei, dass auch der alternativ intrinsische Signalweg existiert.

Alle Signalwege haben gemeinsam, dass durch apoptotische Signale Caspasen aktiviert werden und es so zur Zellschrumpfung und DNA Fragmentierung kommt. Durch Abschnürung, auch als Zeiose oder Blebbing bezeichnet, bilden sich kleine Membranvesikel, welche man nun Apoptotische Körper nennt. Durch die Verlagerung von Phosphatidylserin zur Außenseite der Membran werden diese Apoptotischen Körper von Phagozyten entsorgt. Siehe Abbildung 1.

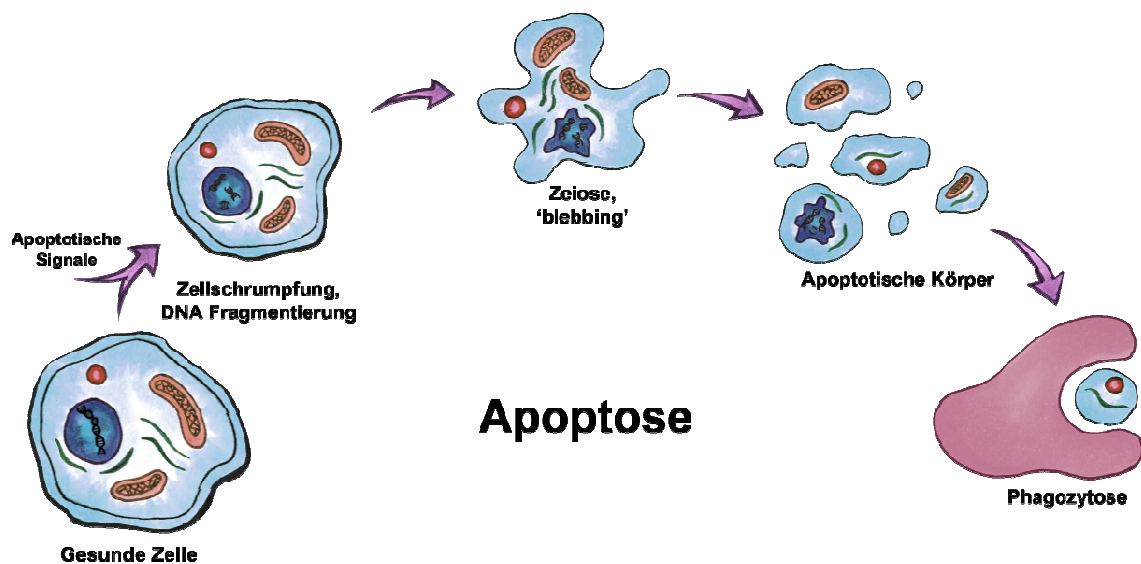


Abbildung 1: Morphologie der Apoptose [Eigene Darstellung an Anlehnung an (Ruckpaul et al., 2013)]

2.2.3.1 Der extrinsische Signalweg

Beim extrinsischen Signalweg wird die Apoptose durch externe Signale vermittelt, welche die „Todesrezeptoren“ (death receptor) der Zellmembran aktivieren.

Zu diesen Todesrezeptoren gehören CD95 (DR2, Fas, APO-1), TRAILR1 und TRAILR2, tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR-1), nerve growth factor receptor (NGFR), DR3 und DR6, ebenso wie ectodysplasin A receptor (EDAR). Allgemein lassen sich die Todesrezeptoren in zwei Gruppen einteilen, wobei die eine in der Lage ist, sowohl Todes- als auch Überlebenssignale zu empfangen, die Andere lediglich Todessignale empfangen kann.

Die Funktionsweise der Rezeptoren, welche nur auf Todessignale reagieren, soll im Folgenden am Beispiel des CD95-Rezeptors dargelegt werden

Um den für den extrinsischen Signalweg benötigten Todeskomplex zu bilden, bindet aufgrund eines Apoptose-Stimulus der CD95-Ligand (CD95-L) extrazellulär an den CD95-Rezeptor der Zellmembran. Dieser besitzt eine Transmembrandomäne.

FADD (Fas-associated death domain) besitzt eine Todesdomäne und liegt intrazellulär. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist sitzt es zwischen dem Todesrezeptor und der Procaspase-8 und kann so als Verbindungsglied wirken. Der Komplex aus CD95-L, CD95-Rezeptor, FADD und Procaspase-8 wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Durch die Bildung des Komplexes wird die Procaspase-8 aktiviert. Durch c-FLIPs (cellular FLICE inhibitory proteins) kann die Aktivierung jedoch verhindert werden.

Die Aktivierung der Procaspase-8 hat zwei mögliche Folgen: Liegt die aktivierte Procaspase-8 in höherer Konzentration vor, können die aktivierten Procaspasen-3/6/7 die Apoptose auslösen.

Liegt die aktivierte Procaspase-8 jedoch in geringer Konzentration vor, spaltet diese Bcl-2-Proteine zu Bid. Siehe Abbildung 2

Bid aktiviert die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welches in der Lage ist, Apoptose-Caspasen für den intrinsischen Signalweg auszulösen.

Die Funktionsweise der anderen Rezeptorengruppe, welche sowohl Überlebens- als auch Todessignale empfangen können, unterscheidet sich vor allem durch die Bildung zweier Komplexe.

Der membranständige Komplex I beinhaltet sowohl den Rezeptor als auch die Todesdomäne, jedoch weder FADD noch Procaspase-8. Diese bilden gemeinsam mit FLIP_{LS} das Traddosom, also den Komplex II.

Transloziert der Komplex I ins Zytosol zu Komplex II, so kann die Prokaspase-8 aktiviert werden und weitere Apoptosekaskaden auslösen.

Beispiele für diese Rezeptoren sind TNFR-1, DR3, DR6 und EDAR (Ashkenazi & Dixit, 1998).

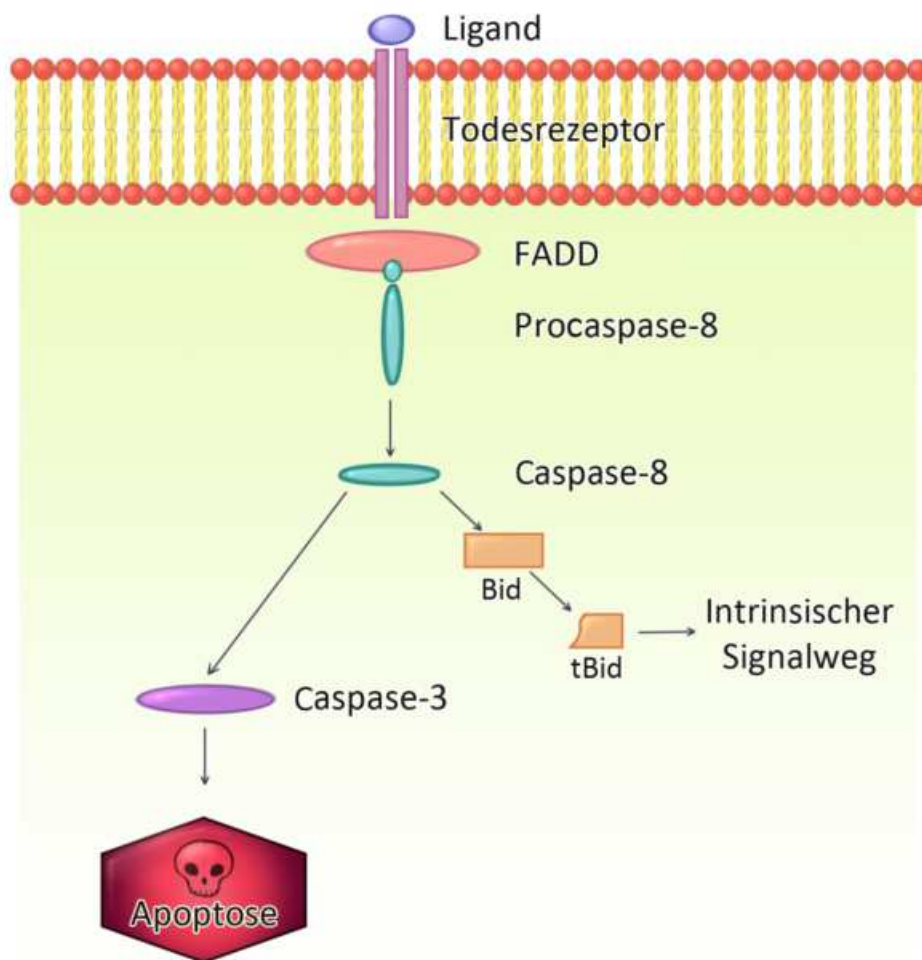


Abbildung 2: Extrinsischer Signalweg, [Eigene Darstellung an Anlehnung an (Bajwa et al., 2012)]

2.2.3.2. Der intrinsische Signalweg

Wie der Name bereits vermuten lässt, wird der intrinsische Signalweg durch interne Signale der Zelle vermittelt. Die Mitochondrien und deren Zusammenspiel mit den Bcl-2 Proteinen sind bei diesem Signalweg von zentraler Bedeutung.

Der intrinsische Signalweg wird vor allem aufgrund von Stress oder Beschädigung der Zelle eingeleitet. Dies wird hauptsächlich durch chemische Noxen, Bestrahlung, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Hitze hervorgerufen (Cory & Adams, 2002).

Die Zelle reagiert darauf mit der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c oder AIF (Apoptosis Inducing Factor). Dies wird durch zwei verschiedene Prozesse erreicht. Zum Einen durch Porenbildung, welcher von Bcl-2 Proteinen reguliert wird, zum Anderen durch einen kalziumvermittelten Prozess, welcher mehrere Ionenkanäle und Transportproteine betrifft (Danial & Korsmeyer, 2004).

Zur Familie der Bcl-2 Proteine gehören sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Proteine. Antiapoptotische Bcl-2 Proteine binden an die proapoptotischen Proteine Bak und Bax und verhindern somit deren Oligomerisierung, was wiederum zur Porenbildung (PTP) führen würde. Diese antiapoptotischen Proteine können, wie in Abbildung 3 gezeigt wird, durch tBid inhibiert werden. BH3-only-Proteine, welche lediglich über Sequenzhomologien in der BH3-Domäne besitzen, gehören zu den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilien. Sie können an die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine binden, wodurch Bax und Bak oligomerisieren können (Cory & Adams, 2002).

Gelangt Cytochrom c ins Zytosol, so bindet es ATP-abhängig an monomeres Apaf-1, was zu dessen Oligomerisierung führt. Dieses bildet wiederum mit der Initiatorcaspase-9 einen radförmigen, heptameren Komplex, welcher Apoptosom genannt wird (Li et al., 1997). Hierdurch wird die Caspase-9 aktiviert, woraufhin diese die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert, welche wiederum die Apoptose einleiten.

In diesem Prozess werden auch die Caspasen-2,-6,-8 und -10 aktiviert (Slee et al., 1999). Weitere Stoffe aus dem Intermembranraum der Mitochondrien sind

AIF (Apoptosis inducing factor) und Endonuklease G. Diese initiieren die DNA-Fragmentierung und die Chromatinkondensation im Zellkern (Miramar et al., 2001). Das ebenfalls aus den Mitochondrien stammende Protein Smac/DIABLO wirkt ähnlich wie Cytochrom c und aktiviert im Zytosol die Apoptose.

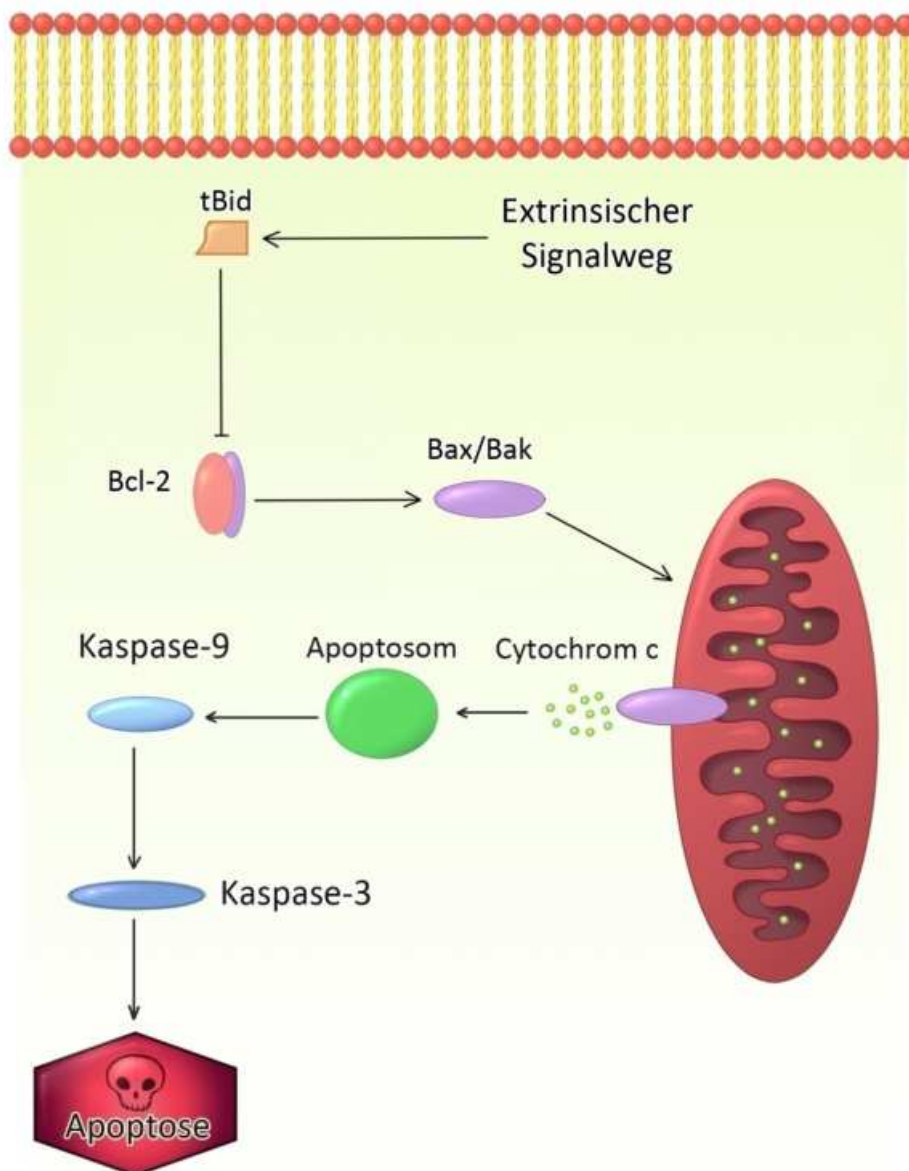


Abbildung 3: Intrinsischer Signalweg [Eigene Darstellung an Anlehnung an (Bajwa et al., 2012)]

Durch Inhibition der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine können die Proteine Bak und Bax Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden. Hierdurch strömt Cytochrom c in die Zelle, wodurch es zur Bildung des Apoptosoms kommt. Dies führt über die Caspase-9 und -3 zur Apoptose.

2.2.3.3 Der alternativ intrinsische Signalweg

Hier spielt das Endoplasmatische Retikulum (ER) die entscheidende Rolle. Durch Stressreaktionen des ER wird der alternativ intrinsische Signalweg ausgelöst und die Apoptose eingeleitet. Stressreaktionen des ER können durch Störungen bei der Faltung, Synthese und Umwandlung von Zelloberflächenproteine hervorgerufen werden (Lee, 2001). Da das ER einer der großen intrazellulären Kalziumspeicher ist, können auch hier physiologische Veränderungen der zellulären Kalzium-Homöostase zu ER-Stress und somit zur Apoptose führen. Dies wird auch mit einer Vielzahl von menschlichen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, zystische Fibrose und Diabetes mellitus in Verbindung gebracht (Kaufman, 2002).

Stressreaktionen des ER führen in der Zelle zur Akkumulation falsch bzw. nicht gefalteter Proteine. Chaperon-Proteine sind hierbei für das Überleben der Zelle wichtig, da sie die Translation herunter regulieren und Proteasome aktivieren, welche die fehlgefalteten Proteine abbauen.

Hält der ER-Stress jedoch an, so führen die nicht gefalteten Proteinstrukturen zur Apoptose (Ferri & Kroemer, 2001).

2.3 Eryptose

2.3.1 Grundlagen der Eryptose

Der Mensch besitzt ca. 25 Billionen Erythrozyten. Gealterte Erythrozyten sind weniger verformbar als junge Erythrozyten, weshalb pro Tag ca. 1%, also 200 Milliarden Erythrozyten, erneuert werden.

Aufgrund ihrer verringerten Verformbarkeit verfangen sich gealterte Erythrozyten somit im Netzwerk der Milzstränge der roten Pulpa (Pulpa rubra) der Milz. Nach ca. 100 bis 120 Tagen im Blutkreislauf werden sie dort von Makrophagen phagozytiert. Daher findet man nach Splenektomien einen größeren Anteil gealterter Erythrozyten im Blut (Daugas et al., 2001).

Erythrozyten besitzen weder einen Zellkern noch Mitochondrien und ER, welche für die zuvor beschriebene Apoptose der meisten Zellspezies von essentieller Bedeutung sind. Daher glaubte man bis vor wenigen Jahren, Erythrozyten seien nicht in der Lage, einen programmierten, suizidalen Zelltod auszuführen.

Studien zeigten jedoch, dass Erythrozyten, ebenso wie kernhaltige Zellen, in der Lage sind, Phosphatidylserin auf die äußere Membran externalisieren können. Phosphatidylserin kann von Makrophagen detektiert werden, woraufhin die Zelle phagozytiert wird (McEvoy et al., 1986).

Diese Reaktion wird aufgrund von Kalziumionophoren wie Ionomycin verursacht. Des Weiteren führt Ionomycin zur Zellschrumpfung und Blebbing der Membran (Berg et al., 2001).

Diese Mechanismen lassen sich auch bei apoptotischen Zellen beobachten. Der suizidale Zelltod der Erythrozyten hat somit Gemeinsamkeiten mit der Apoptose kernhaltiger Zellen, lässt sich mit dieser jedoch nicht gleichsetzen. Daher wurde durch K. S. Lang et al., 2005 diese Form des suizidalen Zelltodes Eryptose genannt (K. S. Lang et al., 2005a).

2.3.2. Signalwege der Eryptose

Eryptose kann durch mehrere Mechanismen stimuliert werden. Dazu gehören erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} - Aktivität, osmotischer Schock (K. S. Lang et al., 2003), oxidativer Stress (Duranton et al., 2002), Energiemangel (Klarl et al., 2006), Hyperthermie (Foller et al., 2010), Xenobiotika, endogene Substanzen (F. Lang et al., 2012) sowie Ceramid (F. Lang et al., 2010).

Ist die Konzentration von Glutathion (GSH), welches durch die Reduktion von Methämoglobin zu funktionsfähigem Hämoglobin eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus spielt, aufgrund von Energiemangel und oxidativem Stress oder finden die oben genannten

pathologischen, proeryptischen Vorgänge statt, so kommt es zu den in Abbildung 4 gezeigten Signalwegen der Eryptose.

Es gibt zwei Signalwege der Eryptose, welche in Kapitel 2.3.2.1. und 2.3.2.2. genau erläutert werden.

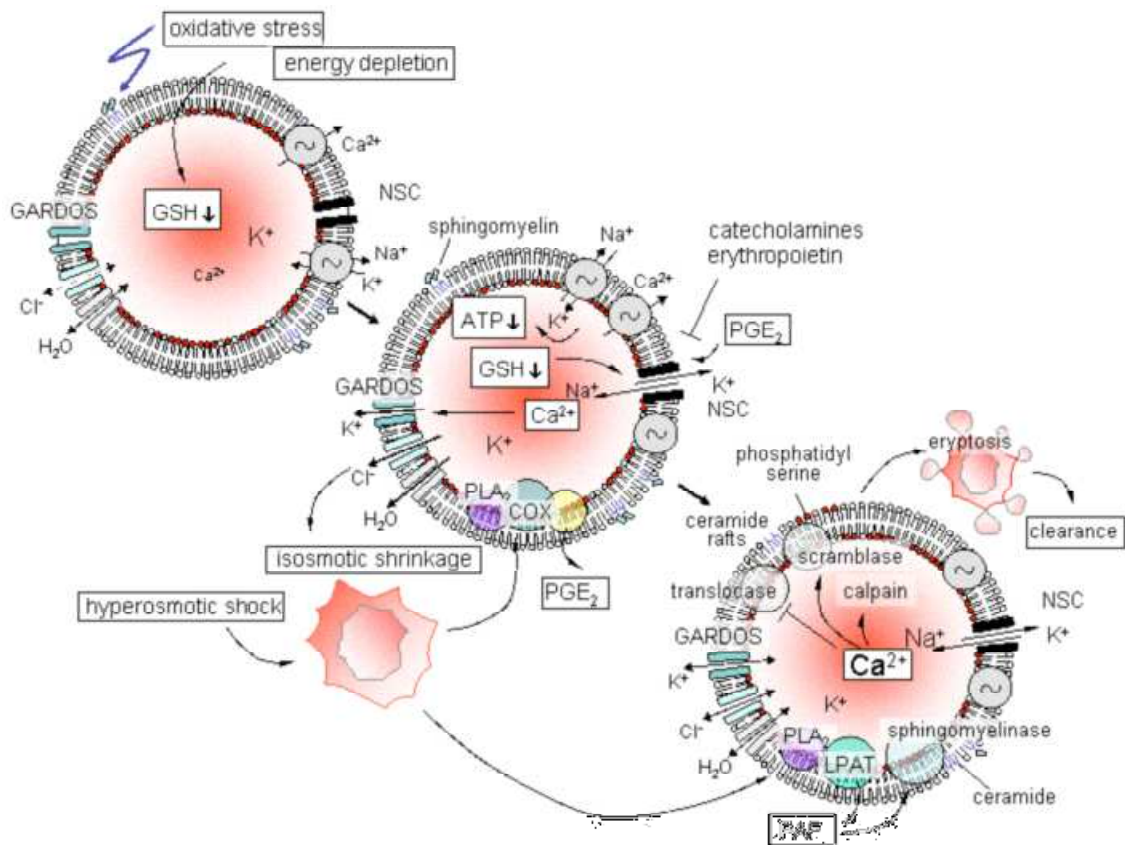


Abbildung 4: Signalwege der Eryptose (Florian Lang, 2009)

Die linke Zelle zeigt die Ionenkanäle der gesunden Zelle. Die mittlere und rechte Zelle zeigen die bei der Eryptose gebildeten Komplexe, ebenso wie die bei diesen Vorgängen geöffneten Ionenkanäle.

2.3.2.1. Ca^{2+} -abhängiger Signalweg

Ca^{2+} -Ionen gelangen mittels nicht-selektiver Kationenkanäle in die Zelle. Diese werden durch viele der zuvor beschriebenen Stimuli geöffnet, wodurch der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt ansteigt. Die Konzentrations- und somit

Polarisationsänderung der Zelle führt damit zu Veränderungen innerhalb der Zelle, wodurch die Erytose eingeleitet wird.

Ca^{2+} führt zu einem Zusammenbruch der Membranasymmetrie indem es die Cystein Endopeptidase Calpain aktiviert. Durch Aktivierung wird das aktive Zentrum freigelegt, wo es an der Zellmembran das Zytoskelett der Erythrozyten zerstört (Foller et al., 2008). Calpain ist somit ein Enzym das Zytoskelett-Proteine abbaut, was zu Zellmembran blebbing führt (K. S. Lang et al., 2004). Des Weiteren führt der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel der Zelle zur reversiblen Bindung von Calmodulin an das so genannte „target“ Protein des Zytoskeletts. Calmodulin ist ein Protein, welches die Membranstabilität regulieren kann (Yan et al., 2006).

Durch verstärkten Ca^{2+} -Einstrom wird auch die erythrozytäre Scramblase aktiviert sowie die Translokase gehemmt. Dadurch kann die Asymmetrie der Membranlipide nicht aufrecht erhalten werden. Das führt zu einer hohen Phosphatidylserinpräsentation an der Membranaußenseite (Bever et al., 1995; Geldwerth et al., 1993; Kuypers et al., 1996), welche von Makrophagen erkannt werden und die Phagozytose der Erythrozyten zur Folge hat (Beaumont & Canonne-Hergaux, 2005). Ein hyperosmotischer Schock sowie Chloridentzug veranlassen die Ausschüttung von PGE_2 , welches ebenso wie oxidativer Stress die Öffnung unselektiver Kationenkanäle auslöst und zu einem Kalziumanstieg führt (Foller et al., 2008).

Der Gardos-Kanal ist ein Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanal, welcher in der Membran der Erythrozyten verankert ist. Wird er durch den intrazellulären Anstieg an Ca^{2+} - Ionen geöffnet, so transportiert er K^+ -Ionen nach intrazellulär.

Die Zellmembran wird daraufhin hyperpolarisiert und erleidet einen KCl-Verlust. Ein osmotischer Druck wird aufgebaut, weshalb Wasser die Zelle verlässt, was wiederum zur Zellschrumpfung führt (Brugnara et al., 1993; K. S. Lang et al., 2005a; Maher & Kuchel, 2003).

Die Gardos-Kanäle sind auch an der Schrumpfung und Formveränderung desoxygenerter Sichelzellen beteiligt. Gardos-Kanäle können z.B. durch Carbocyaninfarbstoffe (Latorre et al., 1989), Nifedipin (Kaji, 1990), Nitrendipin (Ellory et al., 1992) und mit hoher Spezifität durch Charybdotoxin (ChTX) gehemmt werden (Wolff et al., 1988). Keiner dieser Stoffe konnte aber bislang durch klinische Studien an Patienten mit Sichelzellenanämie getestet werden, da diese entweder eine geringe inhibitorische Wirkung aufweisen oder nicht spezifisch genug sind und somit mit Nebenwirkungen gerechnet werden müsste (Brugnara et al., 1993).

2.3.2.2. Ca²⁺-unabhängiger Signalweg

Im zweiten Signalweg der Eryptose spielen Ceramide eine entscheidende Rolle.

Ceramide entstehen aus Sphingomyelin durch das Enzym Spingomyelinase, welches wiederum von PAF (Platelet-activating factor) aktiviert wird (P. A. Lang et al., 2005d). PAF wird von Erythrozyten freigesetzt, wenn es zur osmotisch bedingten Zellschrumpfung kommt (P. A. Lang et al., 2005d).

Der genaue Ablauf des zweiten Signalwegs ist noch nicht definitiv geklärt, doch ist mittlerweile bekannt, dass Ceramide die Sensibilität von Erythrozyten auf Ca²⁺-Konzentrationen erhöhen (K. S. Lang et al., 2004).

2.3.4 Inhibitoren der Eryptose

Tritt die Eryptose in gehäufte und somit pathologische Form im Körperkreislauf auf, treten Krankheiten, unter anderem Anämien, auf. Daher gibt es den Forschungsansatz, diese Krankheiten mithilfe auf die Eryptose inhibitorisch wirkender Stoffe zu behandeln. Einer der wichtigsten Vertreter dieser Inhibitoren ist das Glykoprotein-Hormon Erythropoetin (EPO).

2.3.4.1 Erythropoetin

Das Hormon EPO ist ein wichtiger Wachstumsfaktor während der Proliferation und Differenzierung roter Blutkörperchen, welches hauptsächlich in den Nieren synthetisiert wird.

Wird der Körper nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt, zum Beispiel aufgrund einer Blutarmut, so wird EPO vermehrt ausgeschüttet. Es wirkt auf die Bildung roter Blutkörperchen ein, indem es an Stammzellen bindet, weshalb diese sich zu Erythrozyten differenzieren. EPO wirkt inhibierend auf die Eryptose, indem es die Ca^{2+} -Kanäle inhibiert und somit den Kalziumstrom in die Zelle unterbindet (Myssina et al., 2003).

Die Verabreichung von EPO an Patienten mittels Dialyseverfahren verringerte so den Anteil an zirkulierenden eryptotischen Erythrozyten (Myssina et al., 2003). Somit hat der Körper mehr rote Blutkörperchen für den Sauerstofftransport zur Verfügung.

2.3.4.2 Weiter bekannte Inhibitoren der Eryptose

Neben Erythropoetin (EPO) existieren weitere Inhibitoren der Eryptose. Zu diesen gehören Stickstoffmonoxid (NO), welches zur Vasodilatation führt, sowie Coffein (Floride et al., 2008), Adenosin (Niemoeller et al., 2007) und Katecholamine (P. A. Lang et al., 2005b).

2.3.5 Trigger der Eryptose

Neben den zuvor genannten zellulären Auslösern der Eryptose wie erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Aktivität, osmotischer Schock, oxidativer Stress, Energiemangel, Hyperthermie sowie endogene Substanzen und Ceramid, gibt es auch chemische Stimuli, welche den suizidalen Zelltod von Erythrozyten triggern können.

Das Prostaglandin E₂ (P. A. Lang et al., 2005c), Gold (Sopjani et al., 2008), Aluminium (Niemoeller et al., 2006) und Retinsäure (Niemoeller et al., 2008) gehören zu diesen Triggern. Auch Peptide wie Dermaseptin lösen die Eryptose aus (Abed et al., 2013).

2.3.6 Caspasen

In kernhaltigen Zellen spielen die Caspasen eine entscheidende Rolle beim suizidalen Zelltod. Auch in Erythrozyten finden sich trotz fehlendem Zellkern die Caspasen 3 und 8.

Gealterte Erythrozyten enthalten diese beiden Caspasen in größeren Mengen (Mandal et al., 2005)

Caspase-8 ist eine Initiatorcaspase, deren Funktion vor allem von EPO inhibiert wird. Durch die Aktivierung der Caspase-3, fördert diese weitere zelluläre Vorgänge, weshalb der asymmetrische Aufbau der Zellmembran nicht mehr aufrecht erhalten wird. Dabei wird die Aminophospholipidtranslokase APLT gehemmt (Mandal et al., 2005).

2.3.7 Medizinische Bedeutung von Eryptose

Eryptose wird seit einiger Zeit eine wichtige Rolle bei einigen Krankheiten zugeschrieben. So reagieren die roten Blutkörperchen von Patienten die unter Sichelzellenanämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel oder Thalassämie leiden, in hohem Maße empfindlich auf oxidativen Stress, Glukoseentzug oder osmotischen Schock. Die dabei induzierte Eryptose zieht eine deutlich verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten mit sich.

Dabei zeigt sich in vivo, dass die Eryptose früher als die Hämolyse einsetzt und sie damit verhindert. Dabei können systemische Komplikationen der Hämolyse wie die Verbrauchskoagulopathie bzw. DIC (disseminated intravascular

coagulation) oder Nephrotoxine verhindert werden und so Kreislauf und Niere schützen. Klinisch zeigt sich jedoch, dass durch eine gesteigerte Eryptose und den damit verbundenen Zellverlust eine hämolytische Anämie entwickelt, diese aber nicht von der herkömmlichen Hämolyse resultiert.

Zu den oben genannten Krankheitsbildern bei denen eine erhöhte Eryptoserate auftritt zählen auch die Eisenmangelanämie (Kempe et al., 2006) und der Phosphatmangel (Birka et al., 2004). Aber auch Schwermetallvergiftungen mit Blei oder Quecksilber bringen eine erhöhte Eryptoserate mit sich (Eisele et al., 2006; Kempe et al., 2005).

Auch die Gabe von Medikamenten wie Chlorpromazin und Paclitaxel können als Nebenwirkung eine erhöhte Eryptoserate und die daraus resultierende hämolytische Anämie mit sich bringen (Akel et al., 2006; P. A. Lang et al., 2006b).

Anschließend ist noch zu erwähnen, dass phosphatidylserinexponierende Erythrozyten eine deutlich höhere Affinität zur endothelialen Membran besitzen und so leichter an Endothelzellen haften bleiben. Dies führt zu einer Verflechtung eryptotischer Zellen und der daraus resultierenden Endothelschädigung (Gallagher et al., 2003).

Aus diesen Gründen wird der Eryptose eine immer wichtigere Rolle bei der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen und der Beeinträchtigung des physiologischen Ablaufs der Hämostase zugeschrieben (Andrews & Low, 1999). Beispiele hierfür sind Krankheiten wie das Gasser-Syndrom mit Faktor-H Mangel das auch hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) genannt wird (P. A. Lang et al., 2006a), der Diabetes mellitus Typ2 (Nicolay et al., 2006), der Amyloidose wie der Morbus Alzheimer (Nicolay et al., 2007) und die Sepsis (Kempe et al., 2007).

Hier zeigt sich, dass die Eryptose neben der physiologischen Funktion die Erythrozyten vor Hämolyse zu schützen und den Körper so vor pathologischen Reaktionen bewahren soll, in einem überschießenden Maß gleichermaßen wie die Hämolyse einen Krankheitswert annehmen kann und so den Krankheitsverlauf nachteilig beeinflussen kann.

Im Gegenzug kann die Eryptose aber auch positiv auf den Krankheitsverlauf wirken, wie beim parasitären Krankheitserreger Plasmodium falciparum, der zum Stamm der Malaria tropica gehört. Der Parasit nistet sich in Erythrozyten ein und aktiviert Kationenkanäle um ein erhöhtes Nährstoffangebot an Natrium und Kalzium zu erreichen (Foller et al., 2009). Dies bewirkt eine erhöhte Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Membran was somit den infizierten Erythrozyt für Makrophagen kenntlich macht (F. Lang et al., 2012).

Trans-Zimtaldehyd

2.4.1 Geschichte und Vorkommen

Zimt besteht laut Literaturangaben zu 1 bis 8 % aus ätherischen Ölen die aromabestimmend sind. Zimtaldehyd nimmt mit 65-90% dabei den ersten Platz der im Zimt vorkommenden ätherischen Öle ein (He et al., 2005). Zimtaldehyd (Cinnamaldehyde, 3-Phenyl-2-propenal) ist eine intensiv nach Zimt riechende gelbliche, ölige Flüssigkeit. Sie wurde erstmals von Dumas und Péligot aus Zimtöl isoliert und 1856 von Chiozza synthetisiert.

Zymtaldehyd kommt in natürlicher Form im Zimtrindenöl vor, welches durch Wasserdampfdestillation der Rinde, und in geringerer Qualität auch der Blätter, des Zimtbaumes gewonnen wird.

Der trans-Zimtaldehyd kann analog zur Zimtsäure mittels Aldol-Kondensation aus Benzaldehyd und Acetaldehyd hergestellt werden. Zimtaldehyd wird bei Kontakt mit Luft zu Zimtsäure oxidiert. Es ist gegen Wärme, Licht, Alkalien und einige Metalle empfindlich und zeigt die bekannten Aldehyd- und Olefin-Reaktionen.

Da das isomere cis-Zimtaldehyd nur eine geringe Bedeutung hat wird er nicht weiter beschrieben (BfR, 2006).

2.4.2 Strukturformel von trans-Zimtaldehyd

Trans-Zimtaldehyd hat die Summenformel C_9H_8O und gehört zur Stoffgruppe der Phenylpropanoide. Er zählt zu den Aromaten und ist ein α,β -ungesättigter Aldehyd mit einer trans-substituierten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung in der Seitenkette

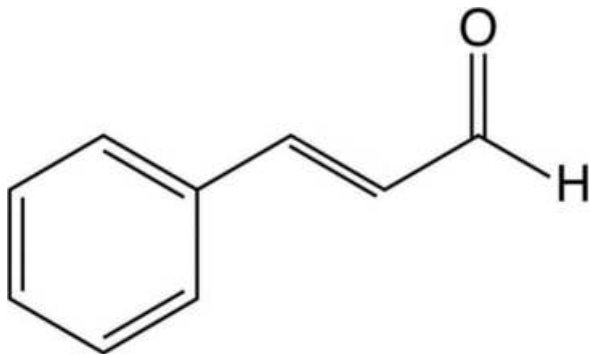


Abbildung 5: Strukturformel von trans-Zimtaldehyd (Xue et al., 2011)

2.4.3 Verwendung in der Industrie und Gesellschaft

Zimt und somit auch Zimtaldehyd ist in unserer Gesellschaft in vielen unterschiedlichen Produkten und Anwendungen anzutreffen. Es wird bereits seit Jahrtausenden als Gewürz in Nahrungsmitteln verwendet. Zimtaldehyd wird seit einigen Jahren auch von der Industrie als Riechstoff in der Parfüm- und Kosmetikherstellung genutzt. Hierzu sollte allerdings erwähnt werden, dass Zimtaldehyd in reiner Form allergen wirken kann (BfR, 2006). Darum wird dem Zimtaldehyd meist Duftstoffe wie Eugenol oder D-Limonen zugefügt und so die sensibilisierenden Eigenschaften von reinem Zimtaldehyd vermindert.

Als Anfärbereagenz in der Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie findet Zimtaldehyd ebenfalls Anwendung. Sowie zur Erkennung von Indol-Derivaten in ethanolisch-salzsaurer Lösung und von Steroid-Sapogeninen in Acetanhydrid-Schwefelsäure.

Auch über eine Wirkung gegen *Coptotermes formosanus*, eine invasive Termitenart, die für die meisten Holzzerstörungen in den Ländern Taiwan, Japan und Teilen der Vereinigten Staaten verantwortlich ist, wird geforscht (Chang & Cheng, 2002).

2.4.4 Eigenschaften von trans-Zimtaldehyd

Auf zellulärer Ebene werden Zimtaldehyd antimutagene (King et al., 2007), antiproliferative (Chao et al., 2010; Gan et al., 2009) , ebenso wie proapoptotische Effekte in vitro (Gan et al., 2009; Wu & Ng, 2007; Zhang et al., 2010) zugeschrieben. Es verlangsamt somit das Tumorwachstum (Gan et al., 2009; Ka et al., 2003).

2.4.4.1 Antimutagene Eigenschaften

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass bestimmte Nahrungsbestandteile einen positiven Effekt auf die Gesundheit und eine Verringerung der Risiken für verschiedene Arten von Krebs haben (DeMarini, 1998; Kennedy, 2006; Key et al., 2004; Serra-Majem et al., 2006). Dabei haben viele untersuchte Nahrungsmittel in Laborstudien antimutagene Eigenschaften aufgewiesen (Ohta, 1993) oder wurden für die Chemoprävention von Krebs angesehen (Brenner & Gescher, 2005). Auch Zimtaldehyd weist diese antimutagene Eigenschaften auf. So konnte bereits festgestellt werden, dass Zimtaldehyd antimutagene Effekte gegen körpereigene Mutationen in Bakterien hat (De Flora et al., 1994; de Silva & Shankel, 1987; Shaughnessy et al., 2001). Aber auch die spontane Mutagenese in menschlichen Dickdarmkrebs-Zellen wird von trans-Zimtaldehyd gehemmt (King et al., 2007).

2.4.4.2 Proapoptotische Eigenschaften

Die proapoptotischen Effekte werden dadurch erreicht, dass trans-Zimtaldehyd CD95, welches ein Rezeptor des extrinsischen Apoptosewegs ist, positiv reguliert (Zhang et al., 2010), für die Depolarisation der Mitochondrien sorgt (Wu et al., 2005; Zhang et al., 2010), und die Genexpression des Bcl-(XL) herunter reguliert (Wu & Ng, 2007). Des Weiteren ist es für die positive Regulation von p53 und Bax-Proteinen zuständig und aktiviert die Caspase-3 und die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP).

Diese zellulären Vorgänge werden durch Phosphorylierung und Aktivierung von sogenannten „mitogen activatet kinases JNK“, „ERK“ und den p38 Kinasen unterstützt (Wu & Ng, 2007; Wu et al., 2005) .

2.4.4.3 Antiproliferative Eigenschaften

Eine Studie, welche herausfinden wollte ob Zimtaldehyd Einfluss auf den Zelltod bei erhöhten intrazellulären Glukosewerten in Fibroblasten der Niere nimmt, zeigte, dass die Zellen weder eine erhöhte Apoptose- noch Nekroserate hatten, sondern sich weniger teilten als Zellen, welche nicht Zimtaldehyden ausgesetzt wurden.

Caspase 3, welche im Zusammenspiel mit anderen Caspasen den Zelltod vermittelt, zeigte keine Veränderung in ihrer Aktivität.

Unter normalen Umständen führen erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentrationen zur Hypertrophie und zur Proliferation der Zellen. Die Fibroblasten, welche durch die Glukosezugabe zu diesen beiden Prozessen stimuliert werden sollten, zeigten eine geringere ERK/JNK/p38 MAPK Aktivität, welchen eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Zellteilung und der Hypertrophie zugeteilt ist. Als Folge der Inhibition dieser zellulären Vorgänge teilten sich die Zellen weniger und waren kleiner als die Vergleichszellkolonien (Chao et al., 2010).

2.4.4.4 Vasodilatatorischer Effekt

Versuche an Aorten von Ratten zeigten, dass Zimtaldehyde vasodilatatorisch wirken. Des Weiteren zeigten die Versuche, dass Zimtaldehyde inhibitorisch auf die phenylephrin-aktivierte Kontraktion der Gefäße wirkt.

Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass Zimtaldehyd auf die Kalzium-Kanäle in der Zellmembran wirkt (Xue et al., 2011).

2.4.4.5 Antimikrobielle Wirkung

Helicobacter pylori ist ein Bakterium, welches eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Magengeschwüren hat und kann sogar das Entstehen von Magenkarzinomen begünstigen. Aus diesem Grund ist das Bakterium Ziel vieler Studien. Unter anderem wurde auch untersucht, ob Eugenol und Zimtaldehyd antimikrobiell auf dieses Bakterium wirken.

Zimtaldehyd wirkte in der genannten in vitro Studie inhibierend auf das Wachstum aller dreißig getesteten *Helicobacter pylori* Stämme. Bemerkenswert ist, dass auch nach zehn Versuchsdurchgängen von den Bakterien keine Resistenz gegen Zimtaldehyd aufgebaut wurde und dass der antimikrobielle Effekt auch bei verschiedenen pH-Werten erzielt wurde (Ali et al., 2005).

3 Ziel der Studie

Wie in Kapitel 2.4.4 bereits erwähnt werden Zimtaldehyd antimutagene, proapoptotische und antiproliferative Eigenschaften zugeschrieben und soll so das Tumorwachstum verlangsamen.

Das Ziel der Studie war herauszufinden, welchen Einfluss trans-Zimtaldehyd auf das Überleben und den programmierten Zelltod der Erythrozyten hat.

Dafür wurden die Zellgröße, das intrazelluläre Kalzium und die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten mit und ohne Einfluss von trans-Zimtaldehyd in Ringerlösung gemessen.

In einem weiteren Versuch wurden zwei verschiedene Ringerlösungen hergestellt, wobei die eine Kalzium enthält, die andere nicht. Damit sollte getestet werden, ob trans-Zimtaldehyd sowohl den kalziumabhängigen, als auch den kalziumunabhängigen Signalweg der Eryptose beeinflusst.

Aufgrund der proapoptotischen Eigenschaften des Zimtaldehyd bei kernhaltigen Zellen, sollte getestet werden, ob diese Effekte auch bei den kernlosen Erythrozyten auftreten.

4 Materialien

4.1 Erythrozyten

Die in der Studie durchgeführten Versuche wurden durch die Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft und genehmigt (184/2003 V). Die Erythrozytenkonzentrate wurden uns freundlicherweise von gesunden, freiwilligen Patienten der Blutbank der Universitätsklinik zu Verfügung gestellt. Eine unterschriebene Einverständniserklärung der Patienten liegt vor.

Für die Herstellung der Erythrozytenkonzentrate wurde 500ml Vollblut mit 70ml CPD-Puffer gemischt und bei 22 °C Raumtemperatur bei 4795g für 10min zentrifugiert. Erythrozyten, Plasma und Buffy Coat wurden so getrennt und in unterschiedliche Beutel abgefüllt. Die Erythrozyten wurden durch eine SAG-M Lösung stabilisiert und durch einen Leukozytenfilter von den restlichen Leukozyten befreit.

Der Leukozytenfilter sowie für die Herstellung der Erythrozytenkonzentrate verwendete OptiPure PC quadruple blood pack set stammen von der Firma Baxter (Unterschleißheim).

Die Erythrozytenkonzentrate wurden bis zur Versuchsdurchführung bei +4°C gelagert.

4.2 Substanzen

4.2.1 Trans-Zimtaldehyd

Für die Experimente wurde der Stoff trans-Zimtaldehyd der Firma Sigma-Aldrich Biochemie GmbH Hamburg verwendet und für die weitere Verwendung in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Zur Herstellung einer Stammlösung von 10mM wurden 1,32mg trans-Zimtaldehyd in 1ml DMSO gelöst.

4.2.2 Annexin V FITC

Annexin V ist ein Mitglied der Annexin-Familie von intrazellulären Proteinen, die an Phosphatidylserin (PS) binden. Phosphatidylserin welches sich fast nur auf dem innen Teil der Membran befindet, wird zu Beginn der Apoptose vermehrt auf die äußere Seite exponiert und dient dort Makrophagen als Signal die Phagozytose einzuleiten (van Engeland et al., 1998).

Um die Menge an Annexin im Durchflusszytometer sichtbar zu machen wurde Annexin mit dem Färbemittel Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Vor Verwendung wurde es mit einem Waschpuffer im Verhältnis 1:200 verdünnt. Das bei den Versuchen verwendete Annexin V FITC stammt von der Firma Roche Deutschland Holding GmbH.

4.2.3 Fluo-3 AM Ester

Fluo-3-Acetoxymethyl Ester ist ein Fluoreszenzindikator von intrazellulärem Kalzium. Fluo-3 AM Ester ist membranpermeabel und kann so in die meisten Zellen eindringen. Es reagiert selbst nicht mit Kalzium, kann aber im Inneren der Zelle durch Esterasen zu freiem Fluo-3 hydrolysiert werden und dann mit Kalzium konjugieren. In diesem Zustand ist die Intensität zu fluoreszieren um ein vierzigfaches zum Ausgangszustand erhöht. Da es in diesem Zustand die Zellmembran nicht mehr durchdringen kann wird sichergestellt das nur intrazelluläres Kalzium zum Messergebniss beiträgt.

Fluo-3 hat ein Absorptionsmaximum von 506nm und ist mit einem 488nm Argon-Ionen-Laser anregbar. Nach Bindung an Kalzium verstärkt sich die Fluoreszenz auf 526nm und kann im FL1-Kanal des FACS-Calibur gemessen werden.

Die Ca^{2+} -Konzentrationen und die Fluoreszenz kann wie folgt bestimmt werden:

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

K_d steht hier für die Dissoziationskonstante der Ca^{2+} -Bindung an Fluo-3 und wird mit im zellfreien Medium mit 450nm angegeben, abhängig von Einflüssen wie Proteinkonzentration und PH Wert.

F= Fluoreszenz des Indikators bei der experimentellen Ca^{2+} -Konzentrationen

F_{min} = Fluoreszenz bei Abwesenheit von Kalzium

F_{max} = Fluoreszenz bei Kalziumsättigung

Das in den Versuchen verwendete Fluo-3 wird von der Firma Calbiochem (Bad Soden) in Pulverform geliefert und anschließend bei Raumtemperatur in DMSO gelöst und bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

4.3 Verwendete Lösungen

4.3.1 CPD-Puffer

Herstellung des Erythrozytenkonzentrats

Tabelle 1: Zusammensetzung des CPD-Puffers

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

4.3.2 SAG-M-Lösung

Zur Stabilisierung der Erythrozyten

Tabelle 2: Zusammensetzung der SAG-M-Lösung

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

4.3.3 Ringerlösung

Die für die Versuche verwendete Ringerlösung weist die selbe Elektrolytkonzentration, Osmolarität sowie den gleichen pH-Wert auf wie das menschliche Blutplasma und wurde daher als Basislösung verwendet.

Der pH-Wert von 7,4 wurde durch Titration mit N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure (HEPES) und 1M Natronlauge erreicht und die Osmolarität von 290 mosmol mit Hilfe eines Dampfdruck-Osmometers geprüft.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Ringerlösung

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mM]</i>	<i>Menge für 1L[g]</i>
CaCl ₂	1	0,111
Glucose	5	0,901
HEPES	32	7,674
H ₂ O		982,798
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
NaCl	125	7,305
NaOH	13	0,541

4.3.4 Annexin Wash Buffer

Mit Hilfe des Annexin Wash Buffer (AWB) wurden die in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 beschriebenen Färbungen im Verhältnis 1:200 verdünnt. Der physiologische pH-Wert von 7,4 wurde mit NaOH und HEPES eingestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Annexin Wash Buffers

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

5 Methoden

5.1 FACS Analyse – Durchflusszytometrie

FACS (fluorescence-activated cell sorting) und die Durchflusszytometrie (Zytometrie=Zell-Vermessung) dienen der Analyse von einzelnen Zellen, die an einem Laserstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge vorbei fließen. Bevor diese den Laserstrahl passieren werden sie über eine kleine Kapillare angesaugt. Dies ermöglicht, dass immer nur eine einzelne Zelle die Zählkammer passiert und vom Laserstrahl getroffen wird. Beim Passieren des Laserstrahls absorbieren die Zellen zunächst die Lichtenergie und erzeugen dann ein spezifisches Streulicht und bei entsprechender Fluoreszenzmakierung auch Fluoreszenzimpulse, die dann von Detektoren ausgewertet werden können.

Das Streulicht, das parallel zur Strahlenrichtung gemessen wird, bezeichnet man als Vorwärtsstreulicht oder „forward scatter“ (FSC) und dient zur Beurteilung der Zellgröße. Je kleiner die Zelle desto kleiner das Vorwärtsstreulicht.

Das seitlich gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht oder „side scatter“ (SSC) bezeichnet mit der man die Zellgranulierung bestimmen kann.

So kann über das Streulicht oder die Fluoreszenzen eine Aussage über Zelltypen, Zellbestandteile oder funktionelle Zelleigenschaften wie Enzymaktivität getroffen werden.

Das FACS-Gerät hat zusätzlich nach den Fluoreszenzdetektoren einen Vibrator mit dem der Flüssigkeitsstrom in kleine Tröpfchen unterteilt wird (hydrodynamische Fokussierung). Durch die Elektrode eines elektrostatischen Sortiermechanismus wird die zu sortierende Zelle umgekehrt polarisiert und fällt durch ein elektrisches Feld in ein anderes Gefäß als nicht zu sortierende Zellen. Das in den Versuchen verwendete Durchflusszytometriegerät ist das FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson (Heidelberg).

5.2 Annexin V-Bindung und Vorwärtsstreulicht (forward scatter)

Als erstes wurden Proben mit je 4µl Erythrozytenkonzentrat und 1ml Ringerlösung angesetzt. Anschließend wurde den Proben 5, 10, 20, 30µM trans-Zimtaldehyd hinzugegeben und für 48h bei 37°C inkubiert. Zur Versuchskontrolle wurde eine Negativprobe angesetzt (ohne Zusatz von trans-Zimtaldehyd).

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 1600rpm und Raumtemperatur (21°C) für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Erythrozyten in der Dunkelkammer für 20 Minuten mit Annexin V angefärbt.

Im FL-1-Kanal des FACS wurde dann mit einer Erregungswellenlänge von 488nm sowie einer Emissionswellenlänge von 530nm der forward scatter gemessen und die Intensität der Annexin V-Fluoreszenz berechnet.

5.3 Messungen des intrazellulären Kalziums

Um das intrazelluläre Kalzium zu messen wurden die Erythrozyten ebenfalls wie in Kapitel 5.1 beschrieben für 48h inkubiert und anschließend bei 1600rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluo-3/AM angereichert (Ringerlösung mit 5mM CaCl₂ und 2µM Fluo-3/AM) und wieder für 20 Minuten in der Dunkelkammer bei 37°C inkubiert und zweimal mit 5mM CaCl₂ enthaltender Ringerlösung gewaschen. Darauf in 200µl Ringer resuspendiert und im FL-1-Kanal des FACS-Caliburs analysiert.

5.4 Messung der Hämolyse

Zur Bestimmung der Hämolyse werden zuerst die Proben wie im Kapitel 5.2. beschriebenen Versuch angesetzt und inkubiert. In einer weiteren Probe wird statt Ringerlösung 1 ml destilliertes Wasser zu den 4µl Erythrozytenkonzentrat hinzugegeben.

Die Proben werden nach der Inkubation zentrifugiert (3 Minuten bei 400 g, Raumtemperatur) und die Überstände abgeschöpft. Als Maß für die Hämolyse wird die Hämoglobinkonzentration des Überstandes bei 405 nm photometrisch auf einem Mikroplattenleser bestimmt. Die Absorption des Überstands von Erythrozyten, die in destilliertem Wasser lysiert wurden ist als 100% Hämolyse definiert.

Dementsprechend wird eine Standardkurve (0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 20% und 100%) durch Verdünnung der lysierten Erythrozyten hergestellt, um den Prozentsatz der Hämolyse in den Proben zu definieren.

5.5 Statistik

Die Werte sind angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Die statischen Analysen wurden unter Verwendung von ANOVA als auch Turey's Test je nach Indikation im Anschluss an die Versuche verwendet. „n“ bezeichnet die Anzahl der Patienten und entspricht den benutzten Erythrozytenkonzentraten. Da jede Erythrozytenprobe unterschiedlich auf die Experimente reagiert wurde bei jedem Versuch ein Kontrollversuch mit derselben Erythrozytenprobe durchgeführt.

6 Ergebnisse

Die in Kapitel 5 „Methoden“ beschriebenen Versuche sollen einerseits den stimulierenden Einfluss von trans-Zimtaldehyd auf den suizidalen Zelltod von Erythrozyten nachweisen, des Weiteren sollen die Mechanismen geklärt werden, über welche trans-Zimtaldehyd die Eryptose auslöst.

6.1 Messung des intrazellulären Kalziums

Bei den ersten Versuchen (Abbildung 6 und 7) wurde die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der Erythrozyten nach 48h Inkubation mit und ohne Einfluss von trans-Zimtaldehyd gemessen und die Fluo-3-AM Fluoreszenz mit Hilfe des FACS-Calibur bestimmt. Mit Hilfe der Fluo-3-Fluoreszenz überprüft man den kalziumvermittelten Signalweg der Eryptose, wobei eine höhere Fluo3-Fluoreszenz eine höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen anzeigt.

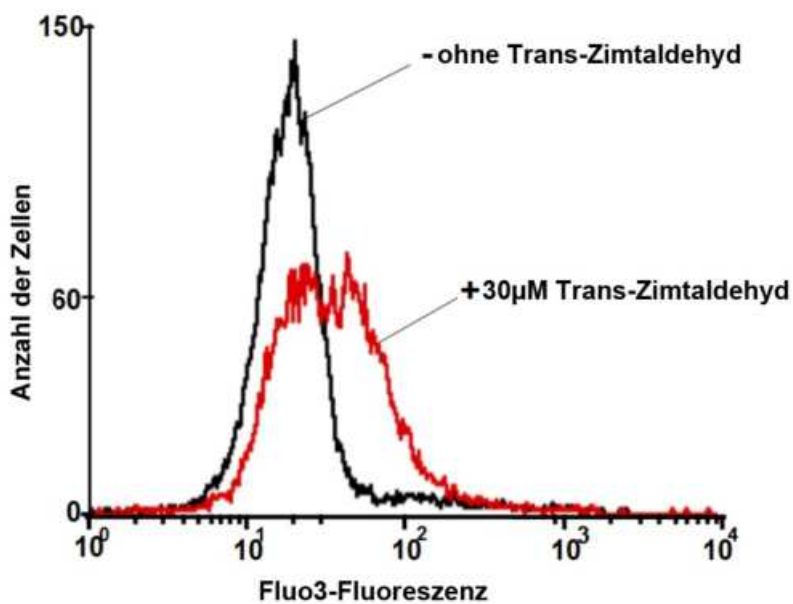


Abbildung 6: Original Histogramm – Messung des intrazellulären Kalziums +/- 30 µM trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)

Original Histogramm: Fluo3 Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48h Inkubation in Ringerlösung mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) die Einwirkung von 30µM trans-Zimtaldehyd.

In Abbildung 6 wird ersichtlich, dass die Fluo3-Fluoreszenz durch die Zugabe von 30 µM trans-Zimtaldehyd (rote Linie) im Gegensatz zur Negativkontrolle ohne Zugabe von Zimtaldehyd (schwarze Linie) ansteigt und somit trans-Zimtaldehyd zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führt.

Diese Daten lassen annehmen, dass trans-Zimtaldehyd die Eryptose über den kalziumabhängigen Signalweg initiiert. Diese Annahme soll mit den weiteren Versuchen überprüft werden.

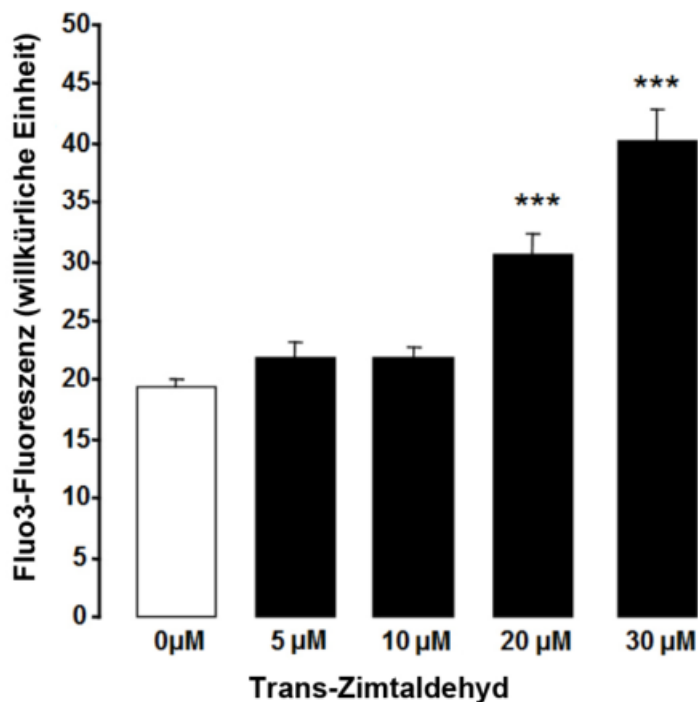


Abbildung 7: Messung des intrazellulären Kalziums in Ringerlösung unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 µM trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=10) der Fluo3 Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48h in Ringerlösung ohne (weiser Balken) und mit Einwirkung von 5, 10, 20, 30 µM trans-Zimtaldehyd (schwarze Balken).

Toxikologische Forschung ist immer abhängig von der Konzentration der untersuchten Medikamente. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung von trans-Zimtaldehyd auf die Fluo3-Fluoreszenz nicht nur mit der Höchstkonzentration von 30 µM (Abbildung 6) gemessen, sondern auch mit niedrigeren Konzentrationen (Abbildung 7).

In Abbildung 7 wird genauer dargestellt, wie die Fluo3-Fluoreszenz und somit der intrazelluläre Kalziumgehalt von der Konzentration von trans-Zimtaldehyd abhängt. Man sieht, dass bei Zunahme der Konzentration die Fluo3-Fluoreszenz ansteigt, wobei sie bei 5 µM und 10 µM noch nicht signifikant erhöht wird, sondern erst bei 20 µM eine statistische Signifikanz erreicht wird.

6.2 Forward Scatter

Bei einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wie in Kapitel 6.1 beschrieben, kommt es zur Aktivierung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen. Durch Kaliumausstrom aus der Zelle entsteht ein osmotischer Gradient, der zu einem Wasseraustritt führt und die Zelle schrumpfen lässt.

Zellschrumpfung ist wie in Kapitel 2.3.1. „Grundlagen der Eryptose“ ein wichtiges Kennzeichen der Eryptose. Schrumpfen Zellen, so verändert sich das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter), welches im FACS-Gerät gemessen werden kann. Umso mehr die Zelle schrumpft, desto mehr nimmt das Vorwärtsstreulicht ab.

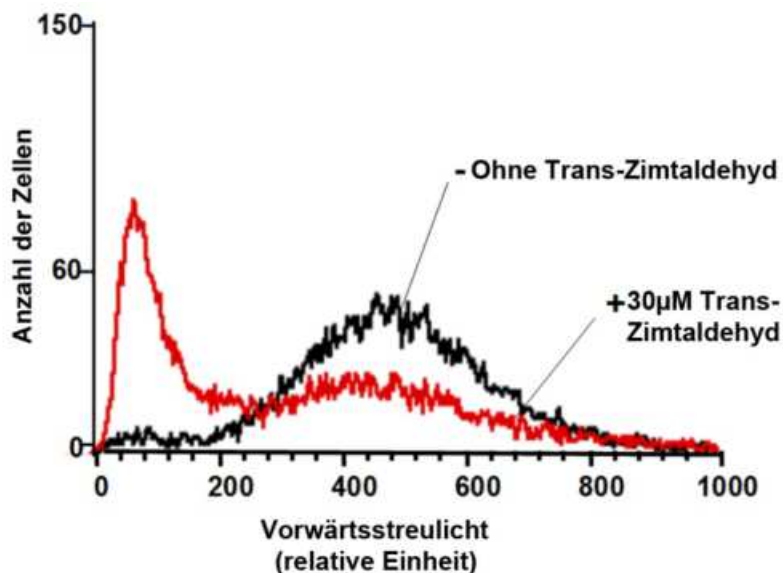


Abbildung 8: Original Histogramm – Messung des Vorwärtsstreulichts +/- 30 µM trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)

Original Histogramm: Vorwärtsstreulicht der Erythrozyten nach 48h Inkubation in Ringerlösung mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) die Einwirkung von 30µM trans-Zimtaldehyd.

Forward Scatter hat keine definierte Einheit und liefert somit nur über Vergleiche mit Kontrollproben qualitative statt quantitative Aussagen.

Vergleicht man die Kurve mit trans-Zimtaldehyd (rote Linie) mit der Kurve ohne trans-Zimtaldehyd (schwarze Linie), so erkennt man eine Abnahme des Forward Scatter.

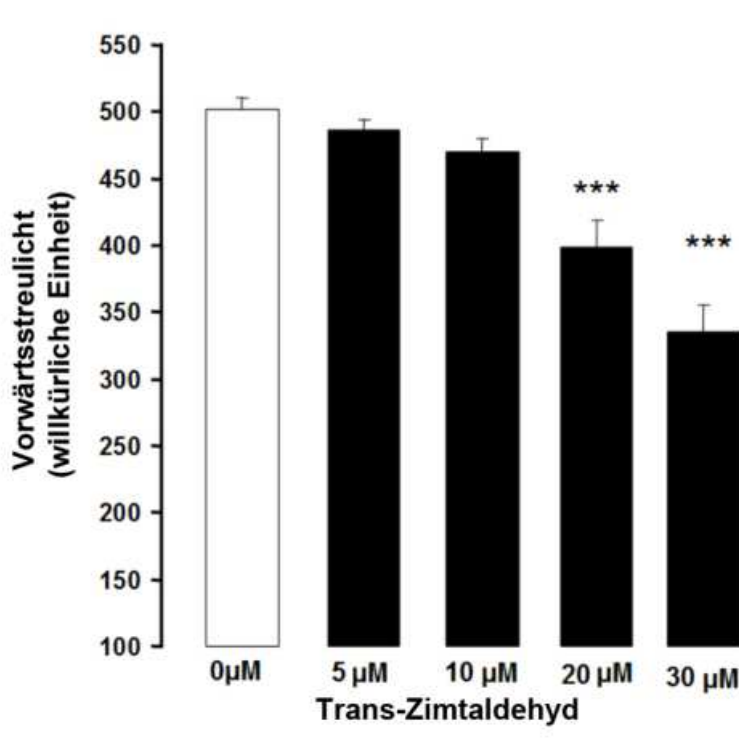


Abbildung 9: Messung des Vorwärtsstreulichts in Ringerlösung unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 μM trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=10) des Vorwärtsstreulichts nach Inkubation der Erythrozyten für 48h in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Einwirkung von 5, 10, 20, 30 μM trans-Zimtaldehyd (schwarze Balken).

In der Abbildung 9 ist eine deutliche Abnahme des Forward Scatter nach 48h Inkubation der Erythrozyten in Ringerlösung mit Einwirkung von 5, 10, 20, 30 μM trans-Zimtaldehyd (schwarze Balken) im Vergleich zur Messung ohne trans-Zimtaldehyd (weißer Balken) zu sehen.

Eine statistische Signifikanz ist dabei ab 20 μM trans-Zimtaldehyd zu erkennen. Die Verringerung des Vorwärtsstreulichts lässt auf eine Zellschrumpfung nach Einwirkung von trans-Zimtaldehyd auf Erythrozyten schließen.

6.3 Annexin V Bindung

Durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen wird die Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Zellmembran stimuliert.

Phosphatidylserin wird an der Zellmembranaußenseite von Rezeptoren der Makrophagen erkannt und die Zelle phagozytiert.

Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Membran. So können mit Annexin V markierte erythrozytische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

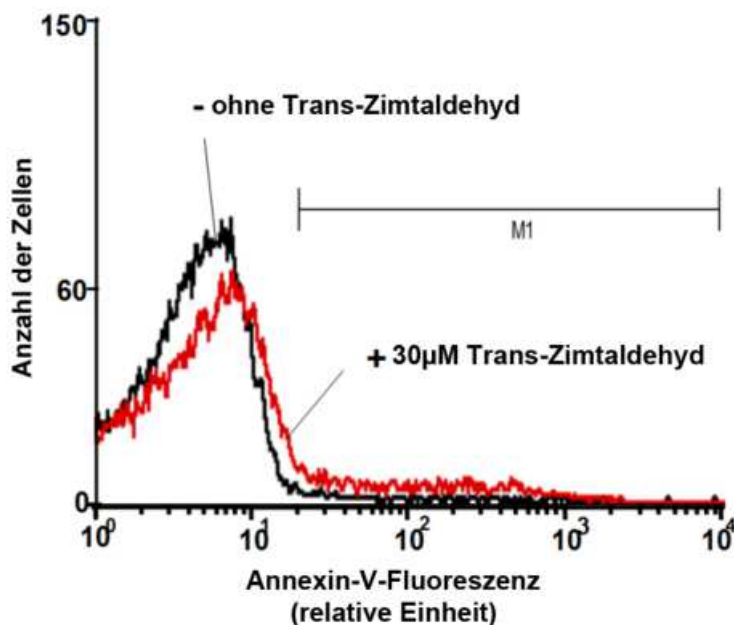


Abbildung 10: Original Histogramm – Annexin V Bindung in Ringerlösung \pm 30 μM trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)

Original Histogramm: Annexin V Bindung der Erythrozyten nach 48h Inkubation in Ringerlösung mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) die Einwirkung von 30 μM trans-Zimtaldehyd.

Vergleicht man die in Abbildung 10 dargestellte Annexin-V-Fluoreszenz bei 30 μM trans-Zimtaldehyd (rote Linie) mit der Annexin-V-Fluoreszenz ohne trans-Zimtaldehyd (schwarze Linie), so erkennt man, dass diese bei Zugabe von trans-Zimtaldehyd gesteigert ist.

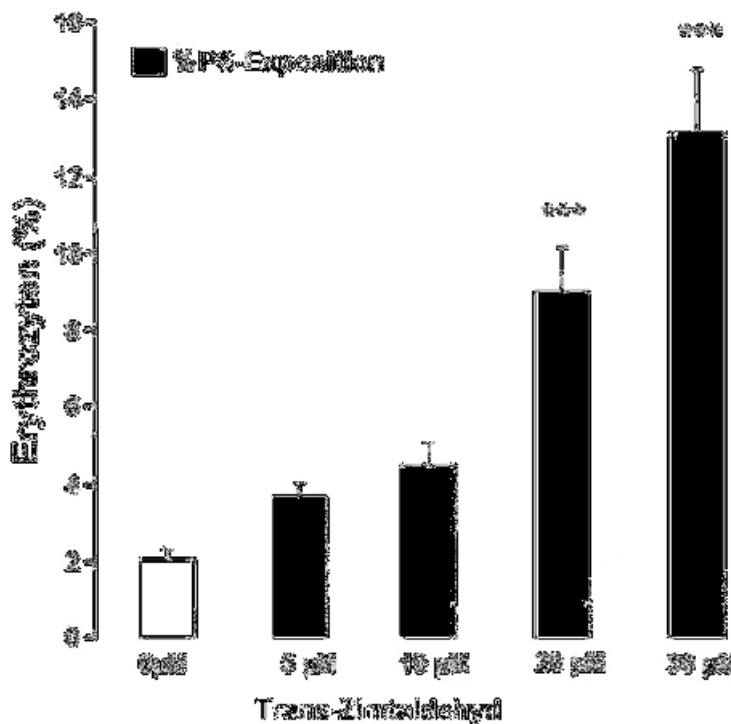


Abbildung 11: Messung der Annexin V Bindung in Ringerlösung unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 µM trans-Zimtaldehyd (Theurer et al., 2013)

Arithmetisches Mittel ± SEM (n=10) der Annexin V Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48h in Ringerlösung ohne (weiser Balken) und mit Einwirkung von 5, 10, 20, 30 µM trans-Zimtaldehyd (schwarze Balken).

Im Versuch des Kapitels 5.2 „Annexin V Bindung“ soll gezeigt werden, wie viele der gemessenen Zellen Phosphatidylserin auf der Außenseite ihrer Membran in Abhängigkeit der trans-Zimtaldehyd-Konzentration exprimieren und somit eryptotisch sind.

Abbildung 11 zeigt, dass der Anteil der PS-exprimierenden Zellen unter Einwirkung von trans-Zimtaldehyd mit steigender Konzentration zunimmt.

Während die PS-Exposition bei 5 µM und 10 µM trans-Zimtaldehyd jeweils nur gering ansteigt, steigt diese bei 20 µM und 30 µM deutlich an.

Eine statistische Signifikanz ist ab 20 µM trans-Zimtaldehyd zu erkennen. Bei 30 µM exprimieren $13,24 \pm 6,59\%$ der Zellen Phosphatidylserin.

6.4 Hämolyse

Nachdem in den vorigen Experimenten bewiesen wurde, dass Zimtaldehyd zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und somit zur Zellschrumpfung und zur erhöhten Phosphatidylexposition, welche in Verbindung mit dem programmierten Zelltod stehen, führt, wurden weitere Versuche durchgeführt um festzustellen, ob sich Zimtaldehyd auch auf die Hämolyse auswirkt.

Bei der Hämolyse tritt aufgrund der Zerstörung der Zellmembran Hämoglobin in das Plasma, weshalb im Versuch der Anteil der hämolysierten Erythrozyten mithilfe des Hämoglobingehalts im Überstand bestimmt wurde.

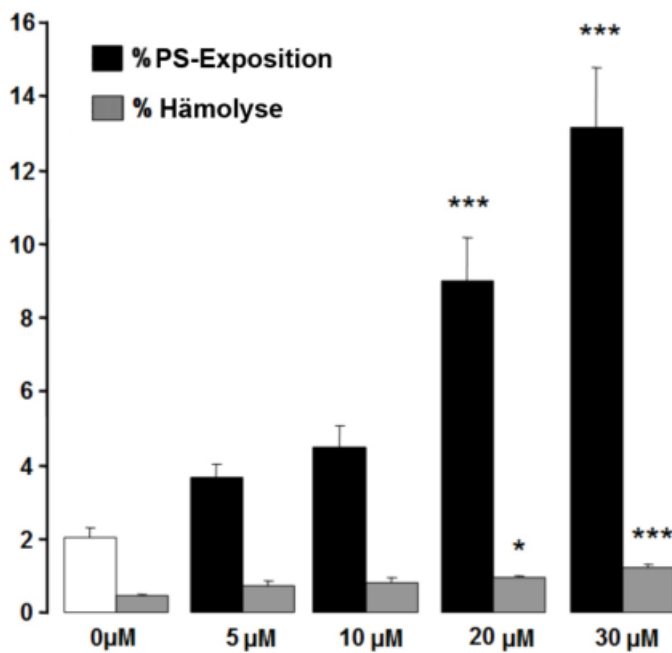


Abbildung 12: Messung der Hämolyse unter Einwirkung von 0, 5, 10, 20, 30 µM trans-Zimtaldehyd (graue Balken) (Theurer et al., 2013)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=4) der Hämolyse nach Inkubation der Erythrozyten für 48h in Ringerlösung mit Einwirkung von trans-Zimtaldehyd zeigt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von trans-Zimtaldehyd (graue Balken). Im Vergleich die PS-Exposition (schwarze Balken) aus Abbildung 11.

Während die Zellen, welche Phosphatidylserin exprimieren (schwarze Balken) bereits bei 5 μM trans-Zimtaldehyd auf $3,80 \pm 1,74\%$ ansteigen, bleiben die durch Hämolyse zugrunde gegangenen Zellen (graue Balken) auch bei 30 μM unter 2%.

Generell blieb die Anzahl der hämolysierten Erythrozyten um eine Zehnerpotenz kleiner als der Anteil der phosphatidylserin-darstellenden Zellen.

Wie aus Abbildung 12 zu lesen ist, findet sich bei Einwirkung von 20 μM trans-Zimtaldehyd für 48 Stunden eine statistische Signifikanz.

Trans-Zimtaldehyd steigert somit den Zelltod von Erythrozyten hauptsächlich durch Steigerung der Eryptose statt durch Hämolyse.

6.5 Annexin V Bindung unter Entzug von Kalzium

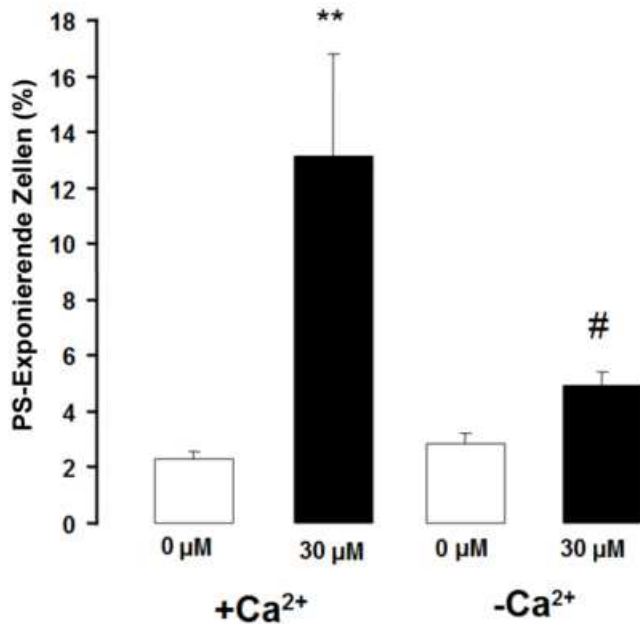


Abbildung 13: Wirkung von Kalziumentzug auf trans-Zimtaldehyd induzierte Annexin V Bindung (Theurer et al., 2013)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=6) des Prozentsatzes der Annexin V Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48h in Ringerlösung ohne (weiser Balken) und mit Einwirkung 30 μ M trans-Zimtaldehyd (schwarze Balken). Links in Gegenwart und rechts in Abwesenheit von Kalzium.

Wie in Kapitel 6.3 „Annexin V Bindung“ erklärt wird, führt eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zur Phosphatidylserinexposition und somit zur Eryptose.

Durch den in Kapitel 6.3 gezeigten Anstieg der PS-Exposition und somit der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen nach der 48 Stunden langen Einwirkung des trans-Zimtaldehyd auf die Erythrozyten liegt die Vermutung nahe, dass Zimtaldehyd durch das Öffnen von Kalziumkanälen Eryptose auslöst.

Um diese These zu überprüfen wurden Erythrozyten 20 μ M trans-Zimtaldehyd für 48 Stunden ausgesetzt, wobei eine vollständige Abwesenheit extrazellulären Kalziums für die Versuchsdurchführung angestrebt wurde, sodass selbst bei geöffneten Kalziumkanälen kein weiteres Kalzium in die Zelle strömen kann.

Anschließend wurden wie in Versuch 6.3. „Annexin V Bindung“ die Anzahl der Zellen ermittelt, welche PS-darstellend sind.

Abbildung 13 zeigt, dass ohne extrazelluläres Kalzium die Wirkung des Zimtaldehyds bedeutend schwächer ausfällt. Die Phosphatidylserinexposition sinkt von $13,15 \pm 6,08\%$ auf $4,71 \pm 1,29\%$.

Es lässt sich somit folgern, dass sich trans-Zimtaldehyd, zumindest zum Großteil über die Aktivierung von Kalziumkanälen auf den programmierten Zelltod von Erythrozyten auswirkt. Auch hier wurden Kontrollproben (weiße Balken) angefertigt um die erhöhte Annexin V Bindung unter Einfluss von trans-Zimtaldehyd zu veranschaulichen.

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Versuchsabläufe

Die für diese Dissertation durchgeführten Versuche fanden alle *in vitro* statt, *in vivo* Versuche wurden nicht durchgeführt.

Um den Versuchen dennoch Aussagekraft für medizinische Zwecke zu geben, wurden möglichst physiologische Bedingungen geschaffen.

Mit diesem Ziel vor Augen wurde die Osmolarität durch ein Osmometer mit einer geeichten Stammlösung auf 290 mosmol überprüft.

Alle Lösungen wurden titriert um einen physiologischen pH von 7,4 für die Versuche zu erhalten. Dieser pH-Wert wurde auch während der Durchführung der Versuche immer wieder kontrolliert.

Die Proben wurden unter der Sterilbank hergestellt, um einer Verunreinigung vorzubeugen. Leichte Verunreinigungen sind dennoch nicht komplett auszuschließen.

Auch die Temperatur wurde an physiologische Bedingungen angepasst. Somit wurden die Proben während der kompletten Inkubationszeit im Inkubator bei 37°C aufbewahrt.

Bis zum Versuchsbeginn wurden die von der Tübinger Blutbank zur Verfügung gestellten Erythrozytenkonzentrate bei +4°C gelagert. Die Erythrozytenkonzentrate wurden täglich frisch geliefert.

Die anderen für die Versuche benötigten Substanzen und Chemikalien wurden gemäß der Herstellerangaben gelagert und verarbeitet um auch hier Fehlerquellen auszuschließen.

Die Versuche wurden mit jeweils vier verschiedenen Proben durchgeführt um falschen Ergebnissen aufgrund von Blutgruppen oder anderen Abweichungen vorzubeugen. Die Versuche an den verschiedenen Proben zeigten, dass die Blutgruppen für die Wirkung des trans-Zimtaldehyd unbedeutend sind und somit man nicht blutgruppenspezifisch sondern allgemein von den Auswirkungen des trans-Zimtaldehyd auf die Erythrozyten sprechen kann.

Des Weiteren wurden alle Versuche mehrmals durchgeführt und die Messwerte anschließend gemittelt um Messfehler auszugleichen.

Bei der Planung wurde somit darauf Acht gegeben, die Relevanz der Versuche für medizinische Zwecke nicht einzuschränken.

Dennoch lohnt es sich, die Versuchsabläufe kritisch zu hinterfragen. Wie zuvor erwähnt wurden die Versuche nur in vitro durchgeführt. Ob unter den komplexen Bedingungen des Körpers nicht noch andere Auswirkungen auftreten können, lässt sich anhand der Versuche im Labor nicht eindeutig beweisen. Schließlich werden die Erythrozyten im Körper wechselnden chemischen, thermischen und physikalischen Einflüssen ausgesetzt. Diese zusätzlichen Einflüsse könnten die Auswirkungen des Zimtaldehyds auf die Erythrozyten verändern.

Des Weiteren wurden alle Versuche nur 48 Stunden inkubiert. Erythrozyten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von 120 Tagen. In dieser Zeit akkumulieren die Einflüsse, welchen sie ausgesetzt sind. Es kann somit keine Aussage darüber gemacht werden, wie sich eine langfristige, bzw. wiederkehrende Behandlung mit Zimtaldehyd auf die Erythrozyten im menschlichen Körper auswirken würde.

Bei den Versuchen wurden Negativproben, welche nur das Erythrozytenkonzentrat und die Ringer-Lösung enthielten, hergestellt um auszuschließen, dass die Ringer-Lösung verunreinigt, beziehungsweise die Erythrozyten durch äußere Einflüsse geschädigt wurden und somit die Ergebnisse verfälscht wurden, durchgeführt. Es wurden jedoch keine Proben,

welche nur das Lösungsmittel DMSO enthalten hergestellt. DMSO hat in höheren Konzentrationen Einfluss auf die Lebensdauer von Erythrozyten. Des Weiteren ist DMSO lichtempfindlich. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass ein kleiner Teil der gemessenen Eryptose und Hämolyse dem Lösungsmittel DMSO zuzuschreiben ist.

Mittlerweile werden am physiologischen Institut daher bei jeder Versuchsreihe neben den Negativproben auch Proben angesetzt, welche nur das Erythrozytenkonzentrat, die Ringerlösung und das Lösungsmittel enthalten.

7.2 Diskussion Ergebnissteil

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass trans-Zimtaldehyd auf Zellvorgänge, welche in Verbindung mit dem programmierten Zelltod von Erythrozyten stehen, der Eryptose, Einfluss nimmt.

Die Parameter, welche getestet wurden, lauten wie folgt: FACS-Analyse der Annexin-V-Bindung, Messung des intrazellulären Kalziumspiegels und Messung der Hämolyse.

Beim Testen all dieser Parameter zeigte sich ab einer Konzentration von 20 μM bei einer Behandlungsdauer von 48 Stunden eine statistisch signifikante Auswirkung auf die oben genannten Zellvorgänge.

Die Experimente zeigen, dass trans-Zimtaldehyd den intrazellulären Kalziumspiegel, die PS-Darstellung und die Hämolyse-Rate ansteigen lässt.

Folglich begünstigt trans-Zimtaldehyd die Eryptose.

Übermäßiges Auftreten der Eryptose kann, wie im Kapitel 1 bereits erwähnt, zur Anämie führen. Des Weiteren tendieren Erythrozyten, welche aufgrund der Eryptose mehr Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran darstellen, vermehrt dazu an Gefäßwänden zu haften (Quelle Andrews and Low 1999), was zu Verklumpung und folglich zum Verschluss von kleinen Gefäßen führen kann (Chung et al., 2007).

Auch die Gefäßwände selbst können durch die Verklumpung der Erythrozyten beschädigt werden. Obwohl durch die lediglich in vitro stattgefundenen Versuche keine Aussage über die Konzentrationen von trans-Zimtaldehyd, welche im menschlichen Körper diese Nebenwirkungen verursachen würden gemacht werden kann, besteht dennoch aufgrund der Versuchsergebnisse Grund zur Annahme, dass die Auswirkungen von trans-Zimtaldehyd auf den programmierten Zelltod von Erythrozyten dessen Nutzen als Medikament einschränken.

Durch den Versuch in Kapitel 6.5: „PS-Darstellung unter Kalziumentzug“ konnte bestätigt werden, dass trans-Zimtaldehyd im Bezug auf Eryptose zum Großteil über die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen durch das Öffnen von Kationenkanälen wirkt.

Die Erforschung der Ionenkanäle in Erythrozyten, besonders deren molekulare Beschaffenheit, ist noch nicht weit genug fortgeschritten um genaue Erklärungen für die Wirkung des trans-Zimtaldehyd zu bieten, doch die Vermutung liegt nahe, dass trans-Zimtaldehyd die nicht-selektiven Kationenkanäle der Erythrozytenmembran aktiviert und somit den Kalziumeinstrom nach intrazellulär ermöglicht indem es den TRPC6 (transient receptor potential channel) beeinflusst (Brand et al., 2003).

Auf den zuvor beschriebenen Einstrom von Kalziumionen und der damit einhergehenden erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen im Zellinneren folgt die Aktivierung kalzium-abhängiger Kaliumkanäle (Bookchin et al., 1987; Brugnara et al., 1993).

Aufgrund des chemischen Gradienten der Kaliumionen verlässt Kaliumchlorid (KCl) die Zelle.

Durch den Ausstrom des Kalium hyperpolarisiert das Membranpotential und aufgrund des nun veränderten osmotischen Drucks verliert die Zelle Wasser. Das Zellvolumen nimmt ab, die Zelle schrumpft. Die im Versuch FSC Kapitel 6.3 gemessenen Werte, welche auf das Schrumpfen des Zellvolumens deuten, lassen sich also als indirekte Folge der Auswirkung des trans-Zimtaldehyd auf die Kationenkanäle der Erythrozyten erklären.

Eine weitere indirekte Folge des trans-Zimtaldehyd ist die durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen ausgelöste Hämolyse, bei der durch das Umlagern von Phospholipiden an der Zellmembran Häm aus der Zelle austritt. Des Weiteren steigt dabei die Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenmembran, weshalb auch die Messwerte dieser Versuche durch die Wirkung des trans-Zimtaldehyd auf die Kationenkanäle der Erythrozyten erklärt werden können.

Viele Krankheiten begünstigen ein verstärktes Auftreten der Eryptose. Zu diesen gehören Diabetes (Nicolay et al., 2006), Eisenmangelanämie (Kempe et al., 2006), Phosphatmangel (Birka et al., 2004), Sichelzellanämie (P. A. Lang et al., 2009), HUS (P. A. Lang et al., 2006a), Sepsis (Kempe et al., 2007) und Malaria (Foller et al., 2009). In vitro Versuche haben gezeigt, dass sich trans-Zimtaldehyd negativ auf das Wachstum von Tumoren auswirken. Des Weiteren finden derzeit Studien statt, welche untersuchen, ob sich Zimtaldehyd als Diabetesmedikament eignet. Auch die bereits erwähnten Studien von Ali et al. im Jahr 2005, welche bei allen dreißig getesteten *Helicobacter pylori* Stämmen eine antimikrobielle, wachstumshemmende Wirkung unabhängig vom pH-Wert und ohne Ausbildung von Resistenzen durch Zimtaldehyd nachweisen, geben Anlass zur weiteren Forschung (Ali et al., 2005).

Sollten sich Zimtaldehyde aufgrund weiterer Nachforschung in den eben genannten Feldern als Therapiemöglichkeit etablieren, so kann aufgrund des Einflusses des trans-Zimtaldehyd auf die Eryptose vor allem bei Patienten, welche durch die oben genannten Krankheiten bereits an verstärkt auftretender Eryptose leiden, eine medikamentöse Therapie mit trans-Zimtaldehyd dennoch kontraindiziert sein. Um diese These jedoch genau zu bestätigen und das exakte Ausmaß der Auswirkung des trans-Zimtaldehyd auf die Eryptose im menschlichen Körper zu zeigen sind in vivo Versuche erforderlich. Dennoch konnten die durchgeführten in vitro Versuche bestätigen, dass trans-Zimtaldehyd in menschlichen Erythrozyten durch das Aktivieren von Kationenkanälen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen steigert, zu Umlagerung von Phospholipiden der Zellmembran und so zum Erscheinen von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche führt. Die darauf folgende Zellschrumpfung zieht somit die Eryptose nach sich.

8 Zusammenfassung

Kernhaltige Zellen sind in der Lage einen programmierten Zelltod, die Apoptose, durchzuführen. Aber auch die kernlosen Zellen wie die Erythrozyten können einen programmierten Zelltod erfahren, die Eryptose.

Dabei kann die Eryptose durch bestimmte Substanzen beeinflusst werden. So gehören zum Beispiel Stickstoffmonoxid, Coffein oder Katecholamine zu den Inhibitoren der Eryptose. Während hingegen Prostaglandin E₂, Gold oder Retinsäure die Eryptose triggern.

In dieser Studie soll der Einfluss von trans-Zimtaldehyd auf die Eryptose erforscht werden.

Wichtige Merkmale für die Eryptose sind die erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen und die daraus resultierende Zellschrumpfung, sowie die Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Erythrozytenmembran.

Mit Hilfe von FITC-konjugiertem Annexin V, kann die Phosphatidylserinexposition, und die Aktivität der erythrozytären Scramblase durchflusszytometrisch gemessen werden. Trans-Zimtaldehyd führt hier zu einer erhöhten Phosphatidylserinexposition an die Außenseite der Erythrozyten.

Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wurde mit Hilfe von Fluo-3/AM gemessen. Der Anstieg von intrazellulärem Kalzium zieht eine Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle mit sich, was zu einem Kaliumausstrom führt.

Der so entstehende osmotische Gradient hat ein Ausströmen von Wasser zur Folge, was die Zelle schrumpfen lässt. Das Schrumpfen der Zelle wird durch das Forward Scatter (FSC) im Durchflusszytometer bestimmt.

Um die These zu überprüfen das trans-Zimtaldehyd durch das Öffnen von Kalziumkanälen Eryptose auslöst, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dabei wurden Erythrozyten mit 20µM trans-Zimtaldehyd ausgesetzt bei einer vollständigen Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium in der Versuchsdurchführung. Die Phosphatidylserinexposition fiel dabei signifikant schwächer aus.

Die Ergebnisse belegen damit das trans-Zimtaldehyd durch erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und die daraus resultierende Zellschrumpfung, sowie die Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Erythrozytenmembran, Eryptose auslöst.

Diese Ergebnisse sind jedoch noch weit von einer klinischen Anwendung entfernt.

Um dieses Ziel zu erreichen müssen noch viele Studien abgeschlossen werden. Man kann die hier erbrachten in vitro Experimente nicht einfach auf einen komplexen Organismus wie den Menschen übertragen. Somit sind in vivo Experimente erforderlich.

Des Weiteren muss, um trans-Zimtaldehyd zum Wohle von Patienten einsetzen zu können, genau erforscht werden, welche Konzentrationen in vivo den jeweils gewünschten Effekt erzielen.

Trotz des weiten Weges, welcher bis zur klinischen Anwendung von trans-Zimtaldehyd noch vor uns liegt, war diese Studie ein wichtiger Schritt um eines Tages trans-Zimtaldehyd bei der Behandlung von Krankheiten verwenden zu können.

9 Literaturverzeichnis

- Abed, M., Zoubi, K. A., Theurer, M., & Lang, F. (2013). Effect of dermaseptin on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 113(5), 347-352.
- Akel, A., Hermle, T., Niemoeller, O. M., Kempe, D. S., Lang, P. A., Attanasio, P., . . . Lang, F. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol*, 532(1-2), 11-17.
- Ali, S. M., Khan, A. A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K. S., Polasa, H., . . . Ahmed, N. (2005). Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 4, 20.
- Andrews, D. A., & Low, P. S. (1999). Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol*, 6(2), 76-82.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
- Bajwa, N., Liao, C., & Nikolovska-Coleska, Z. (2012). Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 22(1), 37-55.
- Beaumont, C., & Canonne-Hergaux, F. (2005). [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfus Clin Biol*, 12(2), 123-130.
- Berg, C. P., Engels, I. H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S. F., . . . Wesselborg, S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*, 8(12), 1197-1206.
- Bervers, E. M., Wiedmer, T., Comfurius, P., Zhao, J., Smeets, E. F., Schlegel, R. A., . . . Sims, P. J. (1995). The complex of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and calcium ions is not responsible for Ca²⁺-induced loss of phospholipid asymmetry in the human erythrocyte: a study in Scott syndrome, a disorder of calcium-induced phospholipid scrambling. *Blood*, 86(5), 1983-1991.
- BfR, B. f. R. (2006, 18. August 2006). Hohe tägliche Aufnahmemengen von Zimt: Gesundheitsrisiko kann nicht ausgeschlossen werden from http://www.bfr.bund.de/cm/343/hohe_taeagliche_aufnahmemengen_von_zimt_gesundheitsrisiko_kann_nicht_ausgeschlossen_werden.pdf

- Birka, C., Lang, P. A., Kempe, D. S., Hoefling, L., Tanneur, V., Duranton, C., . . . Lang, F. (2004). Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch*, *448*(5), 471-477.
- Bookchin, R. M., Ortiz, O. E., & Lew, V. L. (1987). Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res*, *240*, 193-200.
- Brand, V. B., Sandu, C. D., Duranton, C., Tanneur, V., Lang, K. S., Huber, S. M., & Lang, F. (2003). Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem*, *13*(6), 347-356.
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J. P., . . . Ameisen, J. C. (2001). Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ*, *8*(12), 1143-1156.
- Brenner, D. E., & Gescher, A. J. (2005). Cancer chemoprevention: lessons learned and future directions. *Br J Cancer*, *93*(7), 735-739.
- Brugnara, C., de Franceschi, L., & Alper, S. L. (1993). Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*, *92*(1), 520-526.
- Chang, S. T., & Cheng, S. S. (2002). Antitermitic activity of leaf essential oils and components from Cinnamomum osmophleum. *J Agric Food Chem*, *50*(6), 1389-1392.
- Chao, L. K., Chang, W. T., Shih, Y. W., & Huang, J. S. (2010). Cinnamaldehyde impairs high glucose-induced hypertrophy in renal interstitial fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, *244*(2), 174-180.
- Chaurio, R. A., Janko, C., Munoz, L. E., Frey, B., Herrmann, M., & Gaipf, U. S. (2009). Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules*, *14*(12), 4892-4914.
- Chung, S. M., Bae, O. N., Lim, K. M., Noh, J. Y., Lee, M. Y., Jung, Y. S., & Chung, J. H. (2007). Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *27*(2), 414-421.
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, *2*(9), 647-656.

- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Daugas, E., Cande, C., & Kroemer, G. (2001). Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*, 8(12), 1131-1133.
- De Flora, S., Bennicelli, C., Rovida, A., Scatolini, L., & Camoirano, A. (1994). Inhibition of the 'spontaneous' mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104. *Mutat Res*, 307(1), 157-167.
- de Silva, H. V., & Shankel, D. M. (1987). Effects of the antimutagen cinnamaldehyde on reversion and survival of selected *Salmonella* tester strains. *Mutat Res*, 187(1), 11-19.
- DeMarini, D. M. (1998). Dietary interventions of human carcinogenesis. *Mutat Res*, 400(1-2), 457-465.
- Duranton, C., Huber, S. M., & Lang, F. (2002). Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*, 539(Pt 3), 847-855.
- Eisele, K., Lang, P. A., Kempe, D. S., Klarl, B. A., Niemoller, O., Wieder, T., . . . Lang, F. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 210(1-2), 116-122.
- Ellory, J. C., Kirk, K., Culliford, S. J., Nash, G. B., & Stuart, J. (1992). Nitrendipine is a potent inhibitor of the Ca(2+)-activated K⁺ channel of human erythrocytes. *FEBS Lett*, 296(2), 219-221.
- Ferri, K. F., & Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, 3(11), E255-263.
- Floride, E., Foller, M., Ritter, M., & Lang, F. (2008). Caffeine inhibits suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 22(1-4), 253-260.
- Foller, M., Bobbala, D., Koka, S., Huber, S. M., Gulbins, E., & Lang, F. (2009). Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem*, 24(3-4), 133-140.
- Foller, M., Braun, M., Qadri, S. M., Lang, E., Mahmud, H., & Lang, F. (2010). Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. *Eur J Clin Invest*, 40(6), 534-540.
- Foller, M., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60(10), 661-668.

- Gallagher, P. G., Chang, S. H., Rettig, M. P., Neely, J. E., Hillery, C. A., Smith, B. D., & Low, P. S. (2003). Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis. *Blood*, *101*(11), 4625-4627.
- Gan, F. F., Chua, Y. S., Scarmagnani, S., Palaniappan, P., Franks, M., Poobalasingam, T., . . . Hagen, T. (2009). Structure-activity analysis of 2'-modified cinnamaldehyde analogues as potential anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun*, *387*(4), 741-747.
- Geldwerth, D., Kuypers, F. A., Butikofer, P., Allary, M., Lubin, B. H., & Devaux, P. F. (1993). Transbilayer mobility and distribution of red cell phospholipids during storage. *J Clin Invest*, *92*(1), 308-314.
- He, Z. D., Qiao, C. F., Han, Q. B., Cheng, C. L., Xu, H. X., Jiang, R. W., . . . Shaw, P. C. (2005). Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (cortex cinnamomi) by high-pressure liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, *53*(7), 2424-2428.
- Ka, H., Park, H. J., Jung, H. J., Choi, J. W., Cho, K. S., Ha, J., & Lee, K. T. (2003). Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett*, *196*(2), 143-152.
- Kaji, D. M. (1990). Nifedipine inhibits calcium-activated K transport in human erythrocytes. *Am J Physiol*, *259*(2 Pt 1), C332-339.
- Kataoka, S., & Tsuruo, T. (1996). Physician Education: Apoptosis. *Oncologist*, *1*(6), 399-401.
- Kaufman, R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, *110*(10), 1389-1398.
- Kempe, D. S., Akel, A., Lang, P. A., Hermle, T., Biswas, R., Muresanu, J., . . . Lang, F. (2007). Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)*, *85*(3), 273-281.
- Kempe, D. S., Lang, P. A., Duranton, C., Akel, A., Lang, K. S., Huber, S. M., . . . Lang, F. (2006). Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J*, *20*(2), 368-370.
- Kempe, D. S., Lang, P. A., Eisele, K., Klarl, B. A., Wieder, T., Huber, S. M., . . . Lang, F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol*, *288*(2), C396-402.
- Kennedy, E. T. (2006). Evidence for nutritional benefits in prolonging wellness. *Am J Clin Nutr*, *83*(2), 410S-414S.

- Key, T. J., Schatzkin, A., Willett, W. C., Allen, N. E., Spencer, E. A., & Travis, R. C. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr*, 7(1A), 187-200.
- King, A. A., Shaughnessy, D. T., Mure, K., Leszczynska, J., Ward, W. O., Umbach, D. M., . . . Klein, C. B. (2007). Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutat Res*, 616(1-2), 60-69.
- Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S., Niemoeller, O. M., Akel, A., Sobiesiak, M., . . . Lang, F. (2006). Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(1), C244-253.
- Kuypers, F. A., Schott, M. A., & Scott, M. D. (1996). Phospholipid composition and organization in model beta-thalassemic erythrocytes. *Am J Hematol*, 51(1), 45-54.
- Lang, F. (2009, 02.04.2009). Erythrocyte death signaling. from <http://www.physiologie.medizin.uni-tuebingen.de/dep1/interests/eryptosis>
- Lang, F., Gulbins, E., Lang, P. A., Zappulla, D., & Foller, M. (2010). Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 26(1), 21-28.
- Lang, F., Lang, E., & Foller, M. (2012). Physiology and pathophysiology of eryptosis. *Transfus Med Hemother*, 39(5), 308-314.
- Lang, K. S., Durantou, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., . . . Huber, S. M. (2003). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 10(2), 249-256.
- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Durantou, C., Wieder, T., Huber, S. M., & Lang, F. (2005a). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 15(5), 195-202.
- Lang, K. S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P. A., Berchtold, S., . . . Wieder, T. (2004). Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 11(2), 231-243.
- Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., Hermle, T., . . . Lang, F. (2006a). Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 84(5), 378-388.
- Lang, P. A., Huober, J., Bachmann, C., Kempe, D. S., Sobiesiak, M., Akel, A., . . . Wieder, T. (2006b). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem*, 18(1-3), 151-164.

- Lang, P. A., Kasinathan, R. S., Brand, V. B., Duranton, C., Lang, C., Koka, S., . . . Huber, S. M. (2009). Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem*, *24*(5-6), 415-428.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Akel, A., Klarl, B. A., Eisele, K., Podolski, M., . . . Duranton, C. (2005b). Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *372*(3), 228-235.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., . . . Huber, S. M. (2005c). PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*, *12*(5), 415-428.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Tanneur, V., Eisele, K., Klarl, B. A., Myssina, S., . . . Wieder, T. (2005d). Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*, *118*(Pt 6), 1233-1243.
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., & Alvarez, O. (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*, *51*, 385-399.
- Lee, A. S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*, *26*(8), 504-510.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, *91*(4), 479-489.
- Maher, A. D., & Kuchel, P. W. (2003). The Gardos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, *35*(8), 1182-1197.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., & Basu, J. (2005). Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem*, *280*(47), 39460-39467.
- McEvoy, L., Williamson, P., & Schlegel, R. A. (1986). Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(10), 3311-3315.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., . . . Susin, S. A. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, *276*(19), 16391-16398.

- Myssina, S., Huber, S. M., Birka, C., Lang, P. A., Lang, K. S., Friedrich, B., . . . Lang, F. (2003). Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol*, *14*(11), 2750-2757.
- Nicolay, J. P., Gatz, S., Liebig, G., Gulbins, E., & Lang, F. (2007). Amyloid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, *19*(1-4), 175-184.
- Nicolay, J. P., Schneider, J., Niemoeller, O. M., Artunc, F., Portero-Otin, M., Haik, G., Jr., . . . Lang, F. (2006). Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem*, *18*(4-5), 223-232.
- Niemoeller, O. M., Bentzen, P. J., Lang, E., & Lang, F. (2007). Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. *Pflugers Arch*, *454*(3), 427-439.
- Niemoeller, O. M., Foller, M., Lang, C., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, *21*(1-3), 193-202.
- Niemoeller, O. M., Kiedaisch, V., Dreischer, P., Wieder, T., & Lang, F. (2006). Stimulation of eryptosis by aluminium ions. *Toxicol Appl Pharmacol*, *217*(2), 168-175.
- Ohta, T. (1993). Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Crit Rev Toxicol*, *23*(2), 127-146.
- Ruckpaul, K., Schlegelberger, B., Fonatsch, C., & Ganten, D. (2013). *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*: Springer Berlin Heidelberg.
- Serra-Majem, L., Roman, B., & Estruch, R. (2006). Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutr Rev*, *64*(2 Pt 2), S27-47.
- Shaughnessy, D. T., Setzer, R. W., & DeMarini, D. M. (2001). The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in Salmonella TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat Res*, *480-481*, 55-69.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., . . . Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, *144*(2), 281-292.
- Sopjani, M., Foller, M., & Lang, F. (2008). Gold stimulates Ca²⁺ entry into and subsequent suicidal death of erythrocytes. *Toxicology*, *244*(2-3), 271-279.

- Theurer, M., Shaik, N., & Lang, F. (2013). Stimulation of suicidal erythrocyte death by trans-cinnamaldehyde. *Phytomedicine*, *20*(12), 1119-1123.
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, *31*(1), 1-9.
- Wolff, D., Cecchi, X., Spalvins, A., & Canessa, M. (1988). Charybdotoxin blocks with high affinity the Ca-activated K⁺ channel of Hb A and Hb S red cells: individual differences in the number of channels. *J Membr Biol*, *106*(3), 243-252.
- Wu, S. J., & Ng, L. T. (2007). MAPK inhibitors and pifithrin-alpha block cinnamaldehyde-induced apoptosis in human PLC/PRF/5 cells. *Food Chem Toxicol*, *45*(12), 2446-2453.
- Wu, S. J., Ng, L. T., & Lin, C. C. (2005). Cinnamaldehyde-induced apoptosis in human PLC/PRF/5 cells through activation of the proapoptotic Bcl-2 family proteins and MAPK pathway. *Life Sci*, *77*(8), 938-951.
- Xue, Y. L., Shi, H. X., Murad, F., & Bian, K. (2011). Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta. *Vasc Health Risk Manag*, *7*, 273-280.
- Yan, P., Xiong, Y., Chen, B., Negash, S., Squier, T. C., & Mayer, M. U. (2006). Fluorophore-assisted light inactivation of calmodulin involves singlet-oxygen mediated cross-linking and methionine oxidation. *Biochemistry*, *45*(15), 4736-4748.
- Zhang, J. H., Liu, L. Q., He, Y. L., Kong, W. J., & Huang, S. A. (2010). Cytotoxic effect of trans-cinnamaldehyde on human leukemia K562 cells. *Acta Pharmacol Sin*, *31*(7), 861-866.

10 Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Theurer, M., Shaik, N., & Lang, F. (2013). Stimulation of suicidal erythrocyte death by trans-cinnamaldehyde. *Phytomedicine*, 20(12), 1119-1123.

Weitere veröffentlichte Publikationen, die in dieser Dissertation als Literaturquelle verwendet wurden:

Abed, M.; Zoubi, K.A., **Theurer, M.**, & Lang, F. (2013). Effect of dermaseptin on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 113(5), 347-352

11 Erklärung zum Eigentel

Ich, Michael Dan Theurer geb. am 19.03.1983 in Tübingen habe die für die Dissertation und die Publikation

Theurer, M., Shaik, N., & Lang, F. (2013). Stimulation of suicidal erythrocyte death by trans-cinnamaldehyde. *Phytomedicine*,20(12), 1119-1123

benötigten Versuche die in Abbildung 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 der Dissertation aufgeführt sind selbstständig durchgeführt. Frau Dr. Shaik gab bei Problemen Hilfestellung und war bei Fragen meine Ansprechpartnerin. Sie gab mir vor der Versuchsdurchführung eine Einweisung in das wissenschaftliche Arbeiten und ließ mich bei Ihren Projekten und Versuchen teilnehmen. Die Daten-Recherche wurde von mir selbstständig durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden von mir ausgewertet und anschließend von Fr. Dr. Shaik überprüft.

Herr Professor Dr. med. Dr. h.c. Florian Lang war an der Konzeption der Studie beteiligt und verfasste mit mir zusammen die Veröffentlichung.

Die Dissertation wurde von mir selbstständig verfasst und erarbeitet. Die Abbildungen 1,2 und 3 wurden von mir erstellt.

Die für die Publikation

Abed, M.; Zoubi, K.A., **Theurer, M.**, & Lang, F. (2013). Effect of dermaseptin on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 113(5), 347-352

benötigten Versuche wurden von mir selbstständig durchgeführt. Die Auswertung der erfassten Daten wurde von Herrn Abed und Herrn Zoubi durchgeführt. Auch in dieser Publikation war Herr Professor Dr. med. Dr. h.c. Florian Lang an der Konzeption der Studie beteiligt und verfasste die Veröffentlichung mit Herrn Abed.

Tübingen, den 22.10.2015

Michael Dan Theurer

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Florian Lang, der mir einen Doktorantenplatz in der Forschung im Physiologischen Institut der Universität Tübingen ermöglichte und bei Fragen oder anfallenden Problemen zu jeder Zeit freundlich und zuvorkommend war. Trotz seiner vielen Arbeit fühlte man sich immer herzlich willkommen.

Auch meiner Betreuerin Frau Dr. Shaik möchte ich meinen Dank aussprechen. Sie nahm sich immer Zeit mir die einzelnen Forschungsschritte zu erklären und stand bei Fragen immer hilfreich zur Seite. Sie motivierte einen und vermittelte den Spaß an der Forschung.

Des weitern bedanke ich mich beim gesamten Eryptoseteam, die mich herzlich aufgenommen haben und mir zur Seite standen.

Ein besonderer Dank geht an meine Kommilitonin Tabea Herrmann, die mit mir zusammen im Eryptoselabor angefangen hat und über die ein oder andere Hürde hinweggeholfen hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen beiden Schwestern Katja und Larissa bedanken, die mich unterstützt haben und meinen Eltern die mir das Studium überhaupt erst ermöglichten.