

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Einfluss der Medikamente Lapatinib, Regorafenib und  
Teriflunomid auf die Eryptose, den suizidalen Zelltod  
der Erythrozyten**

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

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

**vorgelegt von**

**Zierle, Jens Timo**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. F. Lang  
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwab  
3. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hein

Tag der Disputation: 11.12.2019

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern,  
die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichen  
und mir zuverlässig zur Seite stehen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Erythrozyten .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Eryptose.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Phosphatidylserin (PS)-Exposition .....	4
1.2.2 Zellschrumpfung .....	6
1.2.3 Rolle des intrazellulären Calciums .....	7
1.2.4 Oxidativer Stress und Ceramid-Bildung.....	8
1.2.5 Glukosemangel und die Aktivität von Kinasen .....	9
1.2.6 Bedeutung der Eryptose .....	10
<b>1.3 Testsubstanzen: Lapatinib, Regorafenib und Teriflunomid .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Fragestellung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Erythrozyten.....	18
2.1.2 Lösungen .....	18
2.1.3 Substanzen und Markierung von Zellstrukturen .....	21
2.1.4 Messgerät und Software.....	22
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Durchflusszytometrie.....	23
2.2.2 Aufbau der Experimente.....	23
2.2.3 Messungen.....	24
2.2.4 Schaubilder, Auswertung und Statistik.....	26

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Lapatinib verursacht Eryptose</b>	<b>27</b>
3.1.1	PS-Exposition und Zellgröße	27
3.1.2	Intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )	29
3.1.3	PS-Exposition und Zellgröße bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$	31
3.1.4	PS-Exposition und Zellgröße bei fehlendem extrazellulärem Calcium	33
3.1.5	Oxidativer Stress und Ceramid-Bildung	36
<b>3.2</b>	<b>Regorafenib verursacht Eryptose</b>	<b>37</b>
3.2.1	PS-Exposition und Zellgröße	37
3.2.2	$[Ca^{2+}]_i$	38
3.2.3	PS-Exposition und Zellgröße bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$	39
3.2.4	PS-Exposition und Zellgröße bei fehlendem extrazellulärem Calcium	41
3.2.5	Oxidativer Stress und Ceramid-Bildung	44
3.2.6	Wechselwirkung mit Kinase-Inhibitoren SB 203580 und Staurosporin	44
<b>3.3</b>	<b>Teriflunomid schwächt die Eryptose ab</b>	<b>45</b>
3.3.1	PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ unter Kontrollbedingungen	45
3.3.2	PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ bei Glukosemangel	46
3.3.3	PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$	50
3.3.4	PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ bei oxidativem Stress	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Erklärungen zum Eigenanteil</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>97</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>98</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Phosphatidylserin (PS)-Exposition und Ceramid-Bildung osmotisch geschockter Erythrozyten (52). .....	5
<b>Abb. 2:</b> Signalwege, die den suizidalen Zelltod der Erythrozyten (Eryptose) verursachen oder hemmen (68). .....	7
<b>Abb. 3:</b> Triggern der Eryptose in Krankheiten (97). .....	10
<b>Abb. 4:</b> Einfluss von Lapatinib auf die PS-Exposition (245). .....	28
<b>Abb. 5:</b> Einfluss von Lapatinib auf die Zellgröße (245). .....	28
<b>Abb. 6:</b> Einfluss von Lapatinib auf die $[Ca^{2+}]_i$ (245). .....	29
<b>Abb. 7:</b> Einfluss von Lapatinib und Ionomycin auf die $[Ca^{2+}]_i$ (245). .....	30
<b>Abb. 8:</b> Einfluss von Lapatinib und Ionomycin auf die PS-Exposition (245). .....	31
<b>Abb. 9:</b> Einfluss von Lapatinib und Ionomycin auf die Zellgröße (245). .....	32
<b>Abb. 10:</b> Einfluss von Lapatinib ohne Calcium auf die PS-Exposition (245). .....	34
<b>Abb. 11:</b> Einfluss von Lapatinib ohne Calcium auf die Zellgröße (245). .....	35
<b>Abb. 12:</b> Einfluss von Regorafenib auf die PS-Exposition (246). .....	37
<b>Abb. 13:</b> Einfluss von Regorafenib auf die Zellgröße (246). .....	38
<b>Abb. 14:</b> Einfluss von Regorafenib und Ionomycin auf die PS-Exposition (246). .....	39
<b>Abb. 15:</b> Einfluss von Regorafenib und Ionomycin auf die Zellgröße (246). .....	40
<b>Abb. 16:</b> Einfluss von Regorafenib ohne Calcium auf die PS-Exposition (246). .....	42
<b>Abb. 17:</b> Einfluss von Regorafenib ohne Calcium auf die Zellgröße (246). .....	43
<b>Abb. 18:</b> PS-Exposition bei Glukosemangel und Einfluss von Teriflunomid (247). .....	47
<b>Abb. 19:</b> Zellgröße bei Glukosemangel und Einfluss von Teriflunomid (247). .....	48
<b>Abb. 20:</b> $[Ca^{2+}]_i$ bei Glukosemangel und Einfluss von Teriflunomid (247). .....	49
<b>Abb. 21:</b> Einfluss von Teriflunomid und Ionomycin auf die PS-Exposition (247). .....	51
<b>Abb. 22:</b> Einfluss von Teriflunomid und Ionomycin auf die Zellgröße (247). .....	52
<b>Abb. 23:</b> Einfluss von Teriflunomid und Ionomycin auf die $[Ca^{2+}]_i$ (247). .....	53
<b>Abb. 24:</b> PS-Exposition bei oxidativem Stress und Einfluss von Teriflunomid (247). ..	55
<b>Abb. 25:</b> Zellgröße bei oxidativem Stress und Einfluss von Teriflunomid (247). .....	56
<b>Abb. 26:</b> $[Ca^{2+}]_i$ bei oxidativem Stress und Einfluss von Teriflunomid (247). .....	58

## Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumkonzentration
a.u.	willkürliche Einheit (engl. arbitrary unit)
AM	Acetoxymethyl
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AWB	Annexin-Wasch-Puffer
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CK1α	Caseinkinase1α
c-KIT	Tyrosinkinase KIT
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
COX	Cyclooxygenase
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dubleccos Phosphatgepufferte Salzlösung
EGFR/Her	humane-epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptoren
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Jak 3	Januskinase 3

K <sup>+</sup>	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
MAPK	mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
n	Anzahl verwendeter Blutproben
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
p38 MAPK	p38 mitogen-aktivierte-Proteinkinase
PAK 2	p21-aktivierte Kinase 2
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCR	Scramblase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
t-BOOH	Tert-Butylhydroperoxid
TIE-2	Angiopoietinrezeptor-2
VEGFR 1-3	Endothel-Wachstumsfaktorrezeptor 1-3

# 1 Einleitung

Der programmierte Tod von Zellen wird Apoptose genannt (1). Dieser stellt einen streng regulierten biochemischen Mechanismus dar, in dem verschiedene Zellorganellen zusammenspielen (2). An Erythrozyten, den roten Blutzellen, konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden (3, 4). Besonders daran ist, dass an diesem suizidalen Zelltod der Erythrozyten weder ein Zellkern noch Mitochondrien beteiligt sind (5). Diese Apoptose der Erythrozyten erhielt in Tübingen die Bezeichnung Eryptose (6). Sie wird erforscht, um Fragen nach dem molekularen Ablauf und ihrer pathophysiologischen Bedeutung zu beantworten (7). Die Eryptose ist an der Pathogenese von Krankheiten beteiligt und ein Ziel der Forschung ist es, die Eryptose in diesen Situationen beeinflussen zu können (8). Zahlreiche chemische Substanzen lösen die Eryptose aus oder schwächen sie ab (9).

Die vorliegende Arbeit schließt an oben skizzierte Forschung an. In ihrem Rahmen wurde die direkte Auswirkung der Medikamente Lapatinib, Regorafenib und Teriflunomid auf die Erythrozyten von gesunden Spendern *in vitro* getestet. Mit den Medikamenten werden aktuell Patienten therapiert, die unter malignen Tumoren oder autoimmunen Erkrankungen leiden (10-12). Die Substanzen kommen somit nach dem Übertritt in den Blutkreislauf unmittelbar mit den roten Blutzellen in Kontakt. Lapatinib und Regorafenib verursachen Anämie als Nebenwirkung (13, 14). Der aktuelle Forschungsstand deutet darauf hin, dass maligne Tumore oder deren Chemotherapie durch die Eryptose der Erythrozyten eine Anämie verursachen (8). Deshalb wäre auch die Entdeckung von Substanzen mit hemmendem Einfluss auf die Eryptose von Bedeutung (8). Teriflunomid beeinflusst verschiedene Zelltypen über vielfältige Mechanismen, die noch nicht vollständig verstanden sind (15). Wie sich Lapatinib, Regorafenib und Teriflunomid direkt auf die roten Blutzellen und die Eryptose auswirken, ist bisher nicht bekannt.

## 1.1 Erythrozyten

Das **Blut** des Menschen besteht aus Plasma und Blutzellen. Es dient dem Körper als Transportmedium zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus und zum Austausch von Botenstoffen. Es steuert weiterhin die Blutstillung und übernimmt Funktionen des Immunsystems (16).

Die **Erythrozyten** bilden mit einer Anzahl von  $4 - 6 \times 10^{12}$  Zellen pro Liter den Großteil der Blutzellen. Sie sind bikonkav geformte Scheiben mit  $7,5 \mu\text{m}$  Durchmesser und  $2 \mu\text{m}$  Dicke. Ihre Plasmamembran ist über Bande-3-Proteine und Glykophorine am Cytoskelett verankert und nimmt an physiologischen Prozessen teil (17). Durch ihre Flexibilität können sie sich verformen und enge Kapillaren passieren (18). Im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen haben die roten Blutzellen ihre Zellorganellen in der Entwicklung zu reifen Erythrozyten abgebaut (19). Dafür beinhalten sie viel Hämoglobin, das reversibel Sauerstoff bindet und wesentlich für die Sauerstoffkapazität des Blutes verantwortlich ist. Zusätzlich beteiligen sich die Erythrozyten am Transport von Kohlenstoffdioxid, der Einhaltung des Säure-Basen-Haushaltes, nehmen Einfluss auf die Hämostase und setzen die vasoaktiven Substanzen Adenosintriphosphat (ATP) und Stickstoffmonoxid (NO) frei (20-24).

Ein Prozent der Erythrozyten wird unter physiologischen Bedingungen während der **Erythropoiese** jeden Tag neu gebildet (24). Im Knochenmark entstehen aus pluripotenten Stammzellen durch Proliferation und Differenzierung Erythroblasten, die um Makrophagen in Inseln organisiert sind. Dort findet in Interaktion mit den Makrophagen Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Hämoglobinsynthese und die Ausstoßung des Zellkerns statt (25, 26). Zum Abschluss der Entwicklung gehen die Zellen als Retikulozyten in den Blutkreislauf über und bauen innerhalb von zwei Tagen restliche Organellen wie Mitochondrien und Ribosomen ab (27). Das Hormon Erythropoietin (EPO) reguliert die Erythropoiese, indem es über EPO-Rezeptoren die Apoptose der Vorläuferzellen unterdrückt (28). Es wird größtenteils von peritubulären Fibroblasten im Nierenkortex gebildet. Der physiologische Stimulus für die

EPO-Produktion ist die Hypoxie, die unter anderem bei einem Mangel an Erythrozyten auftritt (16). Dadurch entsteht ein Regelkreis, in dem die Erythropoiese um ein Vielfaches gesteigert werden kann (28).

Erythrozyten zirkulieren im Blutkreislauf mit einer Lebensdauer von 100 - 120 Tagen (24). **Gealterte Erythrozyten** zeigen charakteristische Erscheinungen, die als oxidative Schäden, Veränderungen des Hämoglobins, eine Zunahme der Zelldichte und eine verringerte Flexibilität messbar sind (29). Aufgrund ihrer eingeschränkten Flexibilität können sich gealterte Erythrozyten nicht durch die Schlitzlöcher der Milz-Sinusoide zwängen und werden daraufhin von Makrophagen phagozytiert und abgebaut (30). Makrophagen erkennen defekte Erythrozyten über Rezeptor-Ligand Interaktionen. Veränderungen an der Oberfläche der Erythrozyten, die zur Phagozytose führen, sind Phosphatidylserin (PS)-Exposition und das Binden von Antikörper an modifizierte Bande-3-Proteinkomplexe (31).

Eine eingeschränkte Erythropoiese oder ein verstärkter Abbau resultiert nach Ausschöpfung der Kompensationsmechanismen in einer **Anämie**. Sie wird von der WHO durch eine Hämoglobinkonzentration unter 120 g/L für Frauen und 130 g/L für Männer definiert (24). Zu den Ursachen gehören unter anderem Eisenmangel, chronische Entzündungen, chronische Niereninsuffizienz, Tumorleiden und die Therapie mit Zytostatika (32, 33). Anämie geht im Alter mit einem erhöhten Morbiditäts - und Mortalitätsrisiko einher und äußert sich durch Müdigkeit sowie Funktionseinschränkungen und Kognitionsverlust (34).

Ein weiterer Grund für den verstärkten Abbau von Erythrozyten mit der Anämie als Folge ist die Eryptose (35). Ihre Charakteristik und Signifikanz wird im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

## 1.2 Eryptose

Die Eryptose ist wie die Apoptose ein regulierter biochemischer Vorgang, der zum kontrollierten Abbau der Zelle führt. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Eryptose jedoch nicht unbedingt von Caspasen abhängig, die durch Proteinspaltung die Apoptose forcieren (3, 4). Die Eryptose findet zudem ohne die Beteiligung von Zellkernen und Mitochondrien statt (5).

Im Unterschied zum programmierten Zelltod erfolgt bei der Nekrose und der Hämolyse nach einer Zellschädigung ein unkontrollierter Verlust von Zellinhalt und -strukturen. Die freigesetzten Substanzen ziehen lokale Entzündungsreaktionen nach sich, die beim suizidalen Zelltod durch die kontrollierte Phagozytose vermieden werden (36). Der physiologische Sinn der Eryptose mag darin liegen, das Leben geschädigter Erythrozyten vorzeitig zu beenden und diese vor der Hämolyse abzubauen (6). Eine massive Hämoglobinfreisetzung nach Hämolyse, die die Kompensation übersteigt, kann Nierentubuli verstopfen und die Nierenfunktion schädigen (37, 38).

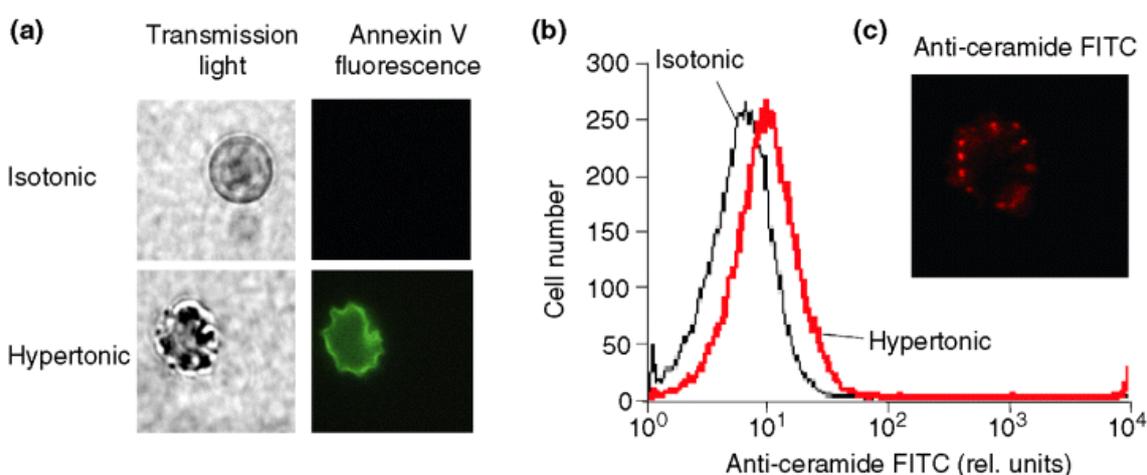
Die Eryptose ist gekennzeichnet durch eine PS-Exposition auf der Außenseite der Zellmembran und eine Zellschrumpfung (39). Sie werden durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) ausgelöst (39). Weitere Signalwege beinhalten oxidativen Stress, osmotischen Schock mit Ceramid-Bildung, Energiemangel und die Aktivität von Kinasen (39-43).

### 1.2.1 Phosphatidylserin (PS)-Exposition

Die PS-Exposition auf der Außenseite der Zellmembran ist das markanteste Zeichen der Eryptose und vermittelt die Interaktion mit der Umgebung der sterbenden Erythrozyten.

Im normalen Zustand ist die Plasmamembran der roten Blutzellen aus einer asymmetrischen Doppellipidschicht aufgebaut. Das negativ geladene PS befindet sich ausschließlich auf der Innenseite (44). Um diese Ordnung aufrecht zu erhalten, transportieren Flippasen und Floppasen ATP-abhängig Lipide gegen den Konzentrationsgradienten auf die kontralaterale Seite der Membran (44). Eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  aktiviert Scramblasen, die unselektiv

Phospholipide der Lipidschichten austauschen. Sie bewirken damit einen Zusammenbruch der Membranasymmetrie und eine PS-Exposition (45). Die Identität und Funktionsweise der Proteine sind noch nicht eindeutig beschrieben, jedoch werden die Proteinfamilien TMEM16, Xkr und hPLSCR dafür verantwortlich gemacht (46-48). Die PS-Exposition wird nicht ausschließlich durch die  $[Ca^{2+}]_i$  reguliert, sondern auch durch oxidativen Stress, Ceramid-Bildung (vgl. Abb. 1), die Aktivität von Kinasen und vermutlich die Hyperpolarisierung der Zellmembran (43, 49-51).



**Abb. 1:** Phosphatidylserin (PS)-Exposition und Ceramid-Bildung osmotisch geschocckter Erythrozyten (52).

**(a)** Mikrofotografie (links) und Fluoreszenzbild (rechts) von humanen Erythrozyten, inkubiert in isotonischem (300 mOsm) und hypertonischem (850 mOsm) Medium. Das Fluoreszenzsignal verdeutlicht das Binden von Annexin-V-FITC an PS der äußeren Zellmembran der Erythrozyten. **(b)** Histogramme der Durchflusszytometrie von humanen Erythrozyten, die eine Bindung von FITC-gelabelten anti-Ceramid-Antikörpern an humane Erythrozyten zeigt, die entweder in isotonischem (300 mOsm; schwarze Linie) und hypertonischem (850 mOsm; rote Linie) Medium inkubiert wurden. **(c)** Immunfluoreszenz zeigt die Ceramid-Bildung von humanen Erythrozyten, die wie in **(b; rot)** in hypertonischem Medium inkubiert wurden.

Makrophagen erkennen PS-exponierende Zellen anhand von Rezeptoren für PS, welches als „Iss-mich“ Signal fungiert (31, 53). Erythrozyten mit PS-Exposition werden von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems phagozytiert und innerhalb kurzer Zeit aus dem Blut entfernt (54-57). Die Makrophagen bauen Erythrozyten ab und recyceln das Eisen (58). Der Erythrozytenabbau als Folge der Eryptose kann zur Entwicklung einer Anämie beitragen (59).

PS an der Oberfläche der Membranen triggert weiterhin die Adhäsion der Erythrozyten an Thrombozyten und Endothelzellen über den Chemokin-Ligand-16 (60, 61). Außerdem begünstigt PS die Anheftung der Erythrozyten untereinander, die Anheftung an die subendotheliale Matrix und die Thrombinbildung (50, 62, 63). Diese Prozesse verstärken die Blutgerinnung und können zu einer erhöhten Thromboseneigung und eingeschränkten Mikrozirkulation führen (20).

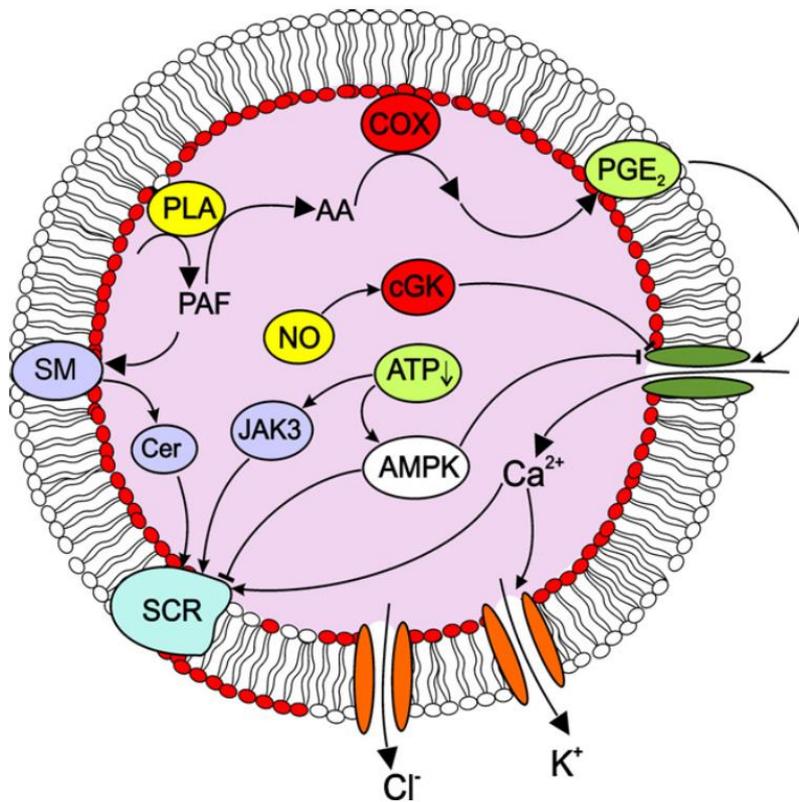
### 1.2.2 Zellschrumpfung

Die Zellschrumpfung und die Ausstülpung von Membranbläschen sind weitere Merkmale der Eryptose. Sie werden durch eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  ausgelöst (64).

Der Ablauf der Zellschrumpfung beginnt bei Erythrozyten mit dem Öffnen calciumabhängiger Kaliumkanäle (vgl. Abb. 2 auf der nächsten Seite). Folglich strömen Kaliumionen entlang des Konzentrationsgradienten aus der Zelle und bewirken eine Hyperpolarisierung der Zellmembran, wodurch auch negativ geladene Chloridionen die Zelle verlassen. Der Ionenverlust führt zu einem osmotischen Wassersog nach extrazellulär mit anschließender Zellschrumpfung (65). Sie wirkt der Zellschwellung entgegen, die nach einem Anstieg der Natriumkonzentration zur Hämolyse führen kann (6, 66).

Des Weiteren aktiviert die erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  die Cystein Protease Calpain. Sie spaltet unter anderem Ankyrin R, das an der Verbindung der Plasmamembran mit dem Cytoskelett beteiligt ist. Dadurch wird eine Bläschenbildung der Plasmamembran (engl. blebbing) ausgelöst (64).

Eine hypertonische oder Cl-freie Lösung verursacht *in vitro* eine Zellschrumpfung und eine Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) durch Aktivierung der Cyclooxygenase (COX; vgl. Abb. 2). PGE<sub>2</sub> aktiviert unselektive calciumpermeable Kationenkanäle und führt zum Calciumeinstrom mit nachfolgender Eryptose (64). Auch die p38 mitogen-aktivierte-Proteinkinase (p38 MAPK) veranlasst nach einer Zellschrumpfung die Öffnung calciumpermeabler Kationenkanäle (67).



**Abb. 2:** Signalwege, die den suizidalen Zelltod der Erythrozyten (Eryptose) verursachen oder hemmen (68).

Arachidonsäure (AA), Phospholipase A (PLA), Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF), Sphingomyelinase (SM), Ceramid (Cer), Januskinase 3 (JAK3), Adenosinatriphosphat (ATP), AMP-aktivierte-Kinase (AMPK), Cyclooxygenase (COX), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Calciumionen (Ca<sup>2+</sup>), Kaliumionen (K<sup>+</sup>), Chloridionen (Cl<sup>-</sup>), Scramblase (SCR), Phosphatidylserin (rote Membranlipide), Stickstoffmonoxid (NO), cGMP-abhängige-Kinase (cGK), unselektiver calciumpermeabler Kationenkanal (grüner Kanal), calciumabhängiger Kaliumkanal und Chloridkanal (orangene Kanäle).

### 1.2.3 Rolle des intrazellulären Calciums

Calcium ist ein zellulärer Botenstoff und steht im Zentrum der Signalwege, die zur Eryptose beitragen (vgl. Abb. 2). Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> der Erythrozyten ist um ein vielfaches niedriger als die extrazelluläre Konzentration. Unselektive calciumpermeable Kationenkanäle der Plasmamembran werden durch oxidativen Stress, Energiemangel und osmotischen Schock geöffnet, woraufhin Calcium in die Zelle fließt (39, 69, 70). Die genaue Identität der unselektiven Kationenkanäle ist nicht abschließend geklärt, jedoch werden sie mit dem Kationenkanal TRPC6 in Verbindung gebracht (71). Die erhöhte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

verursacht die zellulären Vorgänge der Eryptose (siehe Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2).

Die Aktivität der calciumpermeablen Kationenkanäle wird durch ein Netz aus stimulierenden und inhibierenden Faktoren reguliert. Mit dem Diuretikum Amilorid können die Kanäle gehemmt und der Calciumeinstrom vermindert werden (39). Auch das Hormon EPO hemmt den Calciumeinstrom und verringert die PS-Exposition in Erythrozyten von Dialysepatienten, löst aber einen geringen Calciumeinstrom unter Kontrollbedingungen aus (72, 73). Das von Endothelzellen produzierte NO wiederum vermittelt seine hemmende Wirkung auf die Eryptose nicht durch die Einschränkung des Calciumeinstroms, sondern greift anscheinend flussabwärts der Calciumkaskade hemmend in die PS-Exposition ein (74, 75). Das abgespaltene Membranlipid Ceramid löst die PS-Exposition auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium aus (vgl. Abb. 2) und die Proteinkinase C (PKC) verursacht PS-Exposition calciumabhängig und - unabhängig (43, 51). Die  $[Ca^{2+}]_i$  scheint nicht zwingend mit der PS-Exposition korreliert zu sein (76). Somit ist Calcium ein wichtiger Mediator der Eryptose, wird jedoch durch zusätzliche Signalwege ergänzt.

#### **1.2.4 Oxidativer Stress und Ceramid-Bildung**

Erythrozyten passieren die Lunge und sind dort oxidativem Stress ausgesetzt, den sie jedoch abwenden können. Um reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzubauen, enthalten Erythrozyten die Enzyme Peroxiredoxin 2, Katalase und Glutathionperoxidase. Als Reduktionsmittel für den Abbau dienen Antioxidantien wie das Glutathion, das mit Hilfe des Pentosephosphatweges nach Verbrauch wiederhergestellt wird (77). Durch eine starke Oxidation wird dennoch die Eryptose eingeleitet, indem Calciumkanäle geöffnet und Caspasen sowie Scramblasen aktiviert werden (78, 79). Ein Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-Mangel schränkt den Pentosephosphatweg ein und führt zu einer erhöhten Anfälligkeit der Erythrozyten für die oxidative Stimulierung der Eryptose (80, 81). Oxidativer Stress ist folglich ein bedeutender Vorgang der Eryptose neben der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Ein osmotischer Schock ist eine weitere Ursache der Eryptose. Dabei wird die Phospholipase 2 der roten Blutzellen zur Bildung von Plättchen-aktivierendem-Faktor angeregt. Die Faktoren veranlassen die Spaltung des Membranlipids Sphingomyelin durch eine Sphingomyelinase, woraufhin Ceramid gebildet wird (43). Ceramid verursacht eine PS-Exposition, eine Zellschrumpfung und die Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen (82). Die Erythrozyten durchqueren mehrmals täglich das Nierenmark, wo sie einem osmotischen Schock ausgesetzt sind. Dass die Erythrozyten nicht an den Blutgefäßen des Nierenmarks haften bleiben und eryptotisch zu Grunde gehen, liegt vermutlich an der hohen Harnstoffkonzentration, welche die Bildung von Ceramid hemmt (83).

### **1.2.5 Glukosemangel und die Aktivität von Kinasen**

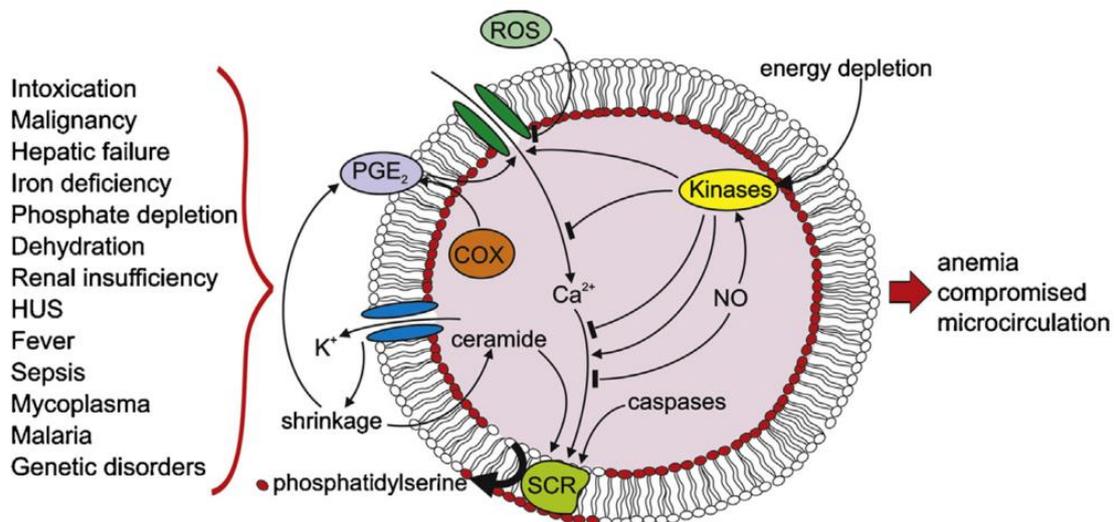
Kinasen phosphorylieren nach ihrer Aktivierung Proteine, andere Strukturen der Zellen oder weitere Kinasen. Diese werden damit aktiviert oder deaktiviert. Die Phosphorylierung beeinflusst die Funktion der Scramblasen und unselektiven Kationenkanäle der Eryptose (40, 51, 84).

Ein Energiemangel löst Eryptose aus. Die Energieressource ATP geht bei einem Glukoseentzug zur Neige. Daraufhin reagieren die PKC und Januskinase 3 (Jak 3) der Erythrozyten und sind an der folgenden PS-Exposition und Zellschrumpfung beteiligt (85, 86). Die Caseinkinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) vermittelt ebenfalls die durch Energiemangel ausgelöste Eryptose (40). Außerdem synthetisieren die Erythrozyten bei Energiemangel Leukotrien 3, das einen Calciumeinstrom verursacht und Caspasen aktiviert (87).

Bei Energiemangel hemmen aber auch Kinasen die Eryptose. Die Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte-Kinase erfasst das verbrauchte ATP in Form einer hohen AMP Konzentration und hemmt die PS-Exposition, den Calciumeinstrom und die Zellschrumpfung der Erythrozyten zusammen mit der p21-aktivierten Kinase 2 (PAK 2) (88, 89).

### 1.2.6 Bedeutung der Eryptose

Neben dem Vermeiden der Hämolyse reguliert die Eryptose zudem vorteilhaft die Erythrozytenpopulation. Gealterte Erythrozyten gehen schneller den suizidalen Zelltod ein und die Erythrozyten von Patienten mit Polycythaemia vera, einer Erkrankung mit übermäßiger Erythropoiese, weisen eine erhöhte PS-Exposition auf (90, 91). Das kann den notwendigen Zellabbau unterstützen. Das Hämoglobin fetaler Erythrozyten ist sehr sauerstoffaffin und ist deshalb nach der Geburt bei Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks von Nachteil. Der dadurch produzierte oxidative Stress führt zur PS-Exposition (vgl. Abb. 3) und vermutlich werden die Erythrozyten der Neugeborenen daraufhin schneller abgebaut (9). Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* verursacht eine PS-Exposition infizierter Erythrozyten (vgl. Abb. 3) (92-94). Genetische Variationen wie Sichelzellanämie, beta-Thalassämie und G6PDH-Mangel bieten durch eine gesteigerte Eryptose den Vorteil einer partiellen Malariaresistenz (95, 96). Folglich ist die Eryptose ein physiologischer Vorgang, der den Organismus vor Hämolyse, zu vielen oder funktionslosen Erythrozyten und Erregerausbreitung schützt.



**Abb. 3:** Triggern der Eryptose in Krankheiten (97).

Cyclooxygenase (COX), Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ), Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Scramblase (SCR), Stickstoffmonoxid (NO).

Andererseits wirkt die Eryptose in der Pathophysiologie von Erkrankungen mit und verursacht Komplikationen (vgl. Abb. 3). Im Falle der fortgeschrittenen Niereninsuffizienz setzen Urämietoxine und ein EPO-Mangel die Eryptose in Gang (35, 72, 98, 99). Es tritt eine Anämie auf, trotz vermehrter Retikulozytenproduktion, was auf eine geringe Lebenszeit der Erythrozyten hindeutet (59, 100). Die Phagozytose PS-exponierender Erythrozyten ist vermutlich eine der verschiedenen Ursachen der Anämie bei Niereninsuffizienz (101). Die Eryptose konnte noch in weiteren Erkrankungen beobachtet werden, einschließlich dem Lungenkarzinom (102), Diabetes mellitus (103-105), Leberversagen (106), Herzinsuffizienz (107), Arteriitis (108), hämolytisch-urämisches Syndrom (109), systemischer Lupus erythematoses (110), paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (111), myelodysplastisches Syndrom (111), Sepsis (112), Malaria (94), Sichelzellanämie (113), beta-Thalassämie (114), G6PDH-Mangel (115), hereditäre Sphärozytose (116), Morbus Wilson (117), Morbus Parkinson (118), Eisenmangel (56), Hypo - und Hyperphosphatämie (119, 120), Dehydratation (121), Mykoplasmeninfektion (122), Adipositas (123) und dem metabolische Syndrom (124). Die Eryptose kann in den Krankheiten zur Entwicklung einer Anämie oder zur Einschränkung der Mikrozirkulation beitragen (vgl. Abb. 3 und siehe Abschnitt 1.2.1).

Die Eryptose wird von vielen Substanzen, einschließlich etlicher Medikamente, initiiert (50, 125-164). Dieser Umstand und auch, dass dieser Vorgang zur Anämie führen kann, wird selten beachtet (35). Die vorliegende Arbeit setzt an diese Aspekte an, indem Medikamente darauf getestet wurden, ob sie die Eryptose auslösen.

Dass die Hemmung der Eryptose ein potentiell Ziel für eine Therapie bieten kann, um der Anämie von Patienten mit einer erhöhten Eryptoserate vorzubeugen, wird noch nicht ausgeschöpft (165). Mehr Studien sind nötig, um die Rolle der Eryptose in Krankheiten zu ergründen und wirkungsvolle Maßnahmen ergreifen zu können (165). Deshalb werden Substanzen gesucht, die Eryptose hemmen. Einige dieser Substanzen sind bereits bekannt (74, 166-172). Mit dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, weitere zu identifizieren.

### 1.3 Testsubstanzen: Lapatinib, Regorafenib und Teriflunomid

Der Tyrosinkinase-Inhibitor **Lapatinib** blockiert die Aktivität der humanen-epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR/Her) und wird als Medikament zur Therapie von Her-2-positiven Mammakarzinomen eingesetzt (173, 174). Er gehört zu den niedermolekularen Substanzen mit zielgerichteter Wirkung auf Krebszellen. Im Gegensatz zu Trastuzumab, dem monoklonalen Antikörper gegen Her 2, wird Lapatinib oral eingenommen, überschreitet leichter die Blut-Hirn-Schranke und ist besser zur Behandlung von Hirnmetastasen geeignet (175). Möglicherweise wird Lapatinib in Zukunft noch für die Behandlung weiterer Her-2-positiver Krebsarten, des Plattenepithelkarzinoms, des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms oder des triple-negativen Mammakarzinoms verwendet (176-180). Brustkrebs ist mit weltweit 1,7 Millionen Fällen im Jahr 2012 die häufigste Krebserkrankung bei Frauen, die zweithäufigste Todesursache durch Krebs bei Frauen in weiter entwickelten Ländern und die häufigste Todesursache durch Krebs bei Frauen in weniger entwickelten Ländern (181). Die Überexpression von Her 2 kommt in etwa 20 bis 25 % der Fälle vor und macht eine Therapie mit Lapatinib möglich (182).

Lapatinib hemmt die Tyrosinkinase der EGFR/Her 1 und Her 2, woraufhin die Kinasen des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) Signalwegs weniger aktiv sind, die sonst für Zellteilung und Überleben sorgen (10, 180, 183, 184). Lapatinib hemmt damit das Tumorwachstum und verursacht die Apoptose der Tumorzellen mit Her-2-Überexpression (185, 186), aber auch triple-negativer Brustkrebszellen ohne Her-2-Überexpression (187, 188). Viele andere Krebsmedikamente lösen neben der Apoptose auch die Eryptose aus (130, 134, 147, 149, 189-193). Da Apoptose und Eryptose ähnliche Signalwege benutzen, könnte Lapatinib die Eryptose der Erythrozyten auslösen.

Die maximale Plasmakonzentration von Lapatinib ist nach oraler Einnahme 5 bis 10 µg/ml (194, 195). Zu den Nebenwirkungen von Lapatinib gehören Hautausschlag, Hand-Fuß-Syndrom, Paronychie, Juckreiz, Haarausfall,

Leukopenie, Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen, Abgeschlagenheit, periphere Neuropathie, Dyspnoe (13, 196, 197) und Anämie (13, 198).

Da Anämie von einer erhöhten Eryptoserate stammen könnte und Lapatinib Anämie auslöst, wäre die Erforschung der Auswirkung von Lapatinib auf die Erythrozyten ein Schritt, um die Eryptose als mögliche Ursache der Anämie für eine große Zahl an Patienten zu identifizieren. Dieses Wissen könnte dazu genutzt werden, die Anämie dieser Personen spezifischer zu behandeln (165).

**Regorafenib** gehört zu den niedermolekularen Inhibitoren und wird zur zielgerichteten Krebstherapie bei Patienten mit metastasiertem Kolorektalen Karzinom, therapierefraktärem Gastrointestinalen Stromatumor und als Zweitlinientherapeutikum beim Hepatozellulärem Karzinom verwendet (11, 199-201). Es wurde weiterhin zur Behandlung von Weichteilsarkomen und Nierenzellkarzinomen vorgeschlagen (202, 203). Mit weltweit 1,4 Millionen Fällen im Jahr 2012 und steigender Inzidenz in Asien und Lateinamerika ist das Kolorektale Karzinom eine bedeutende Erkrankung (204).

Im Gegensatz zu Lapatinib ist Regorafenib ein Multikinase-Inhibitor mit breiterem Spektrum. Es inhibiert die Tyrosinkinase der Rezeptoren VEGFR 1-3, TIE-2, EGFR, PDGFR, FGFR, c-KIT (für die Bedeutung der Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis) und Kinasen der Signalwege Ras-Raf-MAPK (205, 206). Damit schränkt Regorafenib die Angiogenese, Onkogenese und Funktion von Krebszellen ein (11). Die Substanz verursacht die Apoptose der Zellen durch eine Vielzahl von Mechanismen (207-216). Analog dazu wäre eine Auslösung der Eryptose durch Regorafenib möglich, wie das bei anderen Krebsmedikamenten der Fall ist (130, 134, 147, 149, 189-193). Die maximale Plasmakonzentration des Medikaments liegt nach oraler Einnahme im Bereich von 2 bis 7 µg/ml mit einem Durchschnitt von 4 µg/ml (217, 218). Die häufigsten Nebenwirkungen von Regorafenib sind das Hand-Fuß-Syndrom, gastrointestinale Symptome, Abgeschlagenheit, Mundschleimhautentzündung, Anorexie, Hypertonie, Hautausschlag, Haarausfall und erhöhte Leberenzyme (14, 219-221). Eine der weiteren Nebenwirkungen von Regorafenib ist Anämie (14, 219, 220, 222). Den Einfluss

von Regorafenib auf die Erythrozyten zu erforschen, könnte zu einem besseren Verständnis dieser Nebenwirkungen beitragen.

Das Medikament **Teriflunomid** ist zur Behandlung der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose zugelassen (223-226). Die Muttersubstanz Leflunomid, deren aktiver Metabolit Teriflunomid ist, wird zur Behandlung von rheumatoider Arthritis und Psoriasis-Arthritis eingesetzt (227).

Teriflunomid inhibiert das mitochondriale Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH), senkt dadurch die de-novo-Pyrimidinsynthese und vermindert die Proliferation aktivierter B- und T-Lymphozyten (12, 228). Teriflunomid schränkt nicht nur die Proliferation ein, sondern auch die Antigenpräsentation, die transendotheliale Migration und die pro-inflammatorische Zytokinproduktion (229). Es werden außerdem mehr T-Helferzellen vom Typ 2 anstatt vom Typ 1 gebildet, wodurch eine anti-inflammatorische Reaktion begünstigt wird (229). Einige dieser Effekte sind nicht durch eine Pyrimidingabe umkehrbar, was auf eine DHODH-unabhängige Wirkungsweise hinweist (230, 231). Teriflunomid hemmt *in vitro* zusätzlich Jak 3, MAPK, COX 2 und NF-κB (12). Erythrozyten enthalten nicht die mitochondriale DHODH, jedoch sind einige dieser zusätzlichen Strukturen an der Eryptose der Erythrozyten beteiligt (7).

Teriflunomid löst die Apoptose in verschiedenen Zelltypen aus (232-236). Deshalb kann Teriflunomid möglicherweise als Krebsmedikament verwendet werden (237, 238). Die Substanz zeigt jedoch auch anti-apoptotische Effekte in Experimenten mit Hepatozyten (239). In Analogie zur Apoptose könnte Teriflunomid die Eryptose beeinflussen.

Im steady state liegt die maximale Plasmakonzentration von Teriflunomid im Bereich von 20 und 45 µg/ml bei einer täglichen Dosis von 7 und 14 mg (15). Die maximale Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten von Leflunomid ist 35 µg/ml bei einer Dosis von 20 mg/Tag (240). Teriflunomid wirkt immunmodulatorisch anstatt immunsuppressiv und die Einnahme zieht keine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen nach sich (241). Zu den Nebenwirkungen einer Therapie mit Teriflunomid gehören milde Neutropenie und

Lymphozytopenie, erhöhte Alanin-Aminotransferasen, Haarausfall, Übelkeit, Diarrhoe, Hypertonie und periphere Neuropathie (241).

Wie genau Teriflunomid wirkt, ist noch nicht vollständig verstanden (242). Die Erforschung von Teriflunomid anhand der roten Blutzellen könnte zu einem besseren Verständnis der DHODH-unabhängigen Medikamentenwirkung führen, weil in Erythrozyten Vorgänge ohne Mitochondrien ablaufen (4). Teriflunomid wirkt auf verschiedene Zelltypen und beeinflusst molekulare Mechanismen, die auch in der Eryptose enthalten sind (12). Mit der Hemmung der Eryptose kann möglicherweise in die Pathogenese von Krankheiten mit erhöhter Eryptoserate therapeutisch eingegriffen werden (165). Deshalb wurde Teriflunomid im Rahmen dieser Arbeit darauf getestet, ob das Medikament die Eryptose abschwächt.

## 1.4 Fragestellung

Die Erythrozyten sind die zahlreichsten Blutzellen. Sie erfüllen wichtige Aufgaben im Gastransport und Säure-Basen-Haushalt. Außerdem beeinflussen sie die Blutgerinnung. Sie werden im Knochenmark gebildet, zirkulieren für 100 - 120 Tage im Blut und werden aufgrund geringer Flexibilität und Veränderungen an der Plasmamembran von Makrophagen abgebaut. Ein erhöhter Abbau kann über einen Mangel an Erythrozyten zur Anämie führen, was sich negativ auf die Gesundheit auswirkt. (siehe Kapitel 1.1)

Der suizidale Zelltod der Erythrozyten, die Eryptose, ist von einer PS-Exposition und Zellschrumpfung gekennzeichnet. Zu den Signalwegen gehören die  $[Ca^{2+}]_i$ , oxidativer Stress, Ceramid-Bildung und Kinasenaktivität. Die Erythrozyten werden aufgrund ihrer PS-Exposition von Makrophagen phagozytiert, was dem Organismus als Schutz vor einer Hämolyse dient. Allerdings kann die Eryptose die Entwicklung einer Anämie befördern und die Thrombusbildung verstärken. Die Eryptose ist in etlichen Erkrankungen zu finden, unter anderem bei der fortgeschrittenen Niereninsuffizienz, Malaria und malignen Krebserkrankungen. Sie wird auch von zahlreichen Medikamenten ausgelöst. (siehe Kapitel 1.2)

Lapatinib wird als Tyrosinkinase-Inhibitor zur Behandlung von Her-2-positivem Mammakarzinom eingesetzt und Regorafenib, ein Multikinase-Inhibitor, kommt in der Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen zum Einsatz. Die Nebenwirkung beider Medikamente beinhaltet Anämie. Teriflunomid und das verwandte Leflunomid werden bei Multipler Sklerose, rheumatischer Arthritis und Psoriasis-Arthritis eingesetzt. Teriflunomid wirkt immunmodulierend und beeinflusst die Apoptose. Welchen direkten Einfluss die Substanzen auf die Erythrozyten nehmen, ist noch nicht bekannt. (siehe Kapitel 1.3)

Die Eryptose ist ein Forschungsfeld, das nun fast zwei Jahrzehnte besteht. Aktuell wird daran geforscht, ihre Anwendungsmöglichkeiten zur Entfaltung zu bringen (165). Dafür ist es wichtig, die Auslöser der Eryptose zu kennen und ihr Vorkommen in Krankheiten beschreiben zu können. Ein Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob die Substanzen Lapatinib und Regorafenib die Eryptose der roten Blutzellen auslösen und auf welche Weise dies geschieht. Die

PS-Exposition und die Zellschrumpfung werden dabei als ausschlaggebendes Charakteristikum für Eryptose gesehen. Zwar sind durch die *in vitro* Experimente keine konkreten Aussagen über Auswirkungen im Organismus ableitbar, sie könnten jedoch auf die Eryptose als Grund der Anämie bei Therapie mit Lapatinib und Regorafenib hinweisen (8). Der Grund wäre potentiell therapierbar, wenn sich die Hemmung der Eryptose in klinischen Studien als vorteilhaft erweist (8). Letztendlich muss dafür eine wirkungsvolle anti-eryptotische Therapie entwickelt werden, um die negativen Auswirkungen der Eryptose abschwächen zu können. Deshalb ist es ein weiteres Ziel der Arbeit, zu erforschen, ob und wie Teriflunomid die Eryptose beeinflusst. Die Ergebnisse könnten weitere Informationen über die Wirkmechanismen von Teriflunomid liefern und eine regulierende Wirkung auf die Eryptose offenbaren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Erythrozyten

Lithium-Heparin-antikoagulierte Blutproben wurden von gesunden Probanden abgenommen und freundlicherweise von der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen bereitgestellt. Die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Tübingen genehmigte die Studie an humanen Blutzellen (184/2003 V). 1 ml der Lithium-Heparin-antikoagulierten Blutproben wurde mit 3 ml Ringerlösung verdünnt und 20 Minuten bei 120 x g und + 20 °C zentrifugiert. Der Überstand aus verdünntem Plasma, Blutplättchen und weißen Blutkörpern wurde abpipettiert und verworfen. Das so gewonnene Erythrozytenkonzentrat wurde bis zur Verwendung maximal 3 Tage bei + 4 °C aufbewahrt.

#### 2.1.2 Lösungen

Die in den Experimenten verwendeten Lösungen wurden eigenständig zubereitet. Die **Ringerlösung** ähnelt dem Blutplasma in der Elektrolytzusammensetzung, dem pH-Wert (7,4) und der Glukosekonzentration (vgl. Tab. 1). In ihr können die Erythrozyten viele Stunden überdauern und sie dient als Medium, in dem der Einfluss von Stressoren auf die Zellen getestet wird (243).

Erythrozyten benötigen Glukose, um Zellfunktion aufrecht zu erhalten. Wenn diese fehlt, verursacht der Energiemangel die Eryptose (siehe Abschnitt 1.2.5). Die Ringerlösung ohne Glukose (vgl. Tab. 2) wurde verwendet, um den Einfluss von Testsubstanzen auf die Eryptose unter Energiemangel zu ermitteln.

Calcium ist ein wichtiger Bestandteil von Signalwegen. Der Calciumeinstrom in die Zelle ist einer der charakteristischen Signalwege der Eryptose (siehe Abschnitt 1.2.3). Die Verwendung einer Lösung ohne Calcium offenbart, ob Eryptose abhängig oder unabhängig von einem Calciumeinstrom stattfindet (vgl. Tab. 3).

**Tab. 1:** Zusammensetzung der Ringerlösung

<b>Substanz</b>	<b>Menge für 1000 ml (g)</b>
<b>NaCl</b>	7,305
<b>KCl</b>	0,373
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,296
<b>HEPES</b>	7,674
<b>Glukose</b>	0,901
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,111
<b>NaOH</b>	0,541
<b>H<sub>2</sub>O</b>	982,800

Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>),  
 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>),  
 Natriumhydroxid (NaOH), Wasser (H<sub>2</sub>O)

**Tab. 2:** Zusammensetzung der Ringerlösung ohne Glukose

<b>Substanz</b>	<b>Menge für 500 ml (g)</b>
<b>NaCl</b>	3,653
<b>KCl</b>	0,186
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,148
<b>HEPES</b>	3,837
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,055
<b>NaOH</b>	0,271
<b>H<sub>2</sub>O</b>	491,850

Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>),  
 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>),  
 Natriumhydroxid (NaOH), Wasser (H<sub>2</sub>O)

**Tab. 3:** Zusammensetzung Ringerlösung ohne Calcium

<b>Substanz</b>	<b>Menge für 500 ml (g)</b>
<b>NaCl</b>	3,653
<b>KCl</b>	0,186
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,148
<b>HEPES</b>	3,837
<b>Glukose</b>	0,451
<b>EGTA</b>	0,190
<b>NaOH</b>	0,271
<b>H<sub>2</sub>O</b>	491,265

Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), Natriumhydroxid (NaOH), Wasser (H<sub>2</sub>O)

Der **Annexin-Wasch-Puffer** (AWB) ist eine Ringerlösung mit erhöhtem Calciumgehalt. In der Lösung bindet Annexin-V an Phosphatidylserin.

**Tab. 4:** Zusammensetzung des Annexin-Wasch-Puffers (AWB)

<b>Substanz</b>	<b>Menge für 500 ml (g)</b>
<b>NaCl</b>	3,653
<b>HEPES</b>	1,192
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,277
<b>NaOH</b>	0,084
<b>H<sub>2</sub>O</b>	494,794

Natriumchlorid (NaCl), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), Natriumhydroxid (NaOH), Wasser (H<sub>2</sub>O)

Dubleccos Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) ohne Calcium und Magnesium (Gibco Life Technologies, Grand Island, New York) ist ein Puffermedium. Bovines Serumalbumin (BSA; Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) ist Albumin aus Rinderblut. Die **PBS - BSA Lösung** besteht aus 0,05 g BSA in 50 ml PBS und verringert das unspezifische Binden von Antikörpern, die zur Detektion von Ceramid genutzt wurden (243).

### 2.1.3 Substanzen und Markierung von Zellstrukturen

Die **Testsubstanzen** Regorafenib (MedChem Express, Princeton, USA), Lapatinib (MedChem Express, Princeton, USA) und Teriflunomide (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in Konzentrationen von 1 - 50 mg/ml gelöst und bei - 20 °C bis zur Verwendung gelagert.

**Ionomycin** (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) ist ein Calcium-Ionophor und bewirkt eine Überflutung der Zellen mit Calciumionen (39). Innerhalb einer Stunde wird dadurch Eryptose ausgelöst.

**Tert-Butylhydroperoxid** (t-BOOH; Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) ist ein Oxidationsmittel und verursacht oxidativen Stress. Auch t-BOOH löst innerhalb einer Stunde Eryptose aus (39).

**SB 203580** (Tocris bioscience, Bristol, UK) ist ein p38 MAPK Inhibitor und kann Signalwege der Eryptose hemmen (67).

**Staurosporin** (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) inhibiert mehrere Kinasen, unter anderem die PKC, welche während der Eryptose aktiv sein kann (85).

**Annexin-V-FITC** (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) besteht aus dem Protein Annexin-V, das an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) angehängt ist. Das Protein bindet calciumabhängig mit hoher Affinität an Phosphatidylserin (PS). Das FITC ist ein Fluorophor, es nimmt Licht einer bestimmten Wellenlänge auf und emittiert es mit einer höheren Wellenlänge. Die an PS gebundene Menge des Annexin-V-FITC kann somit als Fluoreszenzintensität detektiert werden und folglich auch das Ausmaß der PS-Exposition (243).

**Fluo-3/AM** (Biotium, Hayward, USA) wird zur Calciumdetektion verwendet. Das mit Acetoxymethyl (AM) veresterte Derivat des Fluo-3 kann keine Calciumionen binden. Nachdem es allerdings die Zellmembran passiert hat, bewirken

Esterasen eine Abspaltung der Acetoxymethylgruppe und Fluo-3 wird in Kontakt mit Calciumionen zu einem Fluorophor. Somit wird die intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) erfasst (243).

Das **2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat** (DCFDA; Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) kann die Zellmembran passieren und wird durch Esterasen deacetyliert und durch reaktive Sauerstoffspezies zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. DCF ist ein Fluorophor. Es wird zur Messung der ROS verwendet (243).

**Anti-Ceramid Antikörper** (Klon MID 15B4, Alexis, Grünberg, Germany) sind von Mäusen entnommene Antikörper, die Ceramid spezifisch binden. Diese können anschließend von IgG / IgM Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Germany) erkannt werden, die von Ziegen stammen und mit dem Fluorophor FITC konjugiert sind (243).

#### **2.1.4 Messgerät und Software**

Für die **Durchflusszytometrie** wurde das FACSCalibur (BD, Heidelberg, Germany) verwendet und mit der Software BD CellQuest Pro™ Version 5.2.1 (BD, Heidelberg, Germany) bedient.

Die **statistische Auswertung** erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, Version 5.03 (GraphPad Software, California, USA).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Eigenschaften einer großen Anzahl an Zellen. Die zu untersuchenden Zellen werden dabei aus der Zellsuspension gesogen und in einem permanenten flüssigen Strom transportiert. Sie passieren anschließend Laserstrahlen und Detektoren, welche Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität messen.

Mit der Durchflusszytometrie wurden in dieser Arbeit 50.000 Erythrozyten pro gemessener Probe analysiert. Um die Parameter der Eryptose als Fluoreszenzintensität messbar zu machen, wurden die Erythrozyten mit Annexin-V-FITC, Fluo-3, DCFDA und Anti-Ceramid Antikörper markiert. Das Messgerät FACSCalibur besitzt blaue Argon-Ionen-Laser, mit denen die markierten Zellbestandteile mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurden. Die Fluoreszenzintensität des emittierten Lichts der Wellenlänge 530 nm konnte mit dem FL-1 Kanal detektiert werden. Weiterhin wurde anhand des Vorwärtsstreulichts (FSC - engl. Forward Scatter) die Zellgröße bzw. die Zellschrumpfung gemessen. Je kleiner der FSC, desto kleiner sind die Zellen.

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, weil sie standardmäßig als robuste und bestätigte Methode zur Detektion von Eryptose angewandt wird und einfach zu erlernen ist (244).

### **2.2.2 Aufbau der Experimente**

In 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen wurden 4 µl Erythrozytenkonzentrat in 1 ml Ringerlösung gegeben, sodass der Hämatokrit 0,4 % betrug. Dazu wurden die Testsubstanzen in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt, vermischt und 48 Stunden bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wurden die Erythrozyten per Durchflusszytometrie auf Parameter der Eryptose analysiert. In verschiedenen Experimenten ersetzte eine modifizierte Lösung die Ringerlösung oder es wurden weitere Substanzen hinzugefügt, um bestimmte Reaktionen der Erythrozyten hervorzurufen. Bei Versuchen mit Ionomycin und

t-BOOH wurde nur für 60 Minuten inkubiert, weil durch die Substanzen eine Reaktion der Erythrozyten rascher auftritt.

Für jedes Experiment wurden die Testsubstanzen an Erythrozyten von 3 bis 8 Probanden getestet. Folglich wurden mehrere Experimente für die Messung eines Parameters durchgeführt, um eine aussagekräftige Anzahl zu erreichen. Weil Erythrozyten von unterschiedlichen Probanden verschieden stark auf die Stimuli der Eryptose reagieren, wurden Erythrozyten vom gleichen Spender jeweils für Kontroll - und Testproben verwendet. Um eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel DMSO auszuschließen, wurden Kontrollproben mit der maximal verwendeten DMSO Menge hinzugefügt.

Um den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden die Substanzen in Konzentrationen getestet, die die maximale Plasmakonzentration der Medikamente nicht überschreitet (15, 194, 218).

### 2.2.3 Messungen

**Phosphatidylserin (PS)-Exposition und Zellgröße:** Nach der Inkubationszeit wurde den Proben 150 µl Zellsuspension entnommen, diese auf 96-Wellschalen (engl. 96-well plate) bei 1600 RPM für 3 Minuten bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Zu den auf der Wellschale haftenden Erythrozyten wurden 150 µl einer 1:200 in AWB verdünnten Annexin-V-FITC Lösung gegeben und sie wurden 15 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Für die anschließende Messung der Annexin-V-Bindung mit dem FACSCalibur wurde die Fluoreszenzintensität zur Unterscheidung von zwei Zellgruppen genutzt. Der Marker M1 erfasst Zellen in einem Bereich mit hoher Fluoreszenz und beinhaltet nur ca. 1% der Zellen des Kontrollansatzes. Der Bereich wurde bei jeder Messung der Annexin-V-Bindung mittels der ersten Kontrollprobe festgelegt und die Detektorstärke des FL-1 Kanals für die Messung weiterer Proben beibehalten. Zeitgleich mit der Annexin-V-Bindung wurde der FSC als geometrischer Mittelwert ermittelt. Als untere Schwelle wurde der Wert 52 in willkürlicher Einheit (a.u. - engl. arbitrary unit) festgelegt. Mit der ersten Kontrollprobe wurde der FSC auf 500 a.u. eingestellt und die Detektorstärke für weitere Proben beibehalten.

**Intrazelluläre Calciumaktivität ( $[Ca^{2+}]_i$ ):** Den Proben wurden ebenfalls 150  $\mu$ l entnommen und auf 96-Wellschalen bei 1600 RPM für 3 Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Erythrozyten in 150  $\mu$ l AWB mit 5  $\mu$ M Fluo-3/AM gelöst. Anschließend wurde 30 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem FACSCalibur. Mit der ersten Kontrollprobe wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz Intensität auf 20 a.u. eingestellt und die Detektorstärke für weitere Proben beibehalten.

**Reaktive Sauerstoffspezies (ROS):** Den Proben wurden 150  $\mu$ l Zellsuspension entnommen, auf 96-Wellschalen bei 1600 RPM für 3 Minuten bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Anschließend wurde 150  $\mu$ l Ringerlösung mit DCFDA (10  $\mu$ M) hinzugefügt. Die behandelte Probe wurde 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert und danach zweimal durch Zugabe von 150  $\mu$ l Ringerlösung und anschließender Zentrifugation gewaschen. Die Messung erfolgte mit dem FACSCalibur nach Einstellung des geometrischen Mittelwerts der Fluoreszenz Intensität auf 15 a.u. mittels der ersten Kontrollprobe.

**Ceramid-Bildung:** Nach Entnahme von 100  $\mu$ l Zellsuspension, Zentrifugation auf 96-Wellschalen bei 1600 RPM und 20 °C für 3 Minuten und Abschütten des Überstands wurde 100  $\mu$ l PBS mit 1% BSA und Anti-Ceramid Antikörper (0,1  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde einmal mit PBS - BSA gewaschen und mit FITC konjugierten Antikörpern, 1:50 verdünnt in 50  $\mu$ l PBS - BSA, bei 37 °C unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS - BSA wurden 200  $\mu$ l PBS - BSA hinzugefügt und die Suspension mit dem FACSCalibur gemessen. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz Intensität der ersten Kontrollprobe wurde auf 15 a.u. eingestellt und die Detektorstärke für weitere Proben beibehalten.

#### **2.2.4 Schaubilder, Auswertung und Statistik**

Originale Histogramme, die eine Kontrollprobe (graue Fläche) und den Einfluss der Testsubstanz (schwarze Linie) übereinanderlegen, stammen von der Messung des gleichen Probanden und wurden mit BD CellQuest Pro™ erstellt. Die geometrisch gemittelten Werte des FSC, der Fluo-3-Fluoreszenz, der DCFDA-Fluoreszenz und der Ceramid-abhängigen-Fluoreszenz sowie der Anteil Annexin-V-bindender Zellen in Prozent (Marker M1) wurden für die einzelnen Proben ebenfalls mit BD CellQuest Pro™ ermittelt.

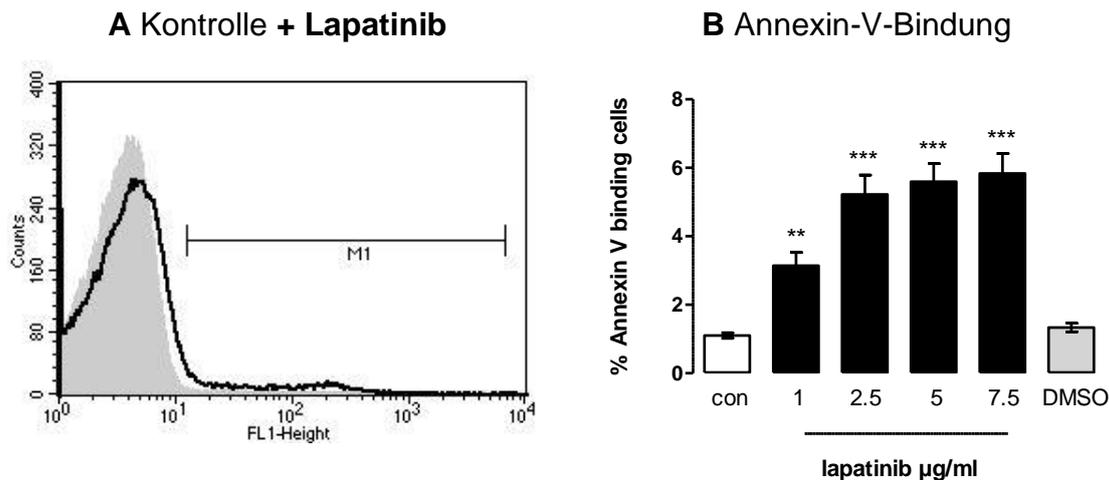
Mit dem Programm GraphPad Prism wurden anschließend das arithmetische Mittel mit entsprechenden Standardfehlern (SEM) berechnet, Diagramme erstellt und statistische Tests durchgeführt. Zum Vergleichen einer Probenreihe mit den Kontrollproben wurde der T-Test durchgeführt. Der Vergleich mehrerer Probenreihen mit den Kontrollproben wurde mit dem ANOVA Test und Tukey's Post Test durchgeführt. Die Signifikanzniveaus  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$  wurden ermittelt und mit \* und # in den Balkendiagrammen dargestellt. Bei den Ergebnissen der Untersuchung von Lapatinib und Regorafenib stellen \* den Einfluss des Medikaments dar und # den Einfluss zusätzlicher Faktoren. Bei Teriflunomid stellen \* die Auswirkung des verwendeten Eryptose-Stimulus dar und # verdeutlichen den Einfluss der Substanz. *N* beschreibt die Anzahl verwendeter Blutproben von unterschiedlichen Spendern.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lapatinib verursacht Eryptose

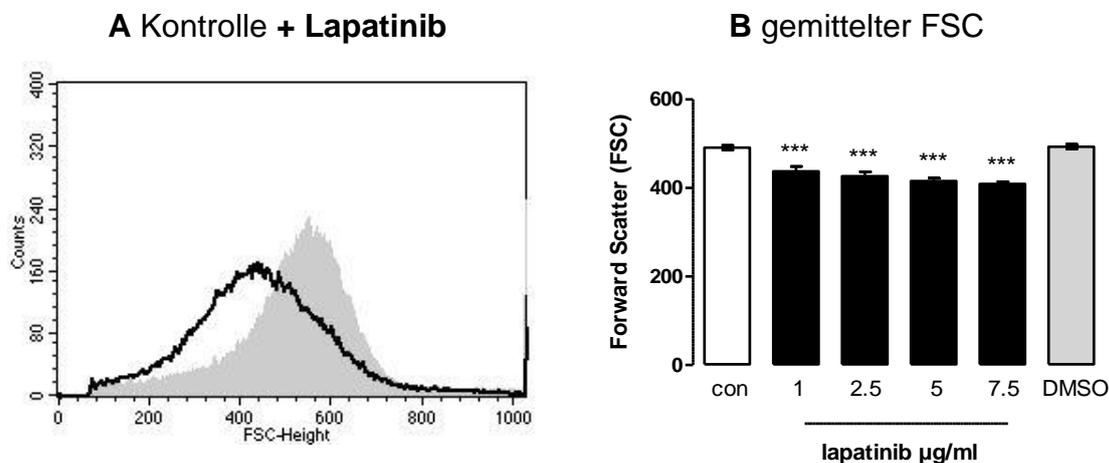
#### 3.1.1 PS-Exposition und Zellgröße

Eryptose, der suizidale Zelltod der Erythrozyten, ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Phosphatidylserin (PS)-Exposition und eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Um den Einfluss von Lapatinib auf die PS-Exposition und die Zellgröße zu erfassen, wurden Erythrozyten für 48 Stunden mit Lapatinib inkubiert und anschließend die Annexin-V-Bindung als Maß für die PS-Exposition und der FSC als Maß für die Zellgröße gemessen. Bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$  bis 7,5  $\mu\text{g/ml}$  zeigt Lapatinib gegenüber der Kontrolle eine statistisch signifikante Erhöhung der Annexin-V-bindenden Zellen (**Abb. 4**). Auf die Zellgröße hat Lapatinib bei gleichen Bedingungen einen schrumpfenden Effekt, was durch den abnehmenden FSC deutlich wird (**Abb. 5**). Demnach verursacht Lapatinib in Ringerlösung die PS-Exposition und die Zellschrumpfung der Erythrozyten.



**Abb. 4:** Einfluss von Lapatinib auf die PS-Exposition (245).

**(A)** Originales Histogramm der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5 µg/ml Lapatinib. M1 enthält den Anteil in (B) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. **(B)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=20) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (1 - 7,5 µg/ml). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO dargestellt (grauer Balken). \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Lapatinib (ANOVA, Tukey's post test).

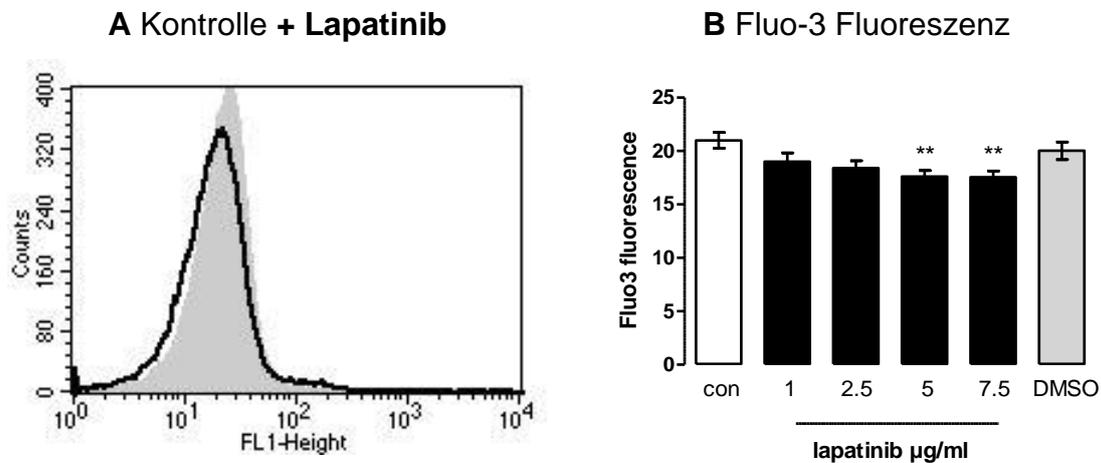


**Abb. 5:** Einfluss von Lapatinib auf die Zellgröße (245).

**(A)** Originales Histogramm des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5 µg/ml Lapatinib. **(B)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=20) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (1 - 7,5 µg/ml). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO dargestellt (grauer Balken). \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Lapatinib (ANOVA, Tukey's post test).

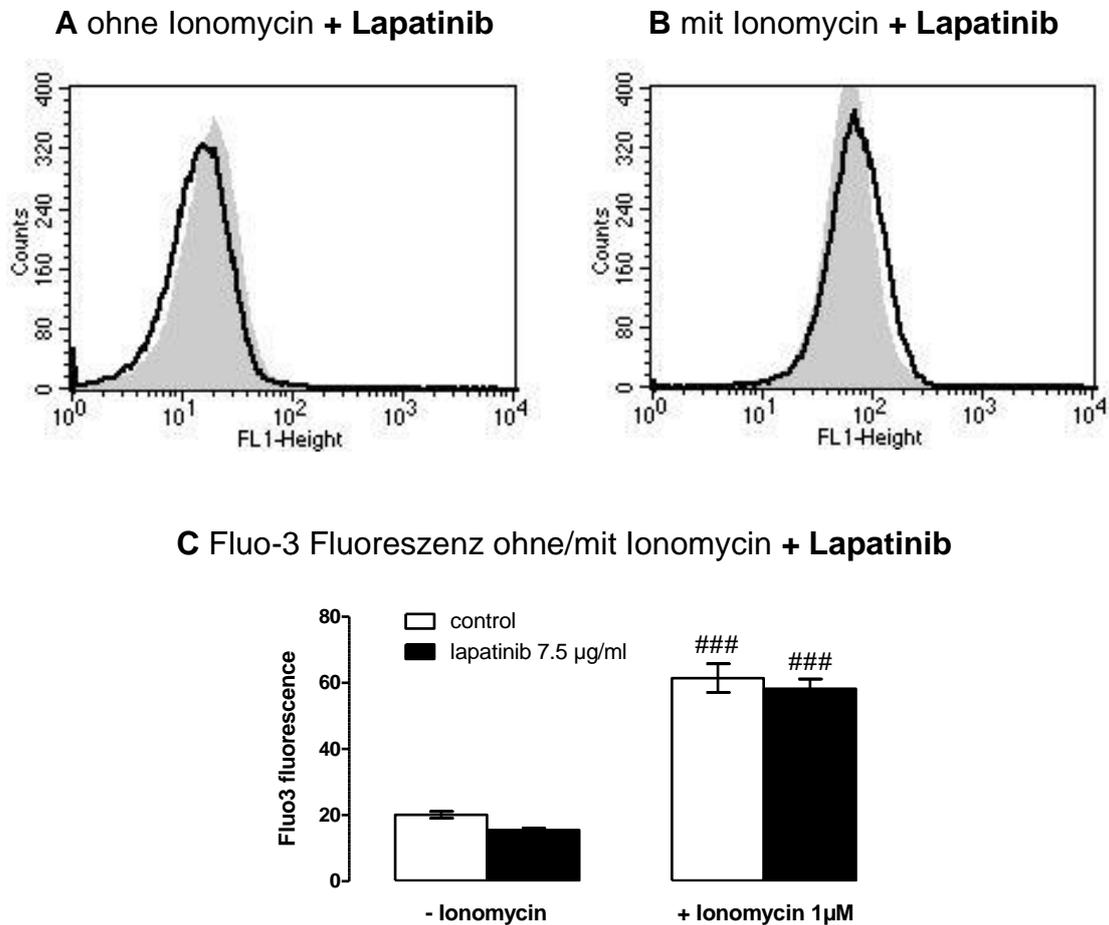
### 3.1.2 Intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )

PS-Exposition und Zellschrumpfung können durch erhöhte intrazelluläre Calciumaktivität verursacht werden. Zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration wurden Erythrozyten 48 Stunden mit Lapatinib inkubiert und anschließend die Fluo-3-Fluoreszenz gemessen. Hier zeigt sich jedoch keine Erhöhung, sondern eine Erniedrigung der Fluo-3-Fluoreszenz durch Lapatinib, statistisch signifikant bei 5 und 7.5  $\mu\text{g/ml}$  (**Abb. 6**). Um die Wirkung von Lapatinib auf die intrazelluläre Calciumaktivität weiter zu ergründen, wurden Erythrozyten mit Lapatinib, mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin (1  $\mu\text{M}$ ) und mit einer Kombination der Substanzen 60 Minuten inkubiert. Die Fluo-3-Fluoreszenz steigt bei Erythrozyten nach Inkubation mit Ionomycin rapide an (**Abb. 7 C**). 7,5  $\mu\text{g/ml}$  Lapatinib haben jedoch keinen statistisch signifikanten Effekt auf den durch Ionomycin verursachten Anstieg der Fluo-3-Fluoreszenz (**Abb. 7 B, C**).



**Abb. 6:** Einfluss von Lapatinib auf die  $[Ca^{2+}]_i$  (245).

**(A)** Originales Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5  $\mu\text{g/ml}$  Lapatinib. **(B)** Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM ( $n=17$ ) der Fluo-3-Fluoreszenz (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (1 - 7,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO dargestellt (grauer Balken). \*\*( $p<0,01$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Lapatinib (ANOVA, Tukey's post test).

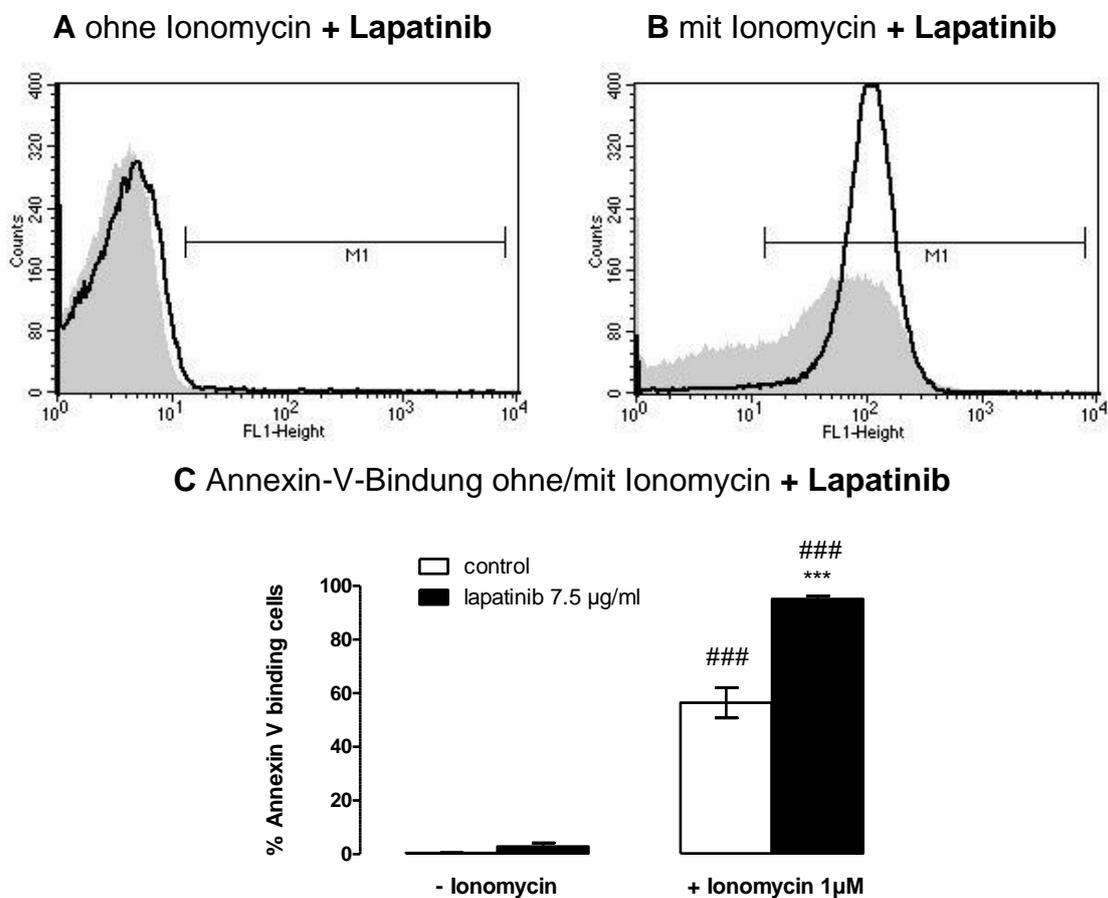


**Abb. 7:** Einfluss von Lapatinib und Ionomycin auf die  $[Ca^{2+}]_i$  (245).

(A, B) Originale Histogramme der Fluo-3-Fluoreszenz in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5 µg/ml Lapatinib, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. (C) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=10) der Fluo-3-Fluoreszenz (geom. Mittel in a.u.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (7,5 µg/ml), ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) Ionomycin (1µM). ###(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gruppen ohne Ionomycin (ANOVA, Tukey's post test).

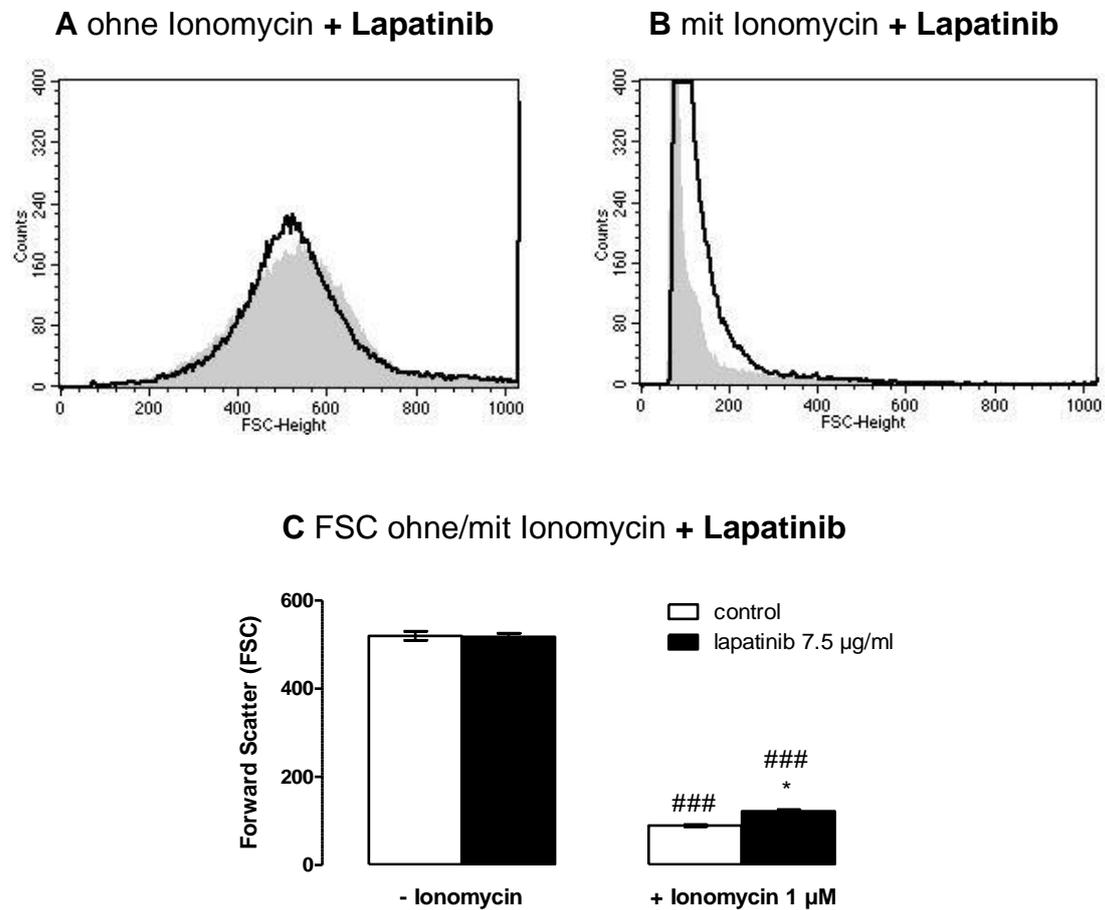
### 3.1.3 PS-Exposition und Zellgröße bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$

Durch eine Interaktion mit Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ) für 60 Minuten zeigt sich eine deutlich erhöhte PS-Exposition und eine deutlich verringerte Zellgröße der Erythrozyten (**Abb. 8, Abb. 9**). Obwohl  $7,5 \mu\text{g/ml}$  Lapatinib nach Inkubation mit Ionomycin keinen Effekt auf die Fluo-3-Fluoreszenz hat (**Abb. 7**), verstärkt die Substanz deutlich die Annexin-V-Bindung (**Abb. 8**). Gleichzeitig hat Lapatinib einen modulierenden Effekt auf die Zellgröße. Die enorme Senkung des FSC nach Behandlung mit Ionomycin wird durch Lapatinib leicht vermindert (**Abb. 9**).



**Abb. 8:** Einfluss von Lapatinib und Ionomycin auf die PS-Exposition (245).

(**A, B**) Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie)  $7,5 \mu\text{g/ml}$  Lapatinib, ohne (**A**) und mit (**B**) Ionomycin. M1 enthält den Anteil in (**C**) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. (**C**) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM ( $n=7$ ) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 60 Minuten Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib ( $7,5 \mu\text{g/ml}$ ), ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ). \*\*\*( $p<0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Lapatinib. ###( $p<0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gruppen ohne Ionomycin (ANOVA, Tukey's post test).

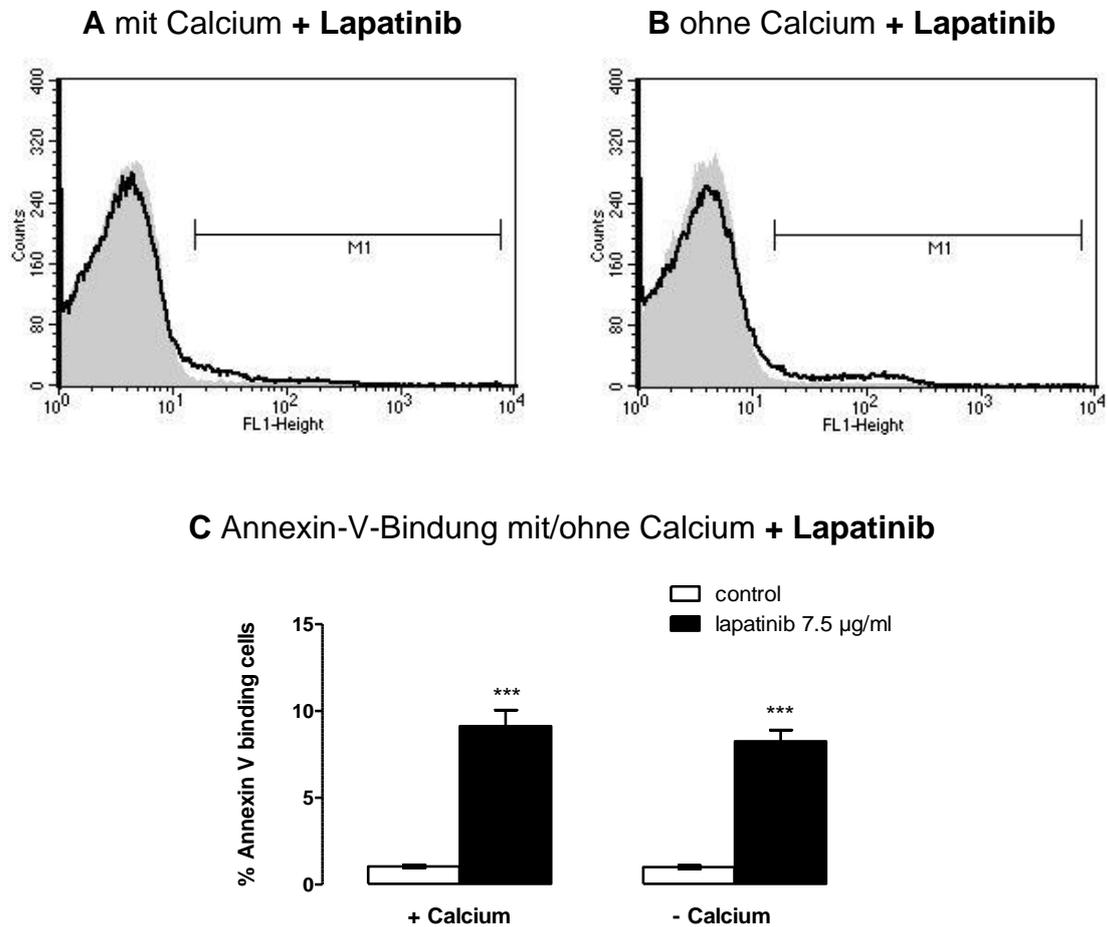


**Abb. 9:** Einfluss von Lapatinib und Ionomycin auf die Zellgröße (245).

**(A, B)** Originale Histogramme des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5 µg/ml Lapatinib, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. **(C)** Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=7) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (7,5 µg/ml), ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) Ionomycin (1 µM). \*(p<0,05) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Lapatinib. ###(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gruppen ohne Ionomycin (ANOVA, Tukey's post test).

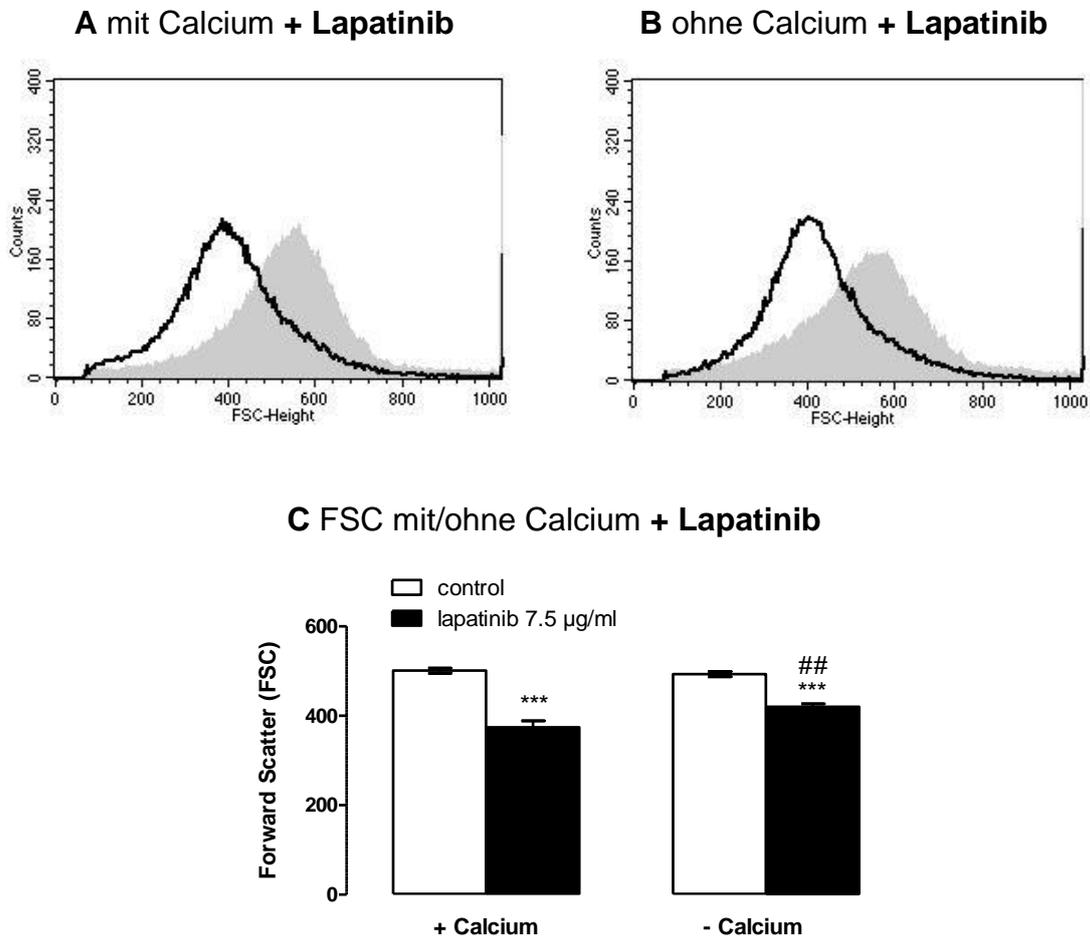
#### 3.1.4 PS-Exposition und Zellgröße bei fehlendem extrazellulärem Calcium

Um zu erfassen, ob die PS-Exposition und Zellschrumpfung abhängig von einem Calciumeinstrom abläuft, wurden Erythrozyten 48 Stunden mit und ohne extrazellulärem Calcium inkubiert und gleichzeitig die Auswirkung von Lapatinib getestet. **Abb. 10** verdeutlicht, dass 7,5 µg/ml Lapatinib auch in einem Medium ohne Calcium eine erhöhte Annexin-V-Bindung der Erythrozyten verursacht. Diese unterscheidet sich nicht signifikant von der Annexin-V-Bindung, die in normaler Ringerlösung durch Lapatinib hervorgerufen wird (**Abb. 10**). Auch die Zellschrumpfung wird bei fehlendem extrazellulärem Calcium durch 7,5 µg/ml Lapatinib verursacht (**Abb. 11**). Es zeigt sich jedoch eine Abschwächung des Effekts gegenüber der Zellschrumpfung durch Lapatinib in normaler Ringerlösung (**Abb. 11**). Somit scheint die Zellschrumpfung teilweise abhängig von einströmendem Calcium abzulaufen, die PS-Exposition jedoch nicht.



**Abb. 10:** Einfluss von Lapatinib ohne Calcium auf die PS-Exposition (245).

**(A, B)** Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5 µg/ml Lapatinib, mit (A) und ohne (B) extrazellulärem Calcium. M1 enthält den Anteil in (C) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. **(C)** Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=23) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (7,5 µg/ml), mit (linke Balken) und ohne (rechte Balken) extrazellulärem Calcium. \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu ohne Kontrollgruppen Lapatinib (ANOVA, Tukey's post test).



**Abb. 11:** Einfluss von Lapatinib ohne Calcium auf die Zellgröße (245).

**(A, B)** Originale Histogramme des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 7,5 µg/ml Lapatinib, mit (A) und ohne (B) extrazellulärem Calcium. **(C)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=23) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Lapatinib (7,5 µg/ml), mit (linke Balken) und ohne (rechte Balken) extrazellulärem Calcium. \*\*\*(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Lapatinib. ##(p<0,01) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gruppen mit extrazellulärem Calcium (ANOVA, Tukey's post test).

### 3.1.5 Oxidativer Stress und Ceramid-Bildung

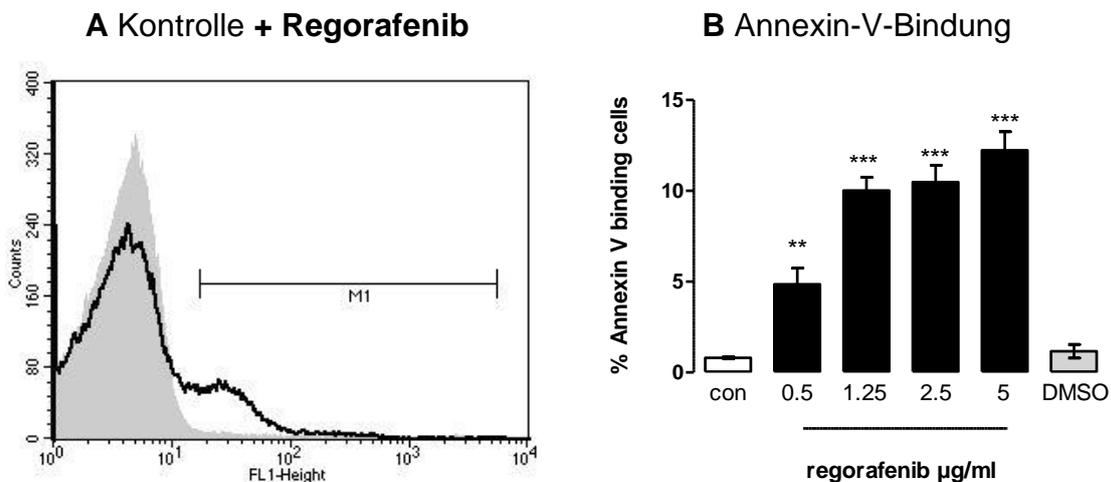
Des Weiteren wurde getestet, ob Lapatinib oxidativen Stress verursacht und dadurch die beobachteten Phänomene hervorrufen könnte. Dazu wurden Erythrozyten wieder 48 Stunden mit und ohne 7,5 µg/ml Lapatinib inkubiert und anschließend mittels DCFDA-Fluoreszenz die ROS gemessen. Es zeigt sich jedoch keine erhöhte DCFDA-Fluoreszenzintensität mit ( $15,6 \pm 0,4$  a.u., n=4) im Vergleich zu ohne ( $17,6 \pm 1,0$  a.u., n=4) Lapatinib (245).

Die beobachteten Phänomene der PS-Exposition und der Zellschrumpfung könnten auch durch Ceramid-Bildung verursacht sein. Bei einer Inkubation für 48 Stunden mit und ohne 7,5 µg/ml Lapatinib und anschließender Messung der Ceramid-Bildung mittels Antikörper zeigt sich aber auch keine erhöhte Fluoreszenzintensität der Erythrozyten mit ( $13,9 \pm 0,5$  a.u., n=4) im Vergleich zu ohne ( $14,2 \pm 0,3$  a.u., n=4) Lapatinib (245).

## 3.2 Regorafenib verursacht Eryptose

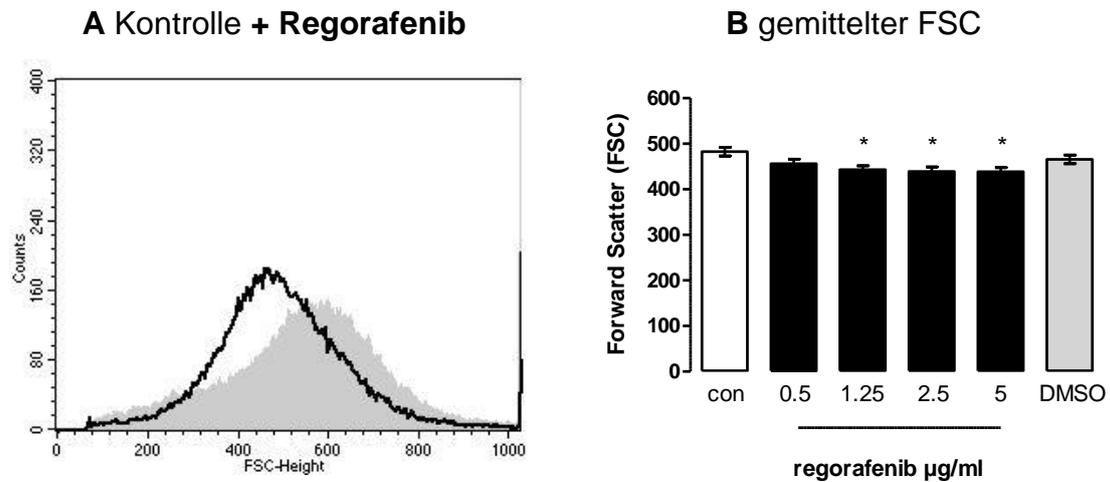
### 3.2.1 PS-Exposition und Zellgröße

Analog zu den Experimenten mit Lapatinib wurde auch Regorafenib auf die Eigenschaft, Eryptose zu verursachen, untersucht. Um die PS-Exposition und die Zellgröße zu erfassen wurden Erythrozyten mit Regorafenib 48 Stunden inkubiert und die Annexin-V-Bindung und der FSC gemessen. Auch hier zeigt sich eine erhöhte Annexin-V-Bindung gegenüber der Kontrolle in Konzentrationen von 0,5 bis 5  $\mu\text{g/ml}$  (**Abb. 12**). Der FSC nimmt bei Behandlung mit Regorafenib leicht ab, statistisch signifikant bei Konzentrationen von 1,25 - 5  $\mu\text{g/ml}$  (**Abb. 13**). Regorafenib verursacht demzufolge PS-Exposition und Zellschrumpfung, zwei wesentliche Merkmale der Eryptose.



**Abb. 12:** Einfluss von Regorafenib auf die PS-Exposition (246).

**(A)** Originales Histogramm der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5  $\mu\text{g/ml}$  Regorafenib. M1 enthält den Anteil in **(B)** berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. **(B)** Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM ( $n=20$ ) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Regorafenib (0,5 - 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO dargestellt (grauer Balken). \*\*( $p<0,01$ ), \*\*\*( $p<0,001$ ) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Regorafenib (ANOVA, Tukey's post test).



**Abb. 13:** Einfluss von Regorafenib auf die Zellgröße (246).

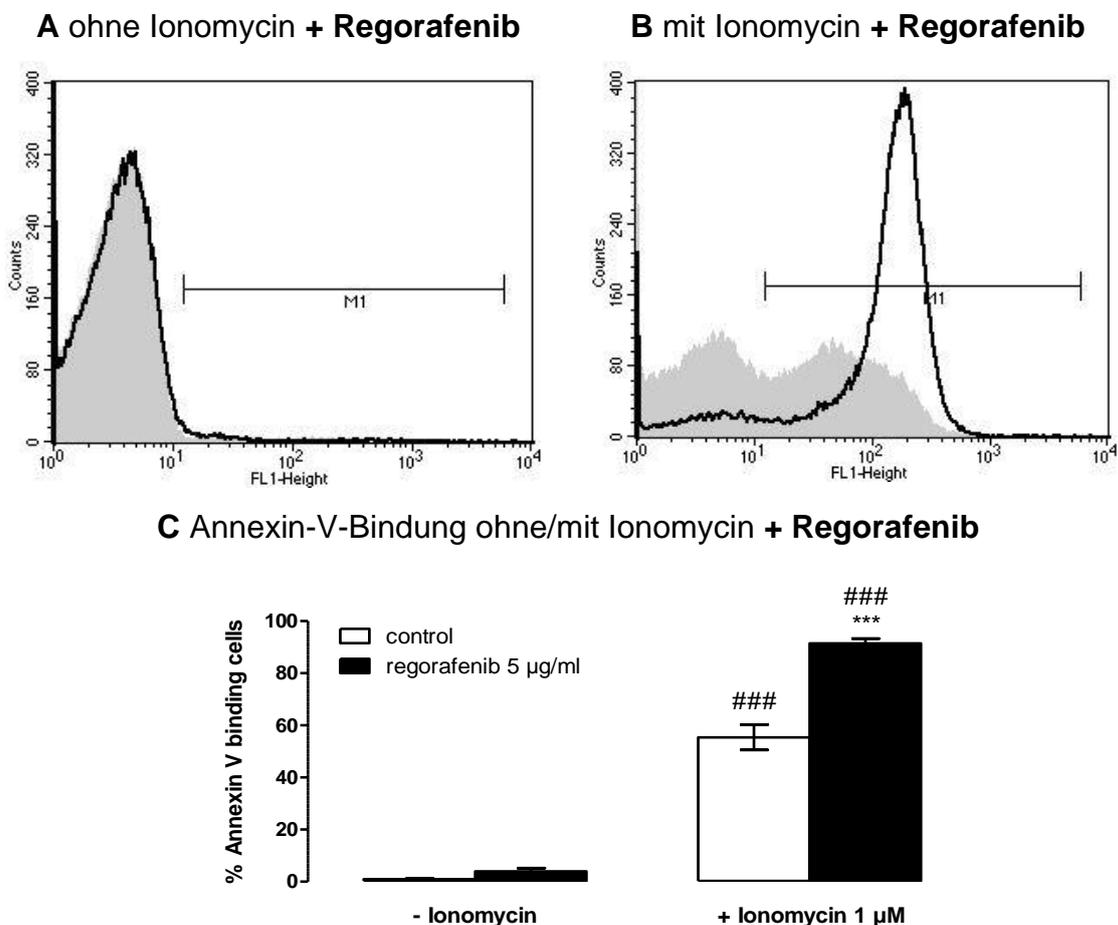
**(A)** Originales Histogramm des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5 µg/ml Regorafenib. **(B)** Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=20) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Regorafenib (0,5 - 5 µg/ml). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO dargestellt (grauer Balken). \*(p<0,05) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Regorafenib (ANOVA, Tukey's post test).

### 3.2.2 $[Ca^{2+}]_i$

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde nach 48 stündiger Inkubation der Erythrozyten mit Regorafenib als Fluo-3-Fluoreszenz bestimmt. Verglichen mit der Kontrollprobe ( $19,7 \pm 0,7$  a.u., n=12) wird die Fluo-3-Fluoreszenz durch 0,5 µg/ml Regorafenib ( $17,1 \pm 0,7$  a.u., n=13), 1,25 µg/ml Regorafenib ( $15,7 \pm 0,8$  a.u., n=13), 2,5 µg/ml Regorafenib ( $12,6 \pm 0,5$  a.u., n=13) und 5 µg/ml Regorafenib ( $12,0 \pm 0,5$  a.u., n=13) verringert (246). Das gleiche Phänomen zeigt sich nach Inkubation für 60 Minuten mit und ohne 1 µM Ionomycin. 5 µg/ml Regorafenib senken die Fluo-3-Fluoreszenz ohne Ionomycin von  $21,6 \pm 0,7$  a.u. (n=12) auf  $12,4 \pm 0,2$  a.u. (n=11) und mit Ionomycin von  $65,5 \pm 2,5$  a.u. (n=12) auf  $56,1 \pm 2,0$  a.u. (n=12) (246). Den Ergebnissen nach zu urteilen, verringert Regorafenib die Fluo-3-Fluoreszenz sowohl bei normaler als auch erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration.

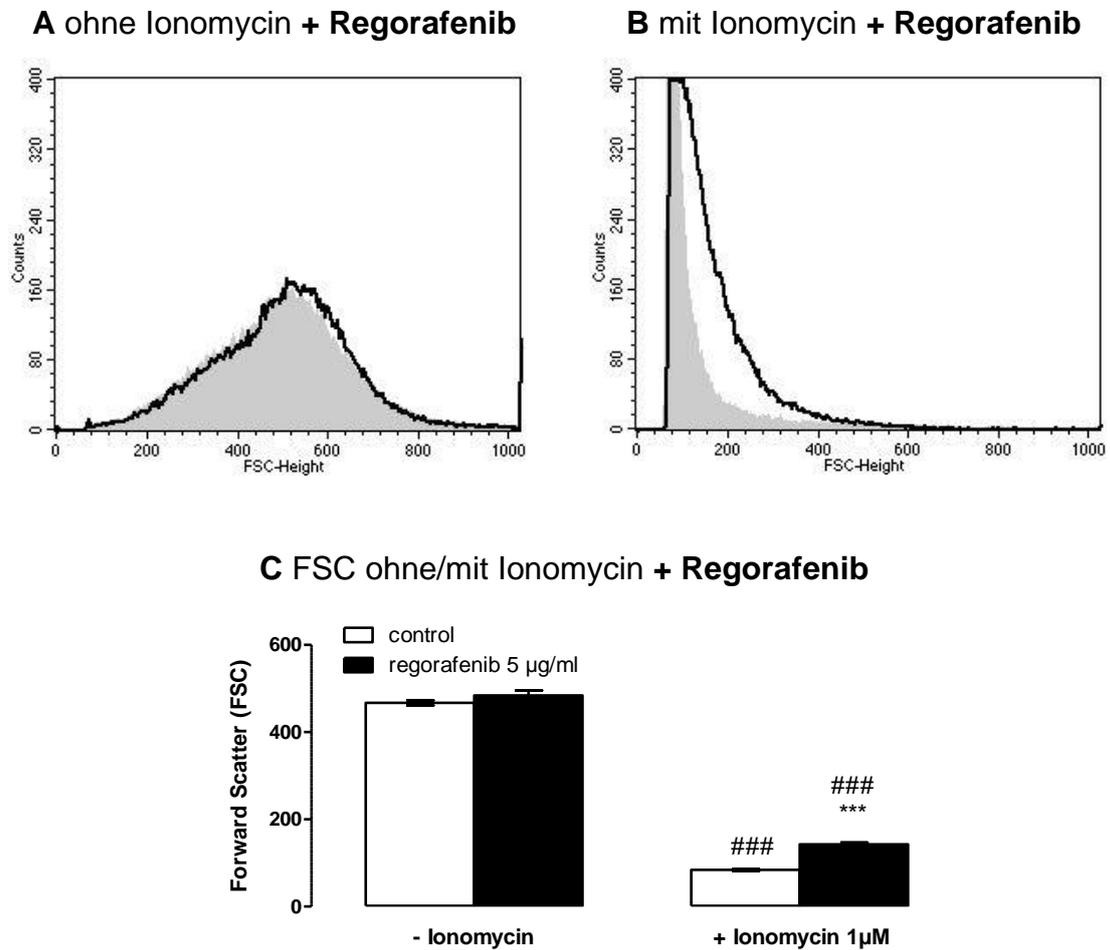
### 3.2.3 PS-Exposition und Zellgröße bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$

Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Ionomycin für 60 Minuten bewirkt eine erhöhte Annexin-V-Bindung und einen Abfall des FSC (**Abb. 14, Abb. 15**). Die zusätzliche Gabe von 5  $\mu$ g/ml Regorafenib zeigt eine deutliche Verstärkung der Annexin-V-Bindung (**Abb. 14**). Die starke Verringerung des FSC wird durch Regorafenib abgeschwächt (**Abb. 15**).



**Abb. 14:** Einfluss von Regorafenib und Ionomycin auf die PS-Exposition (246).

(**A, B**) Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5  $\mu$ g/ml Regorafenib, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. M1 enthält den Anteil in (C) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. (**C**) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=5) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 60 Minuten Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Regorafenib (5  $\mu$ g/ml), ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) Ionomycin (1 $\mu$ M). ###(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gruppen ohne Ionomycin. \*(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Regorafenib (ANOVA, Tukey's post test).

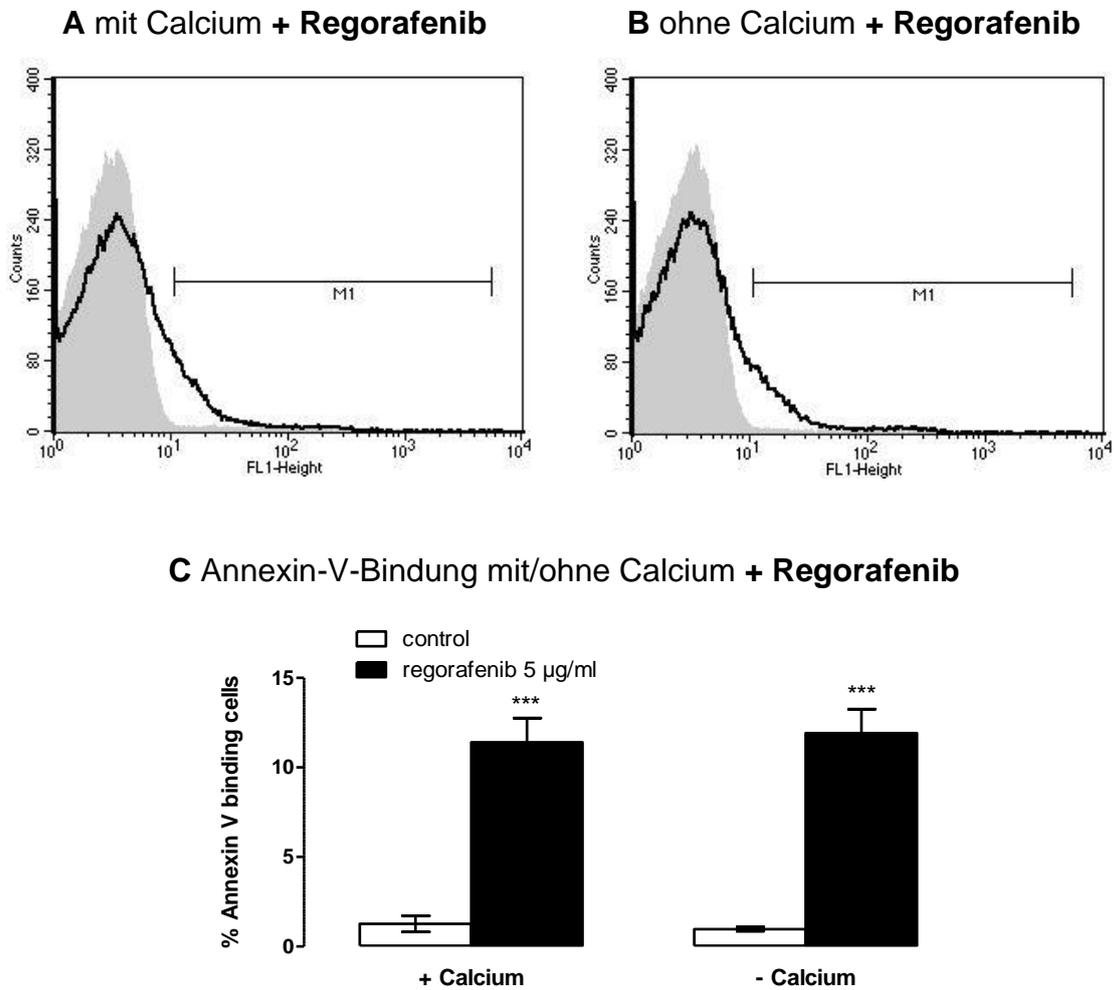


**Abb. 15:** Einfluss von Regorafenib und Ionomycin auf die Zellgröße (246).

(A, B) Originale Histogramme des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5 µg/ml Regorafenib, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. (C) Arithmetisches Mittel ± SEM (n=5) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Regorafenib (5 µg/ml), ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) Ionomycin (1µM). ###(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gruppen ohne Ionomycin. \*\*\*(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Regorafenib (ANOVA, Tukey's post test).

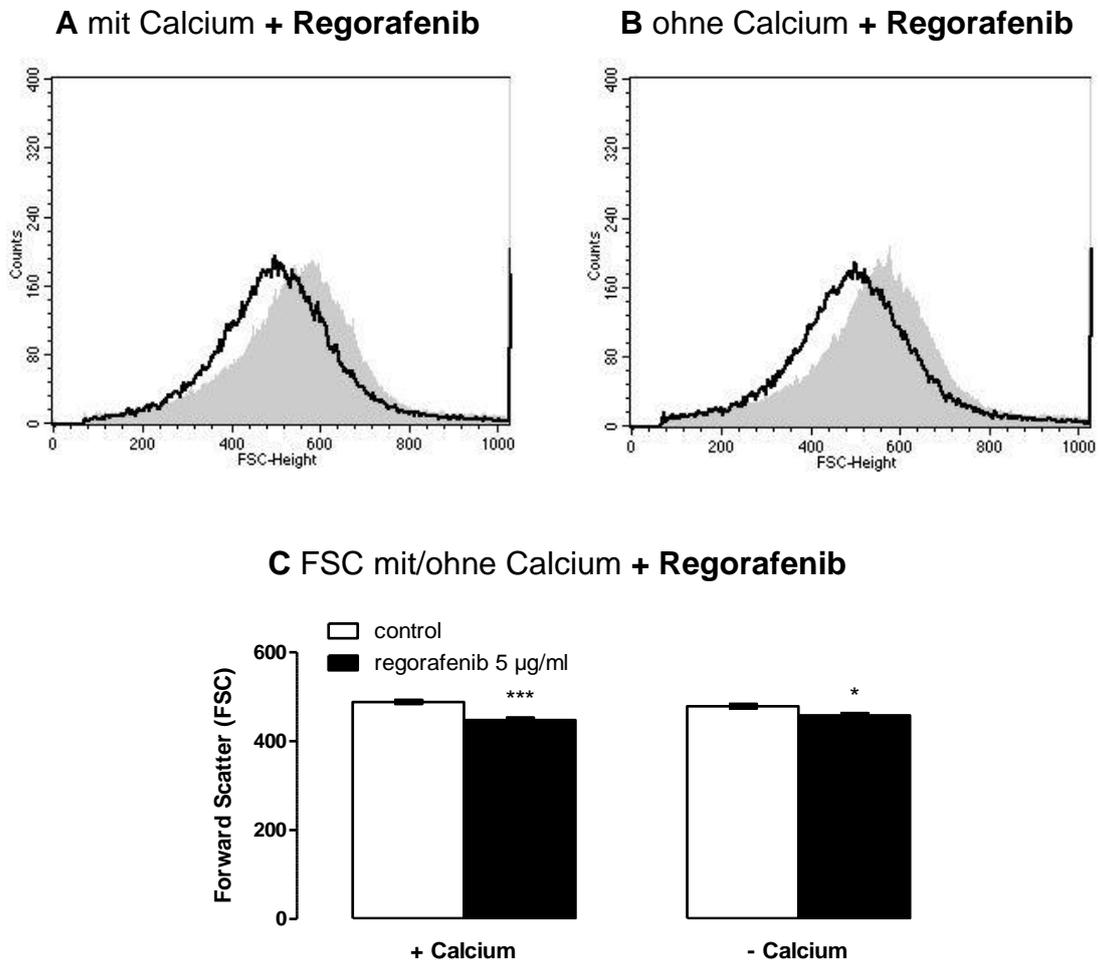
### 3.2.4 PS-Exposition und Zellgröße bei fehlendem extrazellulärem Calcium

Da Calciumeinstrom PS-Exposition und Zellschrumpfung verursacht, wurde getestet, ob die Wirkung von Regorafenib von einem Calciumeinstrom in die Zelle abhängig ist. Dafür wurden Erythrozyten in Ringerlösung mit Calcium und ohne Calcium für 48 Stunden inkubiert. 5 µg/ml Regorafenib verursachen ohne Calcium einen ähnlichen Anstieg der Annexin-V-Bindung wie mit Calcium (**Abb. 16**). Die Zellschrumpfung durch 5 µg/ml Regorafenib ist ebenfalls vorhanden und statistisch nachweisbar in den Lösungen mit und ohne Calcium (**Abb. 17**). Da sowohl Annexin-V-Bindung als auch FSC nicht signifikant unterschiedlich in An- und Abwesenheit extrazellulären Calciums ist, lässt sich feststellen, dass Regorafenib die PS-Exposition und Zellschrumpfung nicht in Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht.



**Abb. 16:** Einfluss von Regorafenib ohne Calcium auf die PS-Exposition (246).

**(A, B)** Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5 µg/ml Regorafenib, mit (A) und ohne (B) extrazellulärem Calcium. M1 enthält den Anteil in (C) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. **(C)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=20) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Regorafenib (5 µg/ml), mit (linke Balken) und ohne (rechte Balken) extrazellulärem Calcium. \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Regorafenib (ANOVA, Tukey's post test).



**Abb. 17:** Einfluss von Regorafenib ohne Calcium auf die Zellgröße (246).

**(A, B)** Originale Histogramme des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5 µg/ml Regorafenib, mit (A) und ohne (B) extrazellulärem Calcium. **(C)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=20) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Regorafenib (5 µg/ml), mit (linke Balken) und ohne (rechte Balken) extrazellulärem Calcium. \*(p<0,05), \*\*\*(p<0,001) zeigen einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Regorafenib (ANOVA, Tukey's post test).

### **3.2.5 Oxidativer Stress und Ceramid-Bildung**

Mit der Absicht, mögliche Ursachen für die Wirkung von Regorafenib zu beobachten, wurden Erythrozyten mit und ohne 5 µg/ml Regorafenib 48 Stunden inkubiert und anschließend reaktive Sauerstoffspezies als DCFDA-Fluoreszenz und die Ceramid-Bildung als Antikörper abhängige Fluoreszenzintensität erfasst. Das Ergebnis zeigt, dass die DCFDA-Fluoreszenz mit ( $15,3 \pm 0,8$  a.u., n=9) und ohne ( $15,2 \pm 0,3$  a.u., n=9) Regorafenib (5 µg/ml) ähnlich hohe Werte annimmt (246). Auch die Fluoreszenz der Anti-Ceramid Antikörper ist mit ( $14,0 \pm 0,5$  a.u., n=4) und ohne ( $15,0 \pm 0,3$  a.u., n=4) Regorafenib (5 µg/ml) nicht signifikant unterschiedlich (246). Folglich bewirkt Regorafenib weder oxidativen Stress, noch eine erhöhte Ceramid-Bildung der Erythrozyten.

### **3.2.6 Wechselwirkung mit Kinase-Inhibitoren SB 203580 und Staurosporin**

Die PS-Exposition der Erythrozyten kann durch die Aktivität verschiedener Kinasen verursacht werden, unter anderem durch die p38 MAPK oder PKC. Diese werden durch SB 203580 und Staurosporin inhibiert. Zur Überprüfung, ob Kinasen die PS-Exposition verursachen, wurden Erythrozyten mit und ohne Regorafenib bzw. mit und ohne SB 203580 oder Staurosporin 48 Stunden inkubiert und die Annexin-V-Bindung ermittelt. 5 µg/ml Regorafenib erhöht den Anteil der Annexin-V-bindenden Zellen ohne SB 203580 von  $1,3 \pm 0,1$  % (n=10) auf  $15,5 \pm 1,6$  % (n=10) gleichermaßen wie mit SB 203580 (2 µM) von  $1,2 \pm 0,1$  % (n=10) auf  $17,1 \pm 1,6$  % (n=10) (246). Ebenso erhöht 5 µg/ml Regorafenib den Anteil der Annexin-V-bindenden Zellen von  $1,3 \pm 0,1$  % (n=10) auf  $15,5 \pm 1,6$  % (n=10) ohne Staurosporin ähnlich wie von  $1,5 \pm 0,2$  % (n=10) auf  $16,3 \pm 1,8$  % (n=10) mit Staurosporin (1 µM) (246). Mit diesen Experimenten lässt sich feststellen, dass die p38 MAPK und die PKC anscheinend nicht aktiv an der PS-Exposition beteiligt sind, die durch Regorafenib ausgelöst wird.

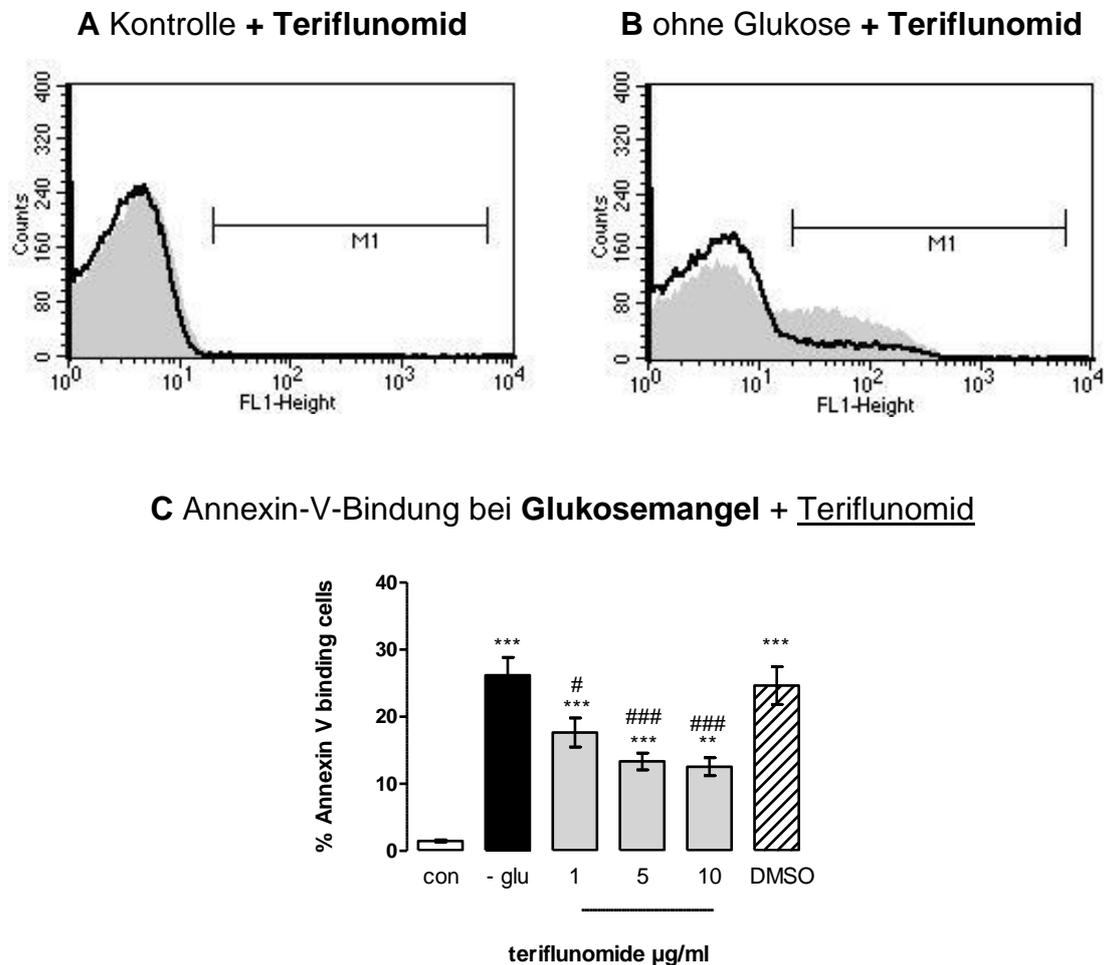
### 3.3 Teriflunomid schwächt die Eryptose ab

#### 3.3.1 PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ unter Kontrollbedingungen

Um herauszufinden, ob Teriflunomid die Erythrozyten unter experimentellen Kontrollbedingungen beeinflusst, wurden Erythrozyten 48 Stunden mit Teriflunomid inkubiert. Anschließend wurde die Annexin-V-Bindung zur Identifizierung von Erythrozyten mit erhöhter PS-Exposition, der FSC zur Einschätzung der Zellgröße und die Fluo-3-Fluoreszenz zur Detektion der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen. Der Anteil der Erythrozyten mit erhöhter Annexin-V-Bindung ist ähnlich niedrig mit 5 µg/ml Teriflunomid ( $1,0 \pm 0,1$  %,  $n=18$ ) und 10 µg/ml Teriflunomid ( $1,0 \pm 0,1$  %,  $n=19$ ) im Vergleich zu ohne Teriflunomid ( $0,9 \pm 0,1$  %,  $n=18$ ) (247). Dies spiegelt sich in den originalen Histogrammen wider (**Abb. 18 A**). Der FSC zeigt sich im Vergleich zu Erythrozyten ohne Teriflunomid ( $509,7 \pm 7,5$  a.u.,  $n=18$ ) ähnlich bei 5 µg/ml Teriflunomid ( $492,3 \pm 8,2$  a.u.,  $n=18$ ), ist jedoch leicht unterschiedlich und statistisch signifikant vermindert ( $p < 0,05$  - ANOVA, Tukey's post test) nach Inkubation mit 10 µg/ml Teriflunomid ( $481,1 \pm 6,8$  a.u.,  $n=19$ ) (247). Das originale Histogramm deutet auf diesen Sachverhalt hin (**Abb. 19 A**). Auf die Fluo-3-Fluoreszenz hat Teriflunomid im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $23,0 \pm 1,2$  a.u.,  $n=8$ ) keine Auswirkung in Konzentrationen von 5 µg/ml ( $22,7 \pm 0,9$  a.u.,  $n=8$ ) und 10 µg/ml ( $22,9 \pm 0,9$  a.u.,  $n=8$ ) (247). Dies ist auch im originalen Histogramm zu sehen (**Abb. 20 A**). Unter experimentellen Kontrollbedingungen erhöht Teriflunomid folglich nicht die PS-Exposition sowie die intrazelluläre Calcium Aktivität, jedoch schrumpfen bei 10 µg/ml die Zellen leicht.

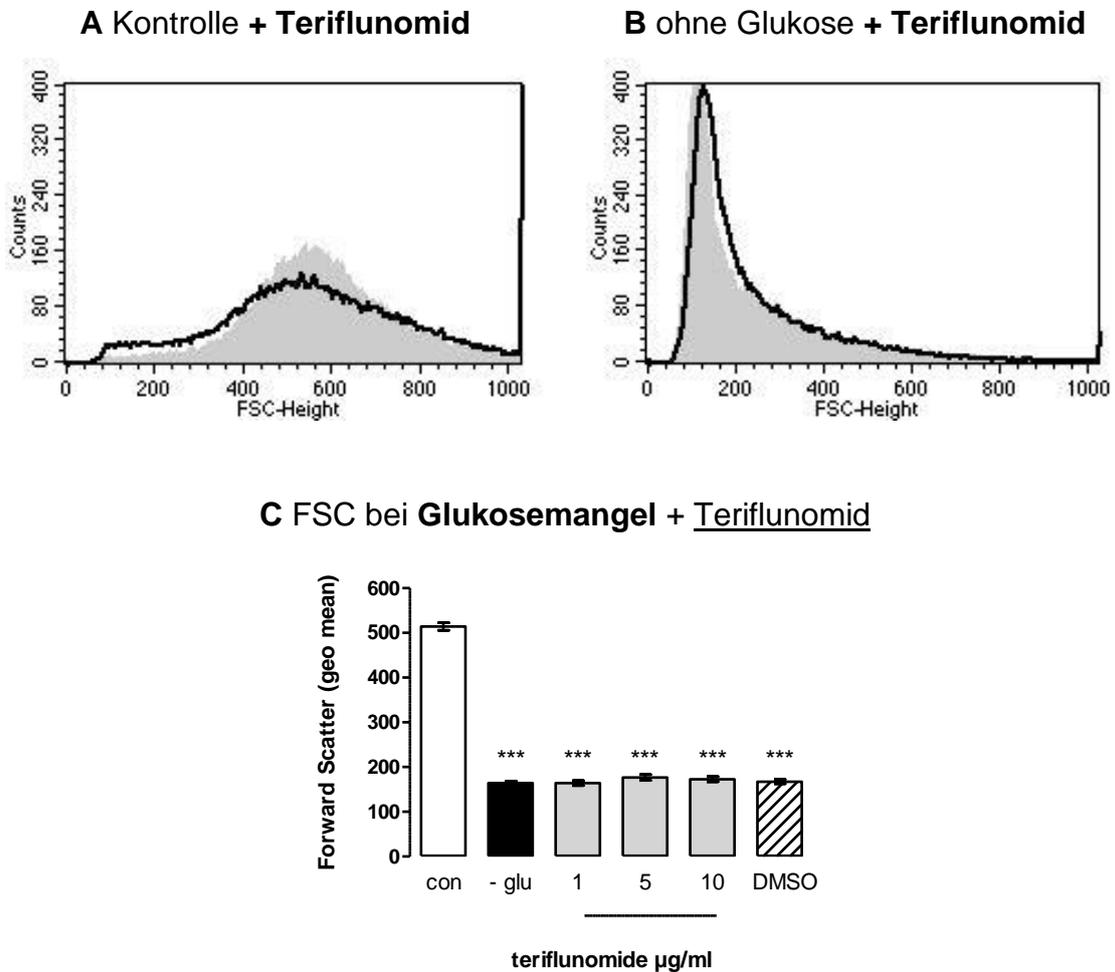
### 3.3.2 PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ bei Glukosemangel

Eryptose kann durch eine fehlende Energieversorgung der Zelle verursacht werden. Zur Untersuchung, inwieweit Teriflunomid diesen Effekt moduliert, wurden Erythrozyten 48 Stunden in Ringerlösung ohne Glukose mit oder ohne Teriflunomid inkubiert und die Annexin-V-Bindung, der FSC und die Fluo-3-Fluoreszenz gemessen. Wie zu erwarten steigt der Anteil der Erythrozyten mit erhöhter Annexin-V-Bindung bei Glukosemangel an (**Abb. 18 C**). Die Zugabe von Teriflunomid erniedrigt in Konzentrationen von 1 - 10  $\mu\text{g/ml}$  die Annexin-V-Bindung der Erythrozyten unter Glukosemangel (**Abb. 18 B, C**). Die Annexin-V-Bindung wird zwar nicht vollständig rückgängig gemacht, jedoch gesenkt, bei einigen Spendern sogar mehr als halbiert. Daraus lässt sich schließen, dass Teriflunomid die PS-Exposition abschwächt, die durch Energiemangel verursacht wird. Der FSC der Erythrozyten sinkt erwartungsgemäß deutlich nach 48 stündigem Energiemangel (**Abb. 19 C**). Es zeigt sich aber keine messbare Veränderung durch den Einsatz von Teriflunomid (**Abb. 19 B, C**). Der Glukosemangel wird begleitet von einem Anstieg der intrazellulären Calciumaktivität. Dieser ist sichtbar durch den Anstieg der Fluo-3-Fluoreszenz (**Abb. 20 C**). 5  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  Teriflunomid schwächen diesen Anstieg statistisch signifikant ab (**Abb. 20 B, C**). Somit ergibt sich das Bild, dass Teriflunomid bei Glukosemangel die erhöhte PS-Exposition und die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration abschwächt, ohne die Zellschrumpfung zu beeinflussen.



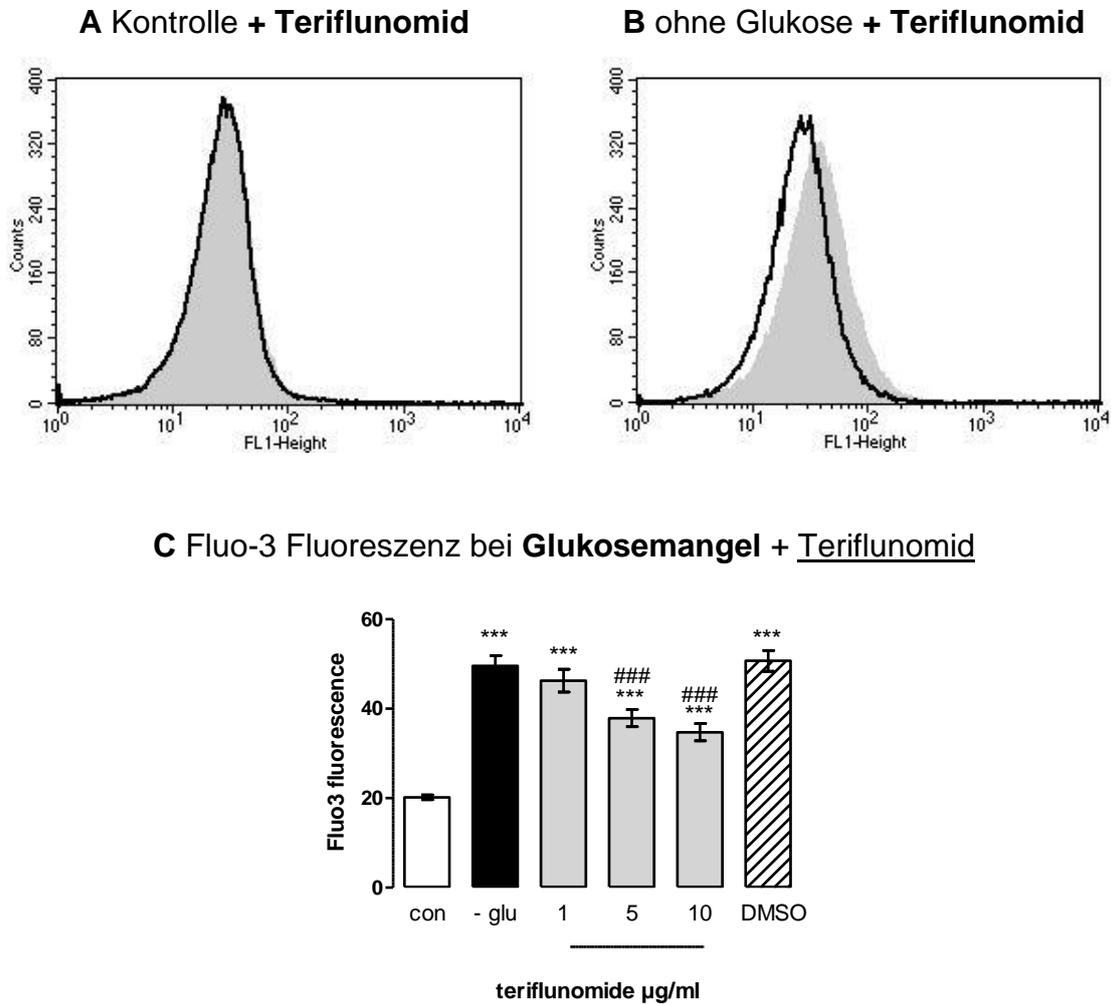
**Abb. 18:** PS-Exposition bei Glukosemangel und Einfluss von Teriflunomid (247).

(A, B) Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10 µg/ml Teriflunomid, mit (A) und ohne (B) Glukose. M1 enthält den Anteil in (C) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. (C) Arithmetisches Mittel ± SEM (n=19) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation mit (weißer Balken) und ohne (schwarzer und graue Balken) Glukose und mit 1 - 10 µg/ml Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO ohne Glukose dargestellt (gestreifter Balken). \*\*\*( $p < 0,001$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit Glukose. #( $p < 0,05$ ), ###( $p < 0,001$ ) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Gruppe ohne Glukose (ANOVA, Tukey's post test).



**Abb. 19:** Zellgröße bei Glukosemangel und Einfluss von Teriflunomid (247).

(**A, B**) Originale Histogramme des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10 µg/ml Teriflunomid, mit (A) und ohne (B) Glukose. (**C**) Arithmetisches Mittel ± SEM (n=19) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation mit (weißer Balken) und ohne (schwarzer und graue Balken) Glukose und mit 1 - 10 µg/ml Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO ohne Glukose dargestellt (gestreifter Balken). \*\*\*(p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit Glukose (ANOVA, Tukey's post test).

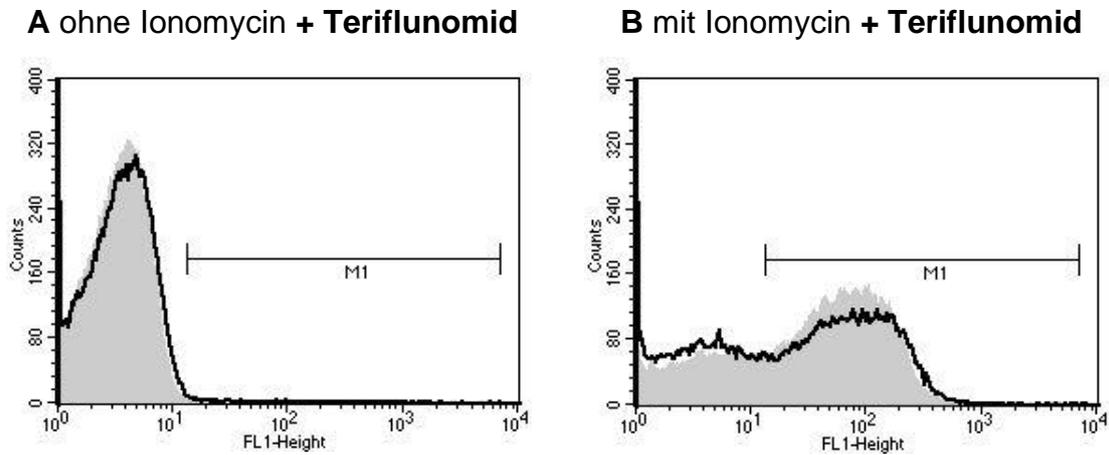


**Abb. 20:** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bei Glukosemangel und Einfluss von Teriflunomid (247).

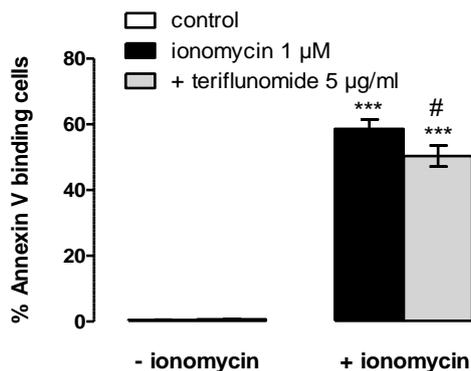
**(A, B)** Originale Histogramme der Fluo-3-Fluoreszenz in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10 µg/ml Teriflunomid, mit (A) und ohne (B) Glukose. **(C)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=19) der Fluo-3-Fluoreszenz (geom. Mittel in a.u.) nach 48 Stunden Inkubation mit (weißer Balken) und ohne (schwarzer und graue Balken) Glukose und mit 1 - 10 µg/ml Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO ohne Glukose dargestellt (gestreifter Balken). \*\*\* (p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit Glukose. ### (p<0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Gruppe ohne Glukose (ANOVA, Tukey's post test).

### 3.3.3 PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$

Um den Zusammenhang zwischen dem Effekt der abgeschwächten PS-Exposition und der intrazellulären Calciumkonzentration zu verstehen, wurden auch für Teriflunomid Versuche in Kombination mit 1  $\mu$ M Ionomycin durchgeführt. Nach einer Inkubation für 60 Minuten mit Ionomycin tritt ein Anstieg der Annexin-V-Bindung (**Abb. 21**), eine Verminderung des FSC (**Abb. 22**) und eine Erhöhung der Fluo-3-Fluoreszenz (**Abb. 23**) auf. Interessanterweise vermindern 5  $\mu$ g/ml Teriflunomid bei Ionomycin-behandelten Erythrozyten den Anteil Annexin-V-bindender Zellen statistisch signifikant (**Abb. 21**). Die Messungen des FSC und der Fluo-3-Fluoreszenz zeigen bei gleichen Bedingungen keinen Effekt von Teriflunomid auf diese Parameter (**Abb. 22, Abb. 23**). Im Ganzen betrachtet senkt Teriflunomid also die PS-Exposition der mit Calcium überfluteten Erythrozyten, ohne dabei die intrazelluläre Calciumkonzentration oder die Zellgröße zu verändern.

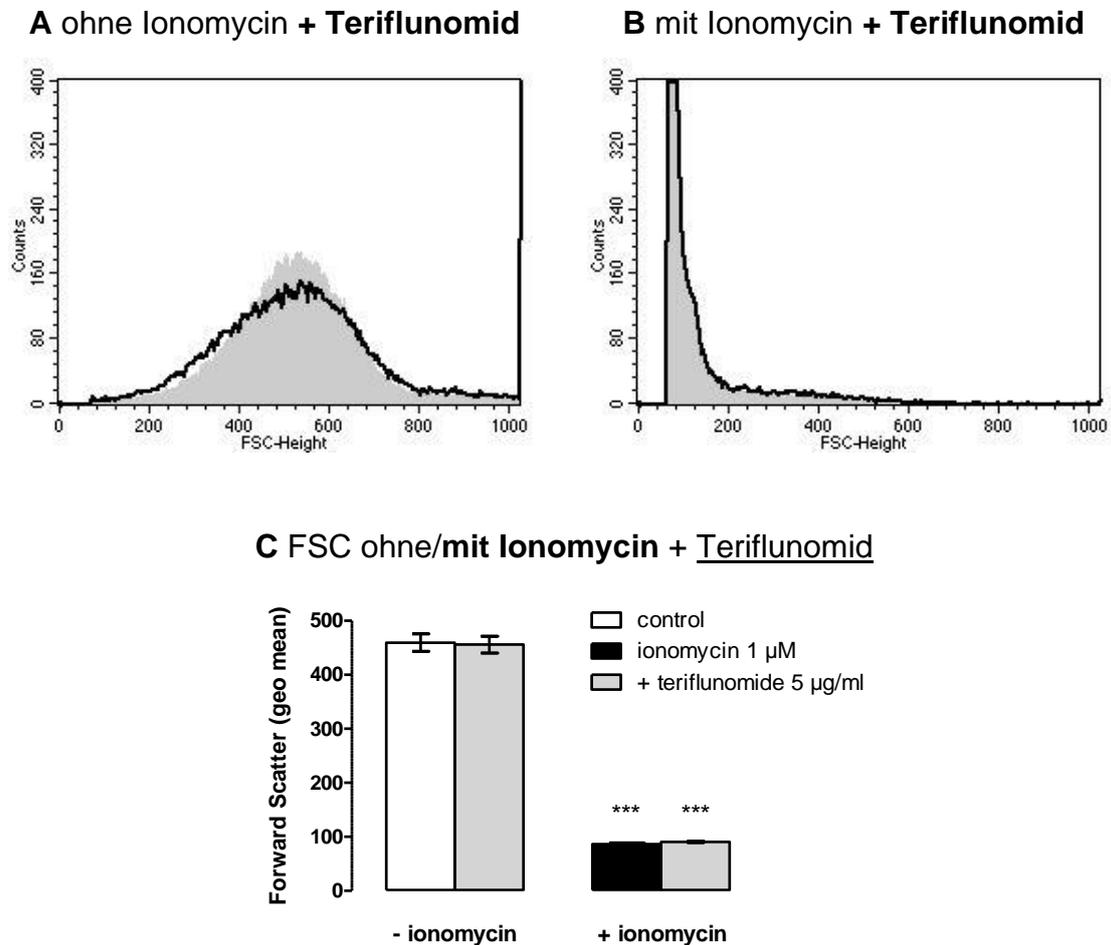


**C Annexin-V-Bindung ohne/mit Ionomycin + Teriflunomid**



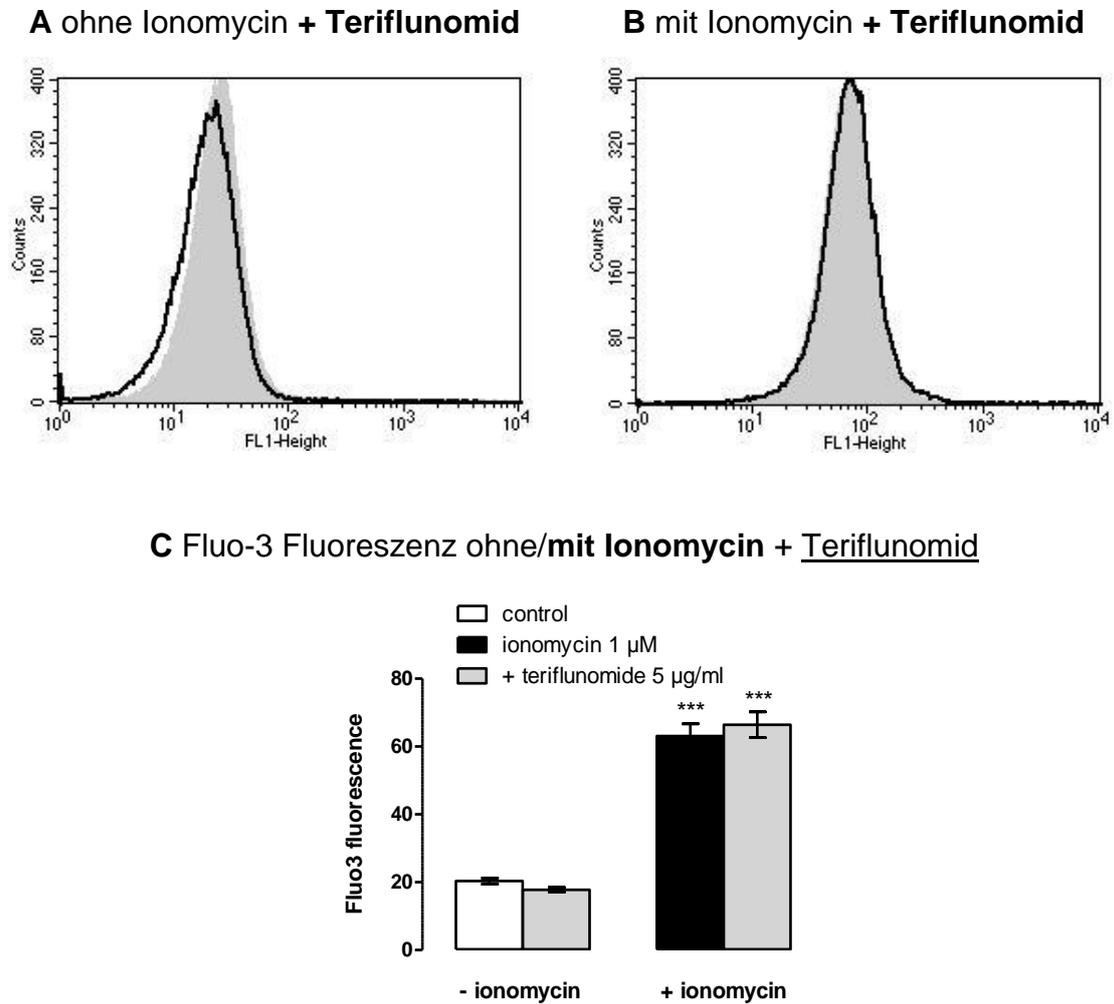
**Abb. 21:** Einfluss von Teriflunomid und Ionomycin auf die PS-Exposition (247).

(A, B) Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5 µg/ml Teriflunomid, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. M1 enthält den Anteil in (C) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. (C) Arithmetisches Mittel ± SEM (n=15) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 60 Minuten Inkubation ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) 1 µM Ionomycin, ohne (weißer und schwarzer Balken) und mit (graue Balken) 5 µg/ml Teriflunomid. \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Ionomycin. #( $p < 0,05$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Teriflunomid (ANOVA, Tukey's post test).



**Abb. 22:** Einfluss von Teriflunomid und Ionomycin auf die Zellgröße (247).

(A, B) Originale Histogramme des FSC in a.u. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5  $\mu$ g/ml Teriflunomid, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. (C) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=15) des FSC (geom. Mittel in a.u.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) 1  $\mu$ M Ionomycin, ohne (weißer und schwarzer Balken) und mit (graue Balken) 5  $\mu$ g/ml Teriflunomid. \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Ionomycin (ANOVA, Tukey's post test).

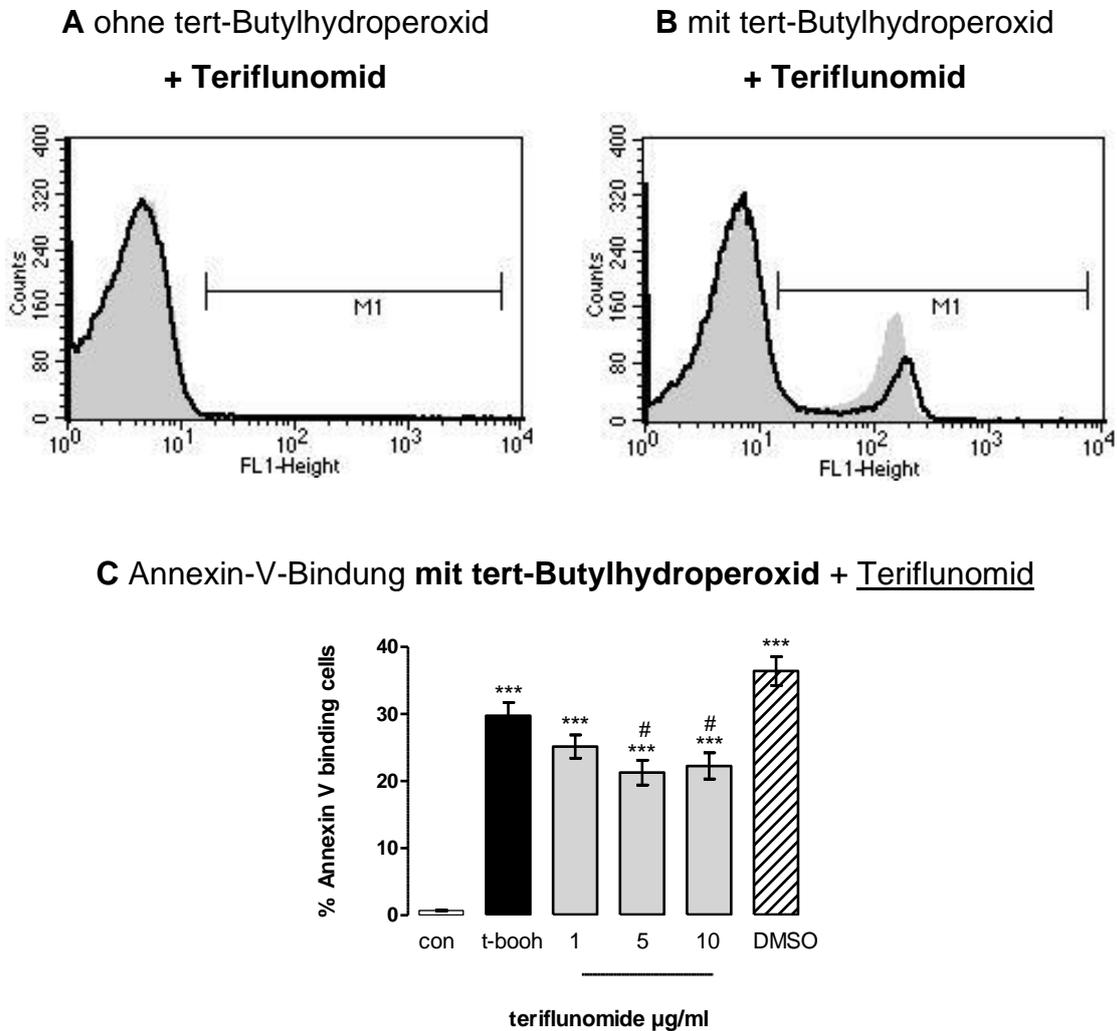


**Abb. 23:** Einfluss von Teriflunomid und Ionomycin auf die  $[Ca^{2+}]_i$ ; (247).

(A, B) Originale Histogramme der Fluo-3 Fluoreszenz in a.u. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 5  $\mu$ g/ml Teriflunomid, ohne (A) und mit (B) Ionomycin. (C) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=15) der Fluo-3 Fluoreszenz (geom. Mittel in a.u.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (linke Balken) und mit (rechte Balken) 1  $\mu$ M Ionomycin, ohne (weißer und schwarzer Balken) und mit (graue Balken) 5  $\mu$ g/ml Teriflunomid. \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen ohne Ionomycin (ANOVA, Tukey's post test).

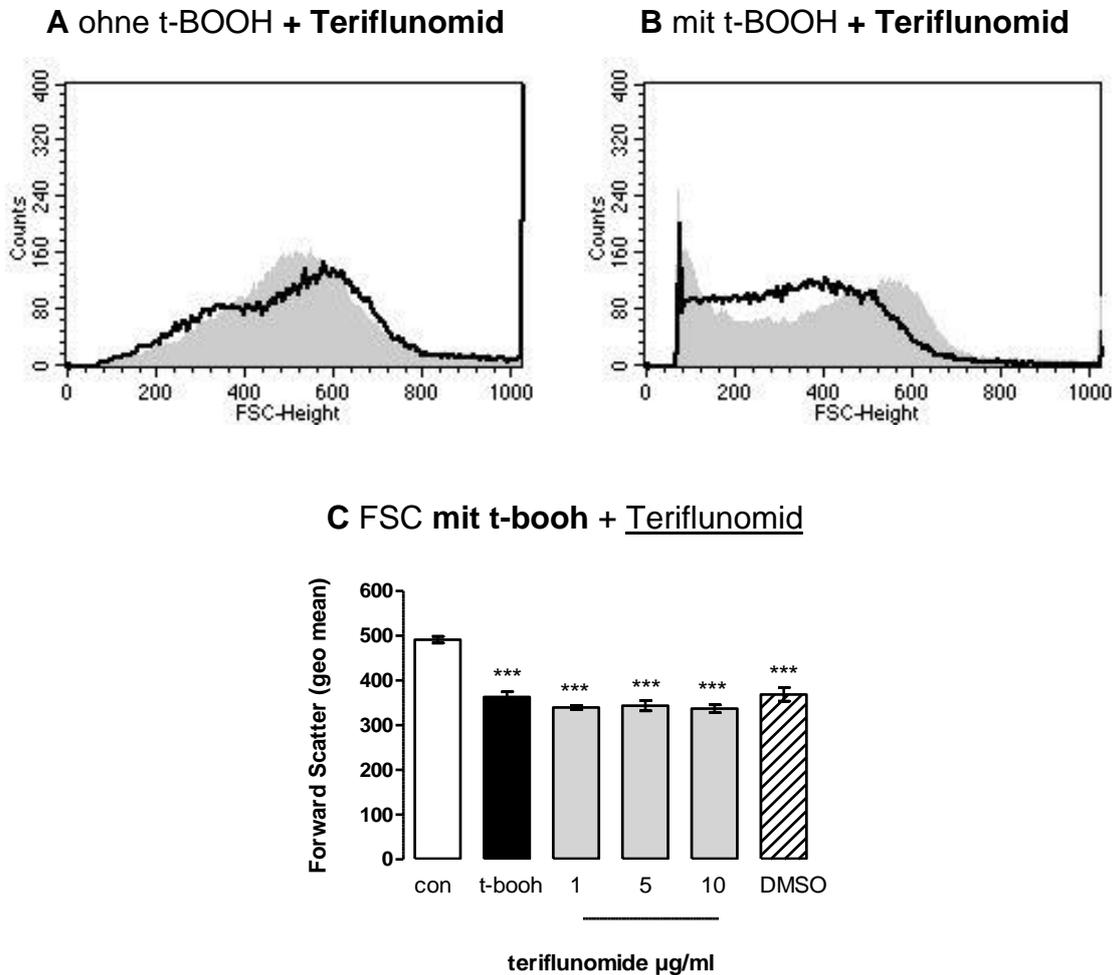
### 3.3.4 PS-Exposition, Zellgröße und $[Ca^{2+}]_i$ bei oxidativem Stress

Oxidativer Stress ist ein weiterer Auslöser der Eryptose. Deshalb wurden Erythrozyten mit 0,3 mM tert-Butylhydroperoxid (t-BOOH) für 60 Minuten oxidativem Stress ausgesetzt und die Wirkung von Teriflunomid wurde wiederum durch die Messung der Annexin-V-Bindung, des FSC und der Fluo-3-Fluoreszenz erfasst. Wie aus **Abb. 24** ersichtlich ist, verursacht oxidativer Stress eine erhöhte Annexin-V-Bindung der Erythrozyten, die von Teriflunomid (5 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) statistisch signifikant vermindert wird. Die Messung ergibt außerdem eine Senkung des FSC durch t-BOOH (**Abb. 25 C**), aber keine signifikante Veränderung des geometrischen Mittelwerts durch Teriflunomid (**Abb. 25 C**). Die Betrachtung der originalen Histogramme deutet jedoch auf Veränderungen in der Zellgröße durch Teriflunomid hin (**Abb. 25 B**), die sich im gemittelten Wert anscheinend nicht widerspiegeln. Die Erfassung des Anteils an stark geschrumpften Zellen mit einem FSC < 200 und der nicht geschrumpften Zellen mit einem FSC > 600 ermöglicht eine differenziertere Betrachtung der Reaktion der Erythrozyten. Die Anzahl der stark geschrumpften Erythrozyten mit einem FSC < 200 steigt unter oxidativem Stress an. Teriflunomid verringert diesen Anteil bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  und schwächt folglich die starke Schrumpfung ab (**Abb. 25 D**). Gleichzeitig sinkt die Anzahl der nicht geschrumpften Erythrozyten mit einem FSC > 600 bei oxidativem Stress. Teriflunomid verringert diese Population in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  und verursacht damit die Schrumpfung von groß gebliebenen Zellen (**Abb. 25 E**). Die Fluo-3-Fluoreszenz zeigt erwartungsgemäß einen durch oxidativen Stress hervorgerufenen Anstieg (**Abb. 26**). Dieser wird nicht durch Teriflunomid verändert (**Abb. 26**). Oxidativer Stress verursacht folglich die Eryptose, in die Teriflunomid mit einer Abschwächung der PS-Exposition, einer Modulierung der Zellgröße aber nicht mit einer Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  eingreift.



**Abb. 24:** PS-Exposition bei oxidativem Stress und Einfluss von Teriflunomid (247).

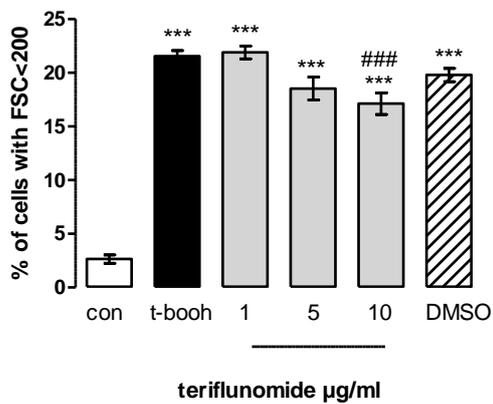
**(A, B)** Originale Histogramme der Annexin-V-Bindung in w.E. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10 µg/ml Teriflunomid, ohne (A) und mit (B) tert-Butylhydroperoxid. M1 enthält den Anteil in (C) berechneter Zellen mit erhöhter Annexin-V-Bindung. **(C)** Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=24) des Anteils Annexin-V-bindender Zellen in % nach 60 Minuten Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer und graue Balken) 0,3 mM tert-Butylhydroperoxid (t-booh) und mit 1 - 10 µg/ml Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO mit tert-Butylhydroperoxid dargestellt (gestreifter Balken). \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne tert-Butylhydroperoxid. #( $p < 0,05$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Gruppe mit tert-Butylhydroperoxid (ANOVA, Tukey's post test).



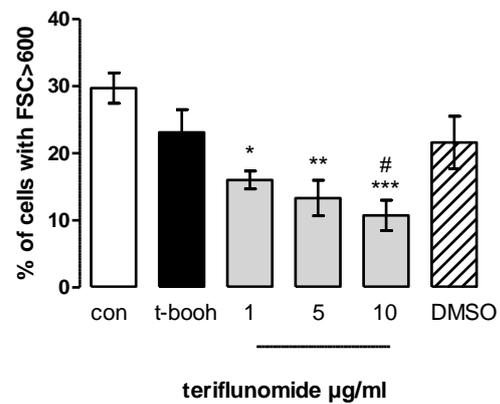
**Abb. 25:** Zellgröße bei oxidativem Stress und Einfluss von Teriflunomid (247).

**(A, B)** Originale Histogramme des FSC in w.E. (FSC-Height) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10 µg/ml Teriflunomid, ohne (A) und mit (B) tert-Butylhydroperoxid. **(C)** Arithmetisches Mittel ± SEM (n=16) des FSC (geom. Mittel in w.E.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer und graue Balken) 0,3 mM tert-Butylhydroperoxid (t-booh) und mit 1 - 10 µg/ml Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO mit tert-Butylhydroperoxid dargestellt (gestreifter Balken). \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne tert-Butylhydroperoxid (ANOVA, Tukey's post test).

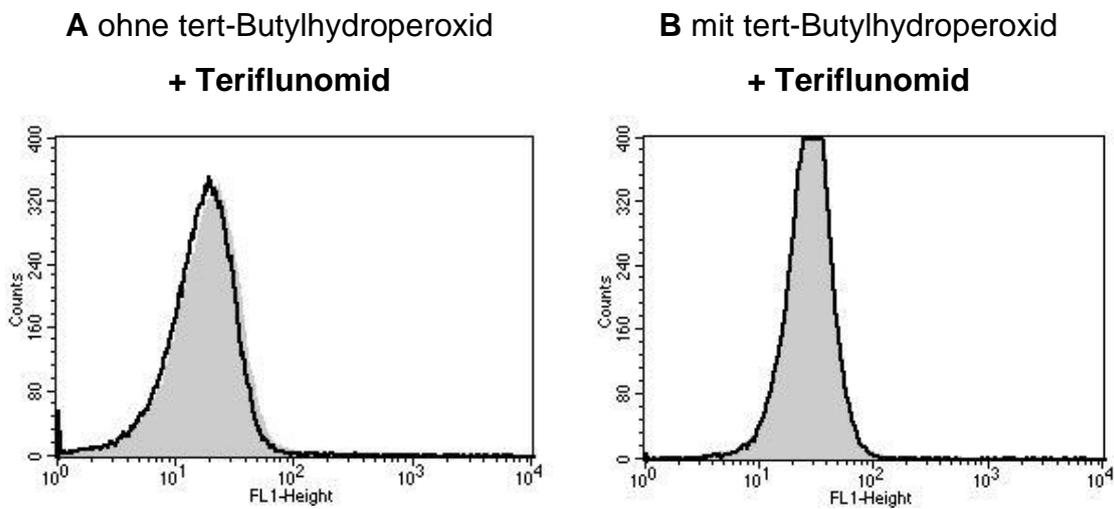
**D** % Zellen mit FSC < 200  
mit tert-Butylhydroperoxid  
+ Teriflunomid



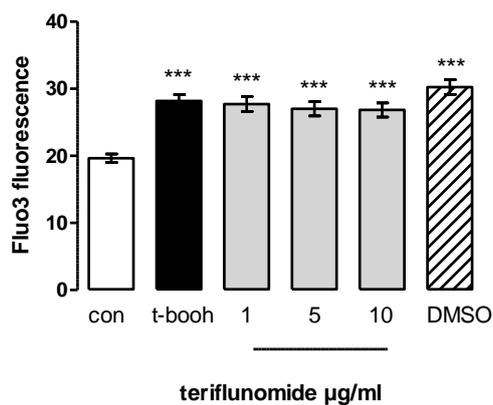
**E** % Zellen mit FSC > 600  
mit tert-Butylhydroperoxid  
+ Teriflunomid



(D, E) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=16) des prozentualen Anteils der Zellen mit FSC unter 200 (D) und über 600 (E) nach 60 Minuten Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer und graue Balken) 0,3 mM tert-Butylhydroperoxid (t-booh) und mit 1 - 10  $\mu$ g/ml Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO mit tert-Butylhydroperoxid dargestellt (gestreifter Balken). \*(p<0,05),\*\*(p<0,01),\*\*\*(p<0,001) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne tert-Butylhydroperoxid. #(p<0,05),###(p<0,001) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Gruppe mit tert-Butylhydroperoxid (ANOVA, Tukey's post test).



**C** Fluo-3 Fluoreszenz mit tert-Butylhydroperoxid + Teriflunomid



**Abb. 26:**  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei oxidativem Stress und Einfluss von Teriflunomid (247).

(A, B) Originale Histogramme der Fluo-3 Fluoreszenz in w.E. (FL1) der Erythrozyten Anzahl (Counts) nach Inkubation für 60 Minuten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10  $\mu\text{g/ml}$  Teriflunomid, ohne (A) und mit (B) tert-Butylhydroperoxid. (C) Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (n=16) der Fluo-3 Fluoreszenz (geom. Mittel in w.E.) nach 60 Minuten Inkubation ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer und graue Balken) 0,3 mM tert-Butylhydroperoxid (t-booh) und mit 1 - 10  $\mu\text{g/ml}$  Teriflunomid (graue Balken). Zum Vergleich ist der Effekt von DMSO mit tert-Butylhydroperoxid dargestellt (gestreifter Balken). \*\*\*( $p < 0,001$ ) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne tert-Butylhydroperoxid (ANOVA, Tukey's post test).

## 4 Diskussion

Die Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss der Medikamente Lapatinib, Regorafenib und Teriflunomid auf die Erythrozyten und ihren suizidalen Zelltod zu testen. Das markanteste Merkmal der Eryptose ist neben der Zellschrumpfung die PS-Exposition. Sie vermittelt die Interaktion mit der Umgebung, indem sie zu einer Phagozytose der Erythrozyten durch Makrophagen führt, die Zelladhäsion an Gefäßwände fördert und die Blutgerinnung verstärkt (20, 31, 60). Die Ergebnisse zeigen, dass Lapatinib und Regorafenib die PS-Exposition und eine Zellschrumpfung von Erythrozyten gesunder Spender verursachen (Abb. 4, Abb. 5, Abb. 12, Abb. 13). Für Lapatinib und Regorafenib konnte hiermit eine neue Eigenschaft identifiziert werden, die Auslösung der Eryptose. Das Medikament Teriflunomid verringerte in den Experimenten die PS-Exposition der Erythrozyten unter Energiemangel, oxidativem Stress und erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Abb. 18, Abb. 21, Abb. 24). Teriflunomid kann damit als Inhibitor der Eryptose eingeordnet werden. Wie der Einfluss der Medikamente zustande kommt und was die Entdeckung der Eigenschaften möglicherweise für die Wissenschaft bedeutet, wird in den folgenden Abschnitten anhand der Ergebnisse und der Forschungsliteratur diskutiert.

**Lapatinib** verursacht die PS-Exposition und Zellschrumpfung der Erythrozyten, verringert jedoch die  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6). Calcium fließt bei der Eryptose für gewöhnlich nach der Öffnung von unselektiven Kationenkanälen in die Zelle und aktiviert Scramblasen, was die PS-Exposition zur Folge hat (71). Möglicherweise schränkt Lapatinib die Funktion der Kationenkanäle ein und verringert den Calciumeinstrom, wie das bei dem Medikament Amilorid der Fall ist (39). Lapatinib verursacht die PS-Exposition auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium (Abb. 10). Zudem verstärkt Lapatinib deutlich die PS-Exposition bei erhöhter  $[Ca^{2+}]_i$  nach Inkubation mit Ionomycin, ohne die Calciumkonzentration an sich zu beeinflussen (Abb. 8, Abb. 7). Dies spricht für

einen Mechanismus, der komplementär zum Calcium die Scramblasen aktiviert oder die Scramblasen für den Effekt von Calcium sensibilisiert.

Ceramid-Bildung und oxidativer Stress sind bekannte Auslöser der Eryptose, die ihre Wirkung teilweise durch calciumunabhängige Mechanismen ausüben. In Abwesenheit von extrazellulärem Calcium verursacht Ceramid PS-Exposition und die Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen (82). Oxidativer Stress aktiviert Proteinkinasen der roten Blutzellen und kann PS-Exposition calciumunabhängig auslösen (73). Mit den Experimenten konnte allerdings nachgewiesen werden, dass Lapatinib weder Ceramid-Bildung noch oxidativen Stress erzeugt (siehe Abschnitt 3.1.5). Demnach müssten andere Mechanismen bei der Wirkung beteiligt sein.

Lapatinib hemmt die Tyrosinkinase des EGFR/Her 2 (173). Eine Rolle dieser Rezeptoren in der Eryptose ist nicht bekannt, aber es kommen andere Tyrosinkinase im Signalnetzwerk der Eryptose vor. Die Tyrosinkinase Jak 3 löst die Eryptose nach Glukosemangel aus (86). Das Triggern der Eryptose durch die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib, deutet aber auch darauf hin, dass Tyrosinkinase die Eryptose hemmen (8, 189). Möglicherweise beeinflusst Lapatinib die Aktivität einer dieser unbekanntes Tyrosinkinase. Ein pharmakologischer oder genetischer Knockout von Kinasen, die die Eryptose unterdrücken, kann die Eryptose verstärken (88, 248). Dementsprechend könnte auch Lapatinib durch Inhibierung von hemmenden Kinasen die PS-Exposition verursachen.

Zellschrumpfung findet bei der Eryptose durch das Öffnen von calciumabhängigen Kaliumkanälen statt, woraufhin Kalium, Chlorid und Wasser die Zelle verlassen (65). Allerdings erhöht Lapatinib nicht die  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 6). Auch nach Inkubation in einem Medium ohne Calcium verursacht Lapatinib Zellschrumpfung, die aber abgeschwächt gegenüber einer Lösung mit Calcium ist (Abb. 11). Die Zellschrumpfung durch Lapatinib scheint folglich teilweise von einem Calciumeinstrom abhängig zu sein, aber auch zusätzliche calciumunabhängige Ursachen zu besitzen. Im Gegensatz dazu verringert Lapatinib die Zellschrumpfung bei erhöhter  $[Ca^{2+}]_i$  nach Inkubation mit Ionomycin (Abb. 9). Wie dies von statten geht, ist nicht ohne weiteres aus den

Experimenten ableitbar. Lapatinib könnte die Funktion der Natrium-Kalium-ATPase beeinträchtigen und eine verminderte Kaliumkonzentration der Zellen hervorrufen (245). Bei einer Öffnung der Kaliumkanäle würden weniger Kaliumionen die Zelle verlassen und die schwächere Hyperpolarisation würde den Chloridausstrom und die Zellschrumpfung abschwächen (65, 245).

**Regorafenib** triggert ebenso wie Lapatinib die PS-Exposition und die Zellschrumpfung der Erythrozyten, ohne die  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen (Abb. 12, Abb. 13 und Abschnitt 3.2.2). Regorafenib vermindert sogar konzentrationsabhängig die Fluo-3-Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen (siehe Abschnitt 3.2.2). Entweder senkt Regorafenib tatsächlich die  $[Ca^{2+}]_i$  oder die Substanz schränkt die Funktion von Fluo-3 ein. Der Calcium-Ionophor Ionomycin bewirkt eine Überschwemmung und Sättigung der Zellen mit Calciumionen, die normalerweise nicht veränderbar ist (39). Eine Verringerung der Fluo-3-Fluoreszenz dieser Zellen (siehe Abschnitt 3.2.2) deutet auf eine Einschränkung der Fluo-3-Fluoreszenz durch Regorafenib oder auf den Verlust des Fluoreszenzfarbstoffs hin (160). Eine physikalische Einschränkung der Fluo-3 Messmethode ist schon durch andere Substanzen verursacht worden (130, 160). Ohne weitere Experimente können deshalb keine genaueren Aussagen über den Einfluss von Regorafenib auf die  $[Ca^{2+}]_i$  getroffen werden. Um trotzdem die Beziehung der PS-Exposition und der Zellschrumpfung zur  $[Ca^{2+}]_i$  zu ergründen, wurden die Erythrozyten in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium mit Regorafenib inkubiert. Da die Ergebnisse keine unterschiedliche Zellschrumpfung und PS-Exposition im Vergleich zu Zellen mit extrazellulärem Calcium aufzeigen, scheint Regorafenib die Eryptose unabhängig von Calcium auszulösen (Abb. 16). Regorafenib verstärkt ferner die PS-Exposition nach Inkubation mit Ionomycin (Abb. 14). Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der flussabwärts in die Signalkaskade von Calcium eingreift oder komplementär dazu verläuft. Im Gegensatz dazu schwächt Regorafenib die Zellschrumpfung ebenso wie Lapatinib nach Inkubation mit Ionomycin

ab (Abb. 15). Auch hier könnte eine Einschränkung der Natrium-Kalium-ATPase als Erklärung dienen (65).

Als calciumunabhängige Mechanismen kommen oxidativer Stress, Ceramid-Bildung und die Aktivität von Kinasen infrage. Die PKC aktiviert PS-Exposition calciumabhängig und – unabhängig (51). Ihre Beteiligung an der Wirkung von Regorafenib konnte aber durch die gleichzeitige Inkubation mit dem PKC Inhibitor Staurosporin ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 3.2.6). Die p38 MAPK ist an der Auslösung der Eryptose nach osmotischem Schock beteiligt (67). Aber auch ihre Aktivität konnte durch die Verwendung des Inhibitors SB 203580 ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 3.2.6). Diese Beobachtung deckt sich mit Erkenntnissen, nach denen Regorafenib die p38 MAPK am ehesten hemmt anstatt aktiviert (206). Auch oxidativer Stress und Ceramid-Bildung sind den Ergebnissen nach zu urteilen nicht an der Wirkung von Regorafenib beteiligt (siehe Abschnitt 3.2.5). Es bleibt die Vermutung, dass Regorafenib die Eryptose mit einem calciumunabhängigen Mechanismus auslöst. Zu den molekularen Zielen von Regorafenib gehören die Rezeptoren VEGFR 1-3, TIE-2, EGFR, PDGFR, FGFR, c-KIT und die Kinasen der Signalwege Ras-Raf-MAPK (205, 206). Abgesehen von der p38 MAPK beteiligen sie sich nicht an der Eryptose oder ihre Bedeutung ist noch nicht bekannt. Deshalb lässt sich über den genauen Mechanismus nur spekulieren. In Frage käme noch eine Beeinflussung der Caspasen, der Proteinphosphorylierung, S-Nitrosylierung und SH-Oxidation, weil sie neben Calcium die Scramblasenaktivität vermutlich direkt verändern (48, 49, 75, 249).

Die Ergebnisse offenbaren zwei weitere Substanzen, die PS-Exposition unabhängig von Calcium auslösen und flussabwärts der Calciumkaskade eingreifen. Sie unterstützen die These, dass es weitere Eryptosemechanismen neben der  $[Ca^{2+}]_i$  gibt (51, 75). Allerdings sind weder oxidativer Stress noch Ceramid an der Auslösung der PS-Exposition durch Lapatinib und Regorafenib beteiligt. Letztendlich bleibt es unklar, wie genau die Substanzen die Eryptose beeinflussen. Lapatinib und Regorafenib könnten ihre Wirkung durch die

Modulierung von Kinasen entfalten. Die Hemmung von Kinasen würde dieser Hypothese nach ausreichen, um Scramblasen zu aktivieren und Zellschrumpfung auszulösen. Mit dem Knockout der cGMP-abhängigen-Kinase 1 konnte im Mausmodell ein solches Phänomen ausgelöst werden (84). Bei Kinasen, die Eryptose nach einem Energiemangel hemmen, reicht eine alleinige Einschränkung der Kinasenaktivität jedoch nicht aus, um die Eryptose auszulösen (88, 89).

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit können dazu beitragen, die Medikamentenwirkung von Lapatinib und Regorafenib besser zu verstehen und im klinischen Gebrauch entsprechend zu beachten.

Um den realen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden Lapatinib und Regorafenib in Konzentrationen getestet, die der maximalen Plasmakonzentration der Medikamente entspricht (194, 218). Die *in vitro* Bedingungen sind aber nur begrenzt mit den *in vivo* Bedingungen vergleichbar. Im Organismus kommen endogen produzierte Substanzen wie NO, EPO und das c-reaktive Protein vor, die die Eryptose beeinflussen (74, 250). Außerdem war der Hämatokrit unter experimentellen Bedingungen niedriger als der des Menschen und die Plasmaproteine waren nicht vorhanden. Die Proteinbindung verändert eventuell die effektive Konzentration der Substanzen *in vivo*. Trotzdem konnte Sorafenib, ein vergleichbarer Kinasen-Inhibitor, die Eryptose sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auslösen (189). Deshalb ist es denkbar, dass die beobachteten Eigenschaften von Lapatinib und Regorafenib auch im Organismus relevant sind.

Das Triggern von Eryptose kann vorteilhaft eingesetzt werden. Durch die pharmakologische Verursachung der Eryptose wird die Parasitämie vermindert und der Verlauf von Malariainfektionen im Mausmodell verbessert (251, 252). Gängige Malariamedikamente sind als Auslöser der Eryptose identifiziert worden (127, 133, 253). Rein theoretisch könnten auch Lapatinib und Regorafenib mit ihrer Fähigkeit, Eryptose zu triggern, für die Behandlung von Infektionen mit *Plasmodium falciparum* eingesetzt werden. Es gibt aber andere

Medikamente, die ein günstigeres Wirkungs – und Nebenwirkungsprofil besitzen.

Eine der Nebenwirkungen von Lapatinib und Regorafenib ist Anämie (13, 222). Aufgrund einer Behandlung mit Zytostatika oder einer Krebserkrankung können Erythrozyten PS exponieren, durch Makrophagen abgebaut werden und ihr Mangel zu einer Anämie führen (8, 31, 57, 102). Lapatinib und Regorafenib könnten in ähnlicher Art und Weise die Anämie verursachen, da die Ergebnisse dieser Arbeit eine PS-exponierende Wirkung der Medikamente offenlegen. Da aber die Anämie in Krebserkrankungen viele Ursachen hat, sind klinische Studien nötig, um den Einfluss von Regorafenib und Lapatinib auf die Eryptose *in vivo* und die Entwicklung einer Anämie zu erforschen (254). Wenn sich die Hemmung der Eryptose in Studien als vorteilhaft erweist, könnten die eben erwähnten Untersuchungen nützlich sein. Dann kämen Patienten, die Lapatinib oder Regorafenib als Krebstherapie erhalten, als Zielgruppe für anti-eryptotische Medikamente in Frage (8).

Die Substanz **Teriflunomid** hemmt in den Experimenten dieser Arbeit die PS-Exposition von Erythrozyten, die einem Glukosemangel, einer erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  und oxidativem Stress ausgesetzt sind (Abb. 18, Abb. 21, Abb. 24). Unter Kontrollbedingungen wurde die PS-Exposition nicht beeinflusst (siehe Abschnitt 3.3.1). Das molekulare Ziel von Teriflunomid ist das mitochondriale Enzym DHODH (229). Weil reife Erythrozyten keine Mitochondrien besitzen (19), ist die Blockade der DHODH wahrscheinlich nicht für den Einfluss von Teriflunomid auf die Eryptose verantwortlich. Es wurden aber auch Wirkweisen von Teriflunomid beschrieben, die unabhängig von der DHODH ablaufen (12).

Teriflunomid greift bei Glukosemangel hemmend in die PS-Exposition und den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  der Erythrozyten ein (Abb. 18, Abb. 20). Bei einem Glukosemangel werden unselektive Kationenkanäle geöffnet und ein Calciumeinstrom führt zur Zellschrumpfung und PS-Exposition (39). Teriflunomid könnte durch eine Verminderung des Calciumeinstroms die PS-Exposition abschwächen. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wird von einem Gleichgewicht aus

Calciumeinstrom und auswärts gerichteten Calciumtransport bestimmt (255). Amilorid und Katecholamine schränken die Funktion der unselektiven Kationenkanäle ein und hemmen dadurch den Calciumeinstrom (166, 256). In ähnlicher Weise könnte auch Teriflunomid in die Eryptose eingreifen. Die Aktivität der p38 MAPK löst Calciumeinstrom und PS-Exposition nach Zellschrumpfung aus (67). Teriflunomid ist in der Lage die p38 MAPK zu hemmen und könnte dementsprechend die Eryptose abschwächen (12). Daneben ist das PGE<sub>2</sub> an der Auslösung von Calciumeinstrom und PS-Exposition beteiligt. PGE<sub>2</sub> wird von der COX 2 während der Eryptose gebildet (64). Teriflunomid inhibiert bekanntermaßen die COX 2 und könnte deshalb mit diesem Mechanismus die Eryptose regulieren (257).

Allerdings schwächt Teriflunomid die PS-Exposition von calciumüberfluteten Zellen ab, ohne die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zu verändern (Abb. 21, Abb. 23). Dies spricht für einen Mechanismus, der unabhängig oder komplementär zu Calcium abläuft. Auch unter Kontrollbedingungen verändert Teriflunomid die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nicht (siehe Abschnitt 3.3.1). Außerdem bleibt die Zellschrumpfung bei Glukosemangel und erhöhter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Teriflunomid unverändert (Abb. 19, Abb. 22). Eine abgeschwächte Calciumaktivität würde die Öffnung calciumabhängiger Kaliumkanäle verringern und damit die Zellschrumpfung dämpfen (65). Da dies jedoch nicht auftritt, ist eine alleinige Wirkung von Teriflunomid über die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> unwahrscheinlich. Als calciumunabhängige Eryptosemechanismen kommen die Ceramid-Bildung, oxidativer Stress und die Aktivität von Kinasen in Frage (43, 51, 73).

Die Wirkung von Teriflunomid könnte über die Hemmung von Kinasen vermittelt werden. Die Jak 3 wird bei Energiemangel phosphoryliert und ist an der Eryptose aktiv beteiligt. Ihre Hemmung resultiert in einer abgeschwächten PS-Exposition, ohne in die Zellschrumpfung einzugreifen (86). Die Experimente mit Teriflunomid zeigen das gleiche Phänomen (Abb. 18, Abb. 19). Da Teriflunomid in anderen Zelltypen Jak 3 inhibiert, ist dies ein wahrscheinlicher Mechanismus für den Einfluss auf die Eryptose (12, 258, 259). Andere Kinasen, die bei Glukosemangel Eryptose auslösen und möglicherweise durch Teriflunomid gehemmt werden, sind PKC und CK1α (40, 85).

In den Experimenten dieser Arbeit vermindert Teriflunomid die PS-Exposition bei oxidativem Stress (Abb. 24). Antioxidative Eigenschaften von Teriflunomid sind bereits bekannt. In humanen Prostata-Epithelzellen unterdrückt Teriflunomid die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (232). Außerdem löst Teriflunomid die Apoptose dieser Zellen in Mitwirkung von Mitochondrien aus (232). Die Erythrozyten enthalten aber keine Mitochondrien. Vermutlich ist die DHODH-unabhängige Wirkung von Teriflunomid antioxidativ und protektiv in Bezug auf die Eryptose. Oxidativer Stress verursacht die Öffnung von unselektiven Kationenkanälen in Erythrozyten (69). Der Calciumeinstrom löst Zellschrumpfung und PS-Exposition aus (39). Die Calciumkonzentration wurde in den Experimenten durch Teriflunomid nicht verändert (Abb. 26), deshalb kommen andere Mechanismen als die Veränderung der Calciumkonzentration in Frage. Oxidativer Stress verändert SH-Gruppen von Proteinen, womit vermutlich eine direkte Wirkung auf die PS-Exposition durch Scramblasen vermittelt wird (49). Teriflunomid könnte die Oxidation oder die Aktivität von antioxidativen Enzymen der Erythrozyten beeinflussen und so die PS-Exposition abschwächen. Das Verhältnis von reduziertem Glutathion zu Glutathiondisulfid ist ein zuverlässiger Marker für den Redoxstatus der roten Blutzellen (81). Dieser wurde allerdings nicht gemessen, weshalb darüber nur schwer zu urteilen ist. Oxidativer Stress veranlasst weiterhin die Phosphorylierung von Kinasen und löst auch ohne extrazelluläres Calcium die Eryptose aus (73). Die CK1 $\alpha$ , Cyclin-abhängige Kinase 4 und PI3K sind beispielsweise nach oxidativem Stress an der PS-Exposition beteiligt (40, 42, 73). Teriflunomid schwächt die Aktivität von Tyrosinkinase in zellkernhaltigen Zellen ab (259, 260). Dementsprechend könnte die Hemmung von Kinasen den Einfluss von Teriflunomid auf die PS-Exposition bei oxidativem Stress erklären. Die Zellgröße oxidativ gestresster Erythrozyten wird durch Teriflunomid charakteristisch reguliert (Abb. 25). Die  $[Ca^{2+}]_i$  ist jedoch gleichbleibend (Abb. 26). Daher müssten andere Mechanismen daran beteiligt sein. Die starke Zellschrumpfung nach oxidativem Stress wird, den Ergebnissen nach zu urteilen, von Teriflunomid abgeschwächt (Abb. 25 D). Eine Einschränkung von Peroxiredoxin 2, das als Calpromotin an der Aktivierung von

calciumabhängigen Kaliumkanälen beteiligt ist, könnte diesen Effekt erklären (261, 262). Auch eine Hemmung der Na-Kalium-ATPase oder der Kaliumkanäle direkt käme als Erklärung in Frage (65, 263). Allerdings zeigt sich der Effekt nur unter oxidativem Stress und nicht bei erhöhter  $[Ca^{2+}]_i$  oder Glukosemangel (Abb. 19, Abb. 22). Zusätzlich hat Teriflunomid auch einen leicht schrumpfenden Effekt auf die roten Blutzellen sowohl bei oxidativem Stress als auch unter Kontrollbedingungen (Abb. 25 E und Abschnitt 3.3.1). Warum Teriflunomid sowohl schrumpfend auf die Erythrozyten wirkt als auch die Zellschrumpfung abschwächt, scheint auf den ersten Blick paradox. Möglicherweise verursacht Teriflunomid eine Zellschrumpfung, indem es einen leichten Ausstrom durch den Kaliumkanal zulässt, aber ihn bei oxidativem Stress auch in diesem Zustand stabilisiert und dadurch die Zellschrumpfung abschwächt.

Zusammenfassend hemmt Teriflunomid den Calciumeinstrom bei Glukosemangel, aber nicht bei oxidativem Stress. Die Experimente mit Ionomycin zeigen, dass Teriflunomid flussabwärts der Calciumkaskade die PS-Exposition reguliert. Somit unterstützen die Ergebnisse die Bedeutung von calciumunabhängigen Signalwegen in der Eryptose.

Teriflunomid wird zur Therapie von Erkrankungen als Immunmodulator eingesetzt und vermittelt seine Wirkung über die Hemmung der mitochondrialen DHODH von T- und B-Lymphozyten, woraufhin diese weniger Pyrimidine synthetisieren und weniger stark proliferieren (228). Dass Teriflunomid auch unabhängig von DHODH die Zellphysiologie verändert, ist keine neue Entdeckung. Die Zytokinproduktion, Expression von Zelloberflächenmolekülen, Zellmigration und Proteinaggregation werden DHODH-unabhängig von Teriflunomid eingeschränkt (231, 242, 264). Allerdings ist die Bedeutung der molekularen Mechanismen dieser Effekte nicht eindeutig und einige Experimente wurden mit sehr hohen Teriflunomid-Konzentrationen durchgeführt, wodurch sich ihre Erkenntnisse schwer auf die Bedingungen *in vivo* übertragen lassen (12). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte aber eine DHODH-unabhängige Wirkung von Teriflunomid festgestellt werden, die

mit einer Teriflunomid-Konzentration unterhalb der maximalen Plasmakonzentration verursacht wurde (15). Erythrozyten gelten als Modellzellen zum Untersuchen der Apoptose in Abwesenheit von Mitochondrien (3, 4). In Analogie dazu könnten Erythrozyten als Modellzellen dienen, die DHODH-unabhängige Wirkung von Teriflunomid in Abwesenheit von Mitochondrien weiter zu erforschen.

Eryptose wurde in vielen Krankheiten festgestellt. Neben Sepsis ist die fortgeschrittene Niereninsuffizienz mit PS-Exposition und Eryptose assoziiert (59, 113). Die Anämie in dieser Erkrankung könnte von einem vorzeitigen Abbau der Erythrozyten durch PS-Exposition stammen (59, 101). In Tiermodellen vermindert die Supplementierung von Vitamin D die Eryptose und bei Dialysepatienten verringert eine EPO-Gabe den Anteil PS-exponierender Erythrozyten im Blut (72, 265). Die Hemmung der Eryptose könnte somit zur Prävention der Anämie geeignet sein (35). Außerdem ist die PS-Exposition ein thrombogener Vorgang (50). Die pharmakologische Hemmung der PS-Exposition durch Hydroxycarbamid hat sich bei Sichelzellanämie als vorteilhaft in Bezug auf vaso-okklusive Ereignisse erwiesen (167). Da Teriflunomid ebenfalls die PS-Exposition abschwächt, könnte das Medikament unter Umständen als anti-eryptotische Therapie eingesetzt werden und zur Thromboseprophylaxe bzw. Prävention von Anämie in ausgewählten Krankheiten dienen.

Die Eryptose erfüllt aber auch physiologische Funktionen. Sie schützt mit dem kontrollierten Abbau der roten Blutzellen durch Makrophagen in der Milz vor einer Hämolyse (6, 55, 89). Die Erythrozyten von Patienten mit beta-Thalassämie exponieren PS als Zeichen der Eryptose (114). Nach Splenektomie tritt bei diesen Patienten eine erhöhte intravasale Hämolyse und chronische Entzündung auf (266, 267). Die Hemmung der Eryptose könnte wie nach der Splenektomie aufgrund eines verspäteten Abbaus der Erythrozyten zu einer erhöhten intravasalen Hämolyse führen. Die Manipulation der Eryptose hätte somit zwei Seiten, die es zu analysieren gilt. Einerseits könnten Anämie und Thromboserisiko abgeschwächt werden, andererseits könnte eine zu starke

Hemmung Hämolyse verursachen und die Nierenfunktion angreifen (37, 38, 50, 59).

Eine anti-eryptotische Therapie könnte auch in Gefahr laufen, die Zytostatika-vermittelte Apoptose einer Krebstherapie abzuschwächen, weil die Eryptose ähnliche Signalwege wie die Apoptose benutzt (8). Teriflunomid löst aber gleichzeitig die Apoptose von Krebszellen aus und hemmt die Eryptose (233-238). Die entgegengesetzte Wirkung auf die verschiedenen Zelltypen wäre in diesem Kontext von Vorteil (8). Dies macht einen Einsatz des Medikaments zur Prävention von Anämie in Krebserkrankungen denkbar.

Teriflunomid wirkt zudem immunmodulatorisch anstatt immunsupprimierend und geht nicht mit einem erhöhten Risiko für Infektionen einher (241). Dies wäre ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl der Therapeutika, da das Immunsystem Krebszellen entscheidend abwehrt und die Patienten durch Chemo - und Radiotherapie zusätzlich immunsupprimiert sind (268, 269). Dementsprechend wäre Teriflunomid ein Kandidat für die pharmakologische Behandlung der Anämie von Krebspatienten. Ob eine anti-eryptotische Therapie wirkungsvoll eingesetzt werden kann, muss aber erst noch in klinischen Studien nachgewiesen werden.

Die **Schlussfolgerung** dieser Arbeit ergibt sich aus der Beobachtung, dass Lapatinib und Regorafenib die Eryptose verursachen und Teriflunomid die Eryptose abschwächt. Das Triggern der Eryptose verrät eine neue Eigenschaft der Medikamente und liefert einen Hinweis auf eine mögliche Ursache der Nebenwirkung Anämie (8). Der Einfluss der getesteten Substanzen ist teilweise calciumunabhängig und unterstreicht damit die Rolle von alternativen Mechanismen in der Eryptose. Für Teriflunomid konnte eine Wirkung auf die roten Blutzellen in Abwesenheit von Mitochondrien gezeigt werden und die somit DHODH-unabhängige Wirkung von Teriflunomid kann in Zukunft weiter anhand der Erythrozyten erforscht werden. Die Hemmung des suizidalen Zelltods der Erythrozyten könnte in Erkrankungen zur Milderung der Eryptose eingesetzt werden (8, 35).

## 5 Zusammenfassung

Die Eryptose ist der suizidale Zelltod der Erythrozyten und ist charakterisiert durch Phosphatidylserin (PS)-Exposition und Zellschrumpfung. Zur Steuerung des Vorgangs dienen die intrazelluläre Calciumkonzentration, oxidativer Stress, Ceramid-Bildung und die Aktivität von Proteinkinasen.

Lapatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, und Regorafenib, ein Multikinase-Inhibitor, werden zur Therapie von Karzinomen verwendet und verursachen Anämie als Nebenwirkung. Die Anämie kann theoretisch durch den Abbau PS-exponierender Erythrozyten zustande kommen. Teriflunomid wird bei Multipler Sklerose eingesetzt und wirkt immunmodulatorisch über die Blockade der mitochondrialen Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). Der Wirkmechanismus des Medikaments ist noch nicht vollständig verstanden.

Alle drei Substanzen verursachen oder beeinflussen den suizidalen Zelltod anderer Zelltypen, jedoch war vor dieser Arbeit nicht bekannt, wie sich die Medikamente direkt auf die Erythrozyten auswirken.

Das erste Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob und wie Lapatinib und Regorafenib die Eryptose verursachen. Dazu wurden die Testsubstanzen mit Erythrozyten von gesunden Spendern *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und ausgewählte Eryptose-Parameter mit der Methode Durchflusszytometrie anhand des Streulichts und von Fluoreszenzmarkern gemessen.

Lapatinib und Regorafenib verursachen eine erhöhte Annexin-V-Bindung der Erythrozyten, was als Maß für PS-Exposition gilt. Auch bei einem Überangebot von intrazellulärem Calcium verstärken sie die Annexin-V-Bindung, ohne die Calciumkonzentration zu beeinflussen. Die PS-Exposition verändert sich zudem nicht in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der nicht von einem Calciumeinstrom abhängig ist. Oxidativer Stress, Ceramid und aktive Kinasen können Eryptose calciumunabhängig auslösen. Die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

und der Ceramid-Bildung verdeutlicht jedoch, dass sie nicht die Wirkung von Lapatinib und Regorafenib vermitteln. Für Regorafenib kann zusätzlich die Beteiligung der Proteinkinase C und p38 MAPK ausgeschlossen werden, weil sich der Einsatz von Inhibitoren nicht auf die PS-Exposition auswirkt. Lapatinib und Regorafenib senken die intrazelluläre Calciumkonzentration, wobei Regorafenib möglicherweise die Messmethode für Calcium einschränkt. Die Substanzen lösen ferner Zellschrumpfung in An – und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium aus, die ein weiteres Merkmal der Eryptose darstellt. Mit den Ergebnissen konnten Lapatinib und Regorafenib als Verursacher der Eryptose identifiziert werden. Damit liefert diese Arbeit einen Hinweis auf die Eryptose als Ursache der Anämie, die als Nebenwirkung der Medikamente entsteht.

Als zweites Ziel der Arbeit wurde der Einfluss von Teriflunomid auf die Eryptose getestet. Auch hierfür wurden *in vitro* Experimente mit Erythrozyten von gesunden Spendern durchgeführt und die Ergebnisse mittels der Durchflusszytometrie gewonnen.

Teriflunomid schwächt die PS-Exposition bei Glukosemangel, erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration und oxidativem Stress ab. Gleichzeitig hemmt Teriflunomid den Calciumeinstrom bei Glukosemangel, aber nicht bei oxidativem Stress. Da Teriflunomid die PS-Exposition calciumüberfluteter Zellen abschwächt, scheint Teriflunomid flussabwärts der Calciumkaskade einzugreifen. Eine leichte Zellschrumpfung ist unter Kontrollbedingungen und oxidativem Stress detektierbar und paradoxerweise wird sie parallel dazu bei oxidativem Stress durch die Substanz abgeschwächt.

Für Teriflunomid wurde mit dieser Arbeit eine anti-eryptotische Eigenschaft entdeckt, die in Abwesenheit der mitochondrialen DHODH stattfindet. Damit kann Teriflunomid als anti-eryptotisches Medikament zur Therapie von Krankheiten mit erhöhter Eryptoserate in Betracht gezogen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.
2. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM and Kroemer G (2014) Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol* 16: 728-36.
3. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K and 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: 1197-206.
4. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J and Ameisen JC (2001) Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8: 1143-56.
5. Daugas E, Cande C and Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 8: 1131-3.
6. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM and Lang F (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15: 195-202.
7. Qadri SM, Bissinger R, Solh Z and Oldenborg PA (2017) Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Rev* 31: 349-361.
8. Lang E, Bissinger R, Qadri SM and Lang F (2017) Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: A potential target in the treatment of tumor-associated anemia. *Int J Cancer* 141: 1522-1528.
9. Lang E and Lang F (2015) Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int* Volume 2015: Article ID 513518, 16 pages.
10. Rana P and Sridhar SS (2012) Efficacy and tolerability of lapatinib in the management of breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 6: 67-77.
11. Goel G (2018) Evolution of regorafenib from bench to bedside in colorectal cancer: Is it an attractive option or merely a "me too" drug? *Cancer Manag Res* 10: 425-437.

12. Aly L, Hemmer B and Korn T (2017) From Leflunomide to Teriflunomide: Drug Development and Immunosuppressive Oral Drugs in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Curr Neuropharmacol* 15: 874-891.
13. Lorenzen S, Riera Knorrenschild J, Haag GM, Pohl M, Thuss-Patience P, Bassermann F, Helbig U, Weissinger F, Schnoy E, Becker K, Stocker G, Ruschoff J, Eisenmenger A, Karapanagiotou-Schenkel I and Lordick F (2015) Lapatinib versus lapatinib plus capecitabine as second-line treatment in human epidermal growth factor receptor 2-amplified metastatic gastro-oesophageal cancer: a randomised phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *Eur J Cancer* 51: 569-76.
14. Sunakawa Y, Furuse J, Okusaka T, Ikeda M, Nagashima F, Ueno H, Mitsunaga S, Hashizume K, Ito Y and Sasaki Y (2014) Regorafenib in Japanese patients with solid tumors: phase I study of safety, efficacy, and pharmacokinetics. *Investigational New Drugs* 32: 104-112.
15. Oh J and O'Connor PW (2013) An update of teriflunomide for treatment of multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag* 9: 177-90.
16. Jelkmann W (2007) Blut. p. 523-549 in *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie 30. Auflage* editors: Schmidt R, Lang F, Heckmann M. published by *Springer-Verlag*. Berlin Heidelberg.
17. Luna EJ and Hitt AL (1992) Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science* 258: 955-64.
18. Duez J, Holleran JP, Ndour PA, Pionneau C, Diakite S, Roussel C, Dussiot M, Amireault P, Avery VM and Buffet PA (2015) Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method. *Transfus Clin Biol* 22: 151-7.
19. Koury MJ, Koury ST, Kopsombut P and Bondurant MC (2005) In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood* 105: 2168-74.
20. Andrews DA and Low PS (1999) Role of red blood cells in thrombosis. *Curr.Opin.Hematol.* 6: 76-82.
21. Wan J, Ristenpart WD and Stone HA (2008) Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16432-7.
22. Ulker P, Sati L, Celik-Ozenci C, Meiselman HJ and Baskurt OK (2009) Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes. *Biorheology* 46: 121-32.
23. Diesen DL, Hess DT and Stamler JS (2008) Hypoxic vasodilation by red blood cells: evidence for an s-nitrosothiol-based signal. *Circ Res* 103: 545-53.

24. Jelkmann W (2012) Functional Significance of Erythrocytes. p. 1-56 in *Erythrocytes Physiology and Pathophysiology* editors: Lang F, Föller M. published by *Imperial College Press*. London.
25. Chasis JA and Mohandas N (2008) Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112: 470-8.
26. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J and Lodish HF (2011) From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 118: 6258-68.
27. Geminard C, de Gassart A and Vidal M (2002) Reticulocyte maturation: mitotosis and exosome release. *Biocell* 26: 205-15.
28. Jelkmann W (2013) Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother* 40: 302-9.
29. Antonelou MH, Kriebardis AG and Papassideri IS (2010) Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus* 8: 39-47.
30. Mebius RE and Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5: 606-16.
31. Klei TR, Meindert SM, van den Berg TK and van Bruggen R (2017) From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol* 8: Article 73.
32. Solak Y, Cetiner M, Siroopol D, Tarim K, Afsar B, Covic A and Kanbay M (2016) Novel Masters of Erythropoiesis: Hypoxia Inducible Factors and Recent Advances in Anemia of Renal Disease. *Blood Purif* 42: 160-167.
33. Gaspar BL, Sharma P and Das R (2015) Anemia in malignancies: pathogenetic and diagnostic considerations. *Hematology* 20: 18-25.
34. Rohrig G, Gutgemann I, von Gersdorff G, Polidori MC, Lupescu A, Lang F and Kolb G (2018) [Current insights into anemia in old age : Summary of the symposium "Anemia in old age" on the occasion of the annual congress of the German Society for Geriatrics (DGG) 2016 in Stuttgart]. *Z Gerontol Geriatr* 51: 343-348.
35. Lang F, Bissinger R, Abed M and Artunc F (2017) Eryptosis - the Neglected Cause of Anemia in End Stage Renal Disease. *Kidney Blood Press Res* 42: 749-760.
36. Edinger AL and Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16: 663-9.

37. Harrison HE, Bunting H, Ordway NK and Albrink WS (1947) The Pathogenesis of the Renal Injury Produced in the Dog by Hemoglobin or Methemoglobin. *J Exp Med* 86: 339-56.
38. Foller M, Harris IS, Elia A, John R, Lang F, Kavanagh TJ and Mak TW (2013) Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo. *Cell Death Differ* 20: 1350-8.
39. Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T and Huber SM (2003) Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 10: 249-56.
40. Zelenak C, Eberhard M, Jilani K, Qadri SM, Macek B and Lang F (2012) Protein kinase CK1alpha regulates erythrocyte survival. *Cell Physiol Biochem* 29: 171-80.
41. Lang E, Bissinger R, Fajol A, Salker MS, Singh Y, Zelenak C, Ghashghaeinia M, Gu S, Jilani K, Lupescu A, Reyskens KM, Ackermann TF, Foller M, Schleicher E, Sheffield WP, Arthur JS, Lang F and Qadri SM (2015) Accelerated apoptotic death and in vivo turnover of erythrocytes in mice lacking functional mitogen- and stress-activated kinase MSK1/2. *Sci Rep* 5: 17316.
42. Lang E, Zelenak C, Eberhard M, Bissinger R, Rotte A, Ghashghaeinia M, Lupescu A, Lang F and Qadri SM (2015) Impact of cyclin-dependent kinase CDK4 inhibition on eryptosis. *Cell Physiol Biochem* 37: 1178-86.
43. Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F and Wieder T (2004) Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 11: 231-43.
44. Daleke DL (2008) Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 15: 191-5.
45. Woon LA, Holland JW, Kable EP and Roufogalis BD (1999) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 25: 313-20.
46. Suzuki J, Fujii T, Imao T, Ishihara K, Kuba H and Nagata S (2013) Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J Biol Chem* 288: 13305-16.
47. Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR and Nagata S (2013) Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* 341: 403-6.
48. Sivagnanam U, Palanirajan SK and Gummadi SN (2017) The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: An overview. *Biochim Biophys Acta* 1864: 2261-2271.

49. Kamp D, Sieberg T and Haest CW (2001) Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry* 40: 9438-46.
50. Chung SM, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Lee MY, Jung YS and Chung JH (2007) Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 27: 414-421.
51. Wesseling MC, Wagner-Britz L, Nguyen DB, Asanidze S, Mutua J, Mohamed N, Hanf B, Ghashghaeinia M, Kaestner L and Bernhardt I (2016) Novel Insights in the Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem* 39: 1941-1954.
52. Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM and Wieder T (2006) Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 187: 191-8.
53. Segawa K and Nagata S (2015) An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology* 25: 639-650.
54. de Jong K, Emerson RK, Butler J, Bastacky J, Mohandas N and Kuypers FA (2001) Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood* 98: 1577-84.
55. Boas FE, Forman L and Beutler E (1998) Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3077-81.
56. Kempe DS, Lang PA, Duranton C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T and Lang F (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J.* 20: 368-370.
57. Bonomini M, Sirolli V, Reale M and Arduini A (2001) Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. *Am J Kidney Dis* 37: 807-14.
58. Gammella E, Buratti P, Cairo G and Recalcati S (2014) Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics* 6: 1336-45.
59. Abed M, Artunc F, Alzoubi K, Honisch S, Baumann D, Foller M and Lang F (2014) Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med (Berl)* 92: 871-9.
60. Borst O, Abed M, Alesutan I, Towhid ST, Qadri SM, Foller M, Gawaz M and Lang F (2012) Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C644-C651.

61. Walker B, Towhid ST, Schmid E, Hoffmann SM, Abed M, Munzer P, Vogel S, Neis F, Brucker S, Gawaz M, Borst O and Lang F (2014) Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to immobilized platelets via platelet phosphatidylserine receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 306: C291-7.
62. Gayen Betal S and Setty BN (2008) Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin-binding domain. *Transl Res* 152: 165-77.
63. Steffen P, Jung A, Nguyen DB, Muller T, Bernhardt I, Kaestner L and Wagner C (2011) Stimulation of human red blood cells leads to Ca<sup>2+</sup>-mediated intercellular adhesion. *Cell Calcium* 50: 54-61.
64. Lang PA, Kempe DS, Myssina S, Tanneur V, Birka C, Laufer S, Lang F, Wieder T and Huber SM (2005) PGE<sub>2</sub> in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 12: 415-428.
65. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F and Huber SM (2003) Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1553-C1560.
66. Rodolfo B, Serafina P and Giuseppe B (2017) Mechanisms Involved in the Increased Hemolysis in the Fetus and Newborn. *Curr Pediatr Rev* 13: 188-192.
67. Gatidis S, Zelenak C, Fajol A, Lang E, Jilani K, Michael D, Qadri SM and Lang F (2011) p38 MAPK activation and function following osmotic shock of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 28: 1279-86.
68. Lang E, Qadri SM and Lang F (2012) Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 1236-43.
69. Durantion C, Huber SM and Lang F (2002) Oxidation induces a Cl<sup>-</sup>-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 539: 847-55.
70. Kaestner L and Bernhardt I (2002) Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry* 55: 71-4.
71. Foller M, Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F and Huber SM (2008) TRPC6 contributes to the Ca<sup>(2+)</sup> leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 21: 183-92.
72. Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T and Lang F (2003) Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 14: 2750-7.

73. Vota DM, Maltaneri RE, Wenker SD, Nesse AB and Vittori DC (2013) Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents. *Cell Biochem Biophys* 65: 145-57.
74. Nicolay JP, Liebig G, Niemoeller OM, Koka S, Ghashghaeinia M, Wieder T, Haendeler J, Busse R and Lang F (2008) Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch* 456: 293-305.
75. Ghashghaeinia M, Wesseling MC, Ramos E, Petkova-Kirova P, Waibel S, Lang E, Bissinger R, Alzoubi K, Edelmann B, Hosseinzadeh Z, Dreischer P, Shahvaroughi-Farahani A, Mrowietz U, Koberle M, Kaestner L, Bernhardt I, Martinez-Ruiz A, Wieder T and Lang F (2017) Trifluoperazine-Induced Suicidal Erythrocyte Death and S-Nitrosylation Inhibition, Reversed by the Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside. *Cell Physiol Biochem* 42: 1985-1998.
76. Nguyen DB, Wagner-Britz L, Maia S, Steffen P, Wagner C, Kaestner L and Bernhardt I (2011) Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 28: 847-56.
77. Rifkind JM and Nagababu E (2013) Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid Redox Signal* 18: 2274-83.
78. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M and 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: 39460-7.
79. Lang F, Abed M, Lang E and Foller M (2014) Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal* 21: 138-53.
80. Shan F, Yang R, Ji T and Jiao F (2016) Vitamin C Inhibits Aggravated Eryptosis by Hydrogen Peroxide in Glucose-6-Phosphated Dehydrogenase Deficiency. *Cell Physiol Biochem* 39: 1453-62.
81. Ghashghaeinia M, Giustarini D, Koralkova P, Koberle M, Alzoubi K, Bissinger R, Hosseinzadeh Z, Dreischer P, Bernhardt I, Lang F, Toulany M, Wieder T, Mojzikova R, Rossi R and Mrowietz U (2016) Pharmacological targeting of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes by Bay 11-7082, parthenolide and dimethyl fumarate. *Sci Rep* 6: 28754.
82. Abed M, Towhid ST, Mia S, Pakladok T, Alesutan I, Borst O, Gawaz M, Gulbins E and Lang F (2012) Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C991-9.
83. Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F and Duranton C (2004) Inhibition of erythrocyte

phosphatidylserine exposure by urea and Cl. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F1046-53.

84. Foller M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F and Feil R (2008) Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105: 6771-6776.
85. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T and Lang F (2006) Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C244-C253.
86. Bhavsar SK, Gu S, Bobbala D and Lang F (2011) Janus kinase 3 is expressed in erythrocytes, phosphorylated upon energy depletion and involved in the regulation of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 27: 547-56.
87. Foller M, Mahmud H, Gu S, Wang K, Floride E, Kucherenko Y, Luik S, Laufer S and Lang F (2009) Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death. *J Physiol Pharmacol* 60: 135-43.
88. Zelenak C, Foller M, Velic A, Krug K, Qadri SM, Viollet B, Lang F and Macek B (2011) Proteome analysis of erythrocytes lacking AMP-activated protein kinase reveals a role of PAK2 kinase in eryptosis. *J Proteome Res* 10: 1690-7.
89. Foller M, Sopjani M, Koka S, Gu S, Mahmud H, Wang K, Floride E, Schleicher E, Schulz E, Munzel T and Lang F (2009) Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 23: 1072-1080.
90. Wesseling MC, Wagner-Britz L, Huppert H, Hanf B, Hertz L, Nguyen DB and Bernhardt I (2016) Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells Depending on Cell Age. *Cell Physiol Biochem* 38: 1376-1390.
91. Fujita H, Sakuma R, Tomiyama J, Hamaki T, Ohwada A, Kurosawa S and Nishimura S (2011) Increased phosphatidylserine exposure on the erythrocyte membrane in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 152: 238-40.
92. Joshi P and Gupta CM (1988) Abnormal membrane phospholipid organization in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Br J Haematol* 68: 255-9.
93. Brand VB, Sandu CD, Duranton C, Tanneur V, Lang KS, Huber SM and Lang F (2003) Dependence of *Plasmodium falciparum* in vitro growth on

the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem* 13: 347-356.

94. Foller M, Bobbala D, Koka S, Huber SM, Gulbins E and Lang F (2009) Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem* 24: 133-40.
95. Lang PA, Kasinathan RS, Brand VB, Duranton C, Lang C, Koka S, Shumilina E, Kempe DS, Tanneur V, Akel A, Lang KS, Foller M, Kun JF, Kremsner PG, Wesselborg S, Laufer S, Clemen CS, Herr C, Noegel AA, Wieder T, Gulbins E, Lang F and Huber SM (2009) Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem*. 24: 415-428.
96. Ayi K, Turrini F, Piga A and Arese P (2004) Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* 104: 3364-71.
97. Lang E and Lang F (2015) Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol* 39: 35-42.
98. Ahmed MS, Abed M, Voelkl J and Lang F (2013) Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol* 14: 244.
99. Ahmed MS, Langer H, Abed M, Voelkl J and Lang F (2013) The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press Res* 37: 158-67.
100. Bissinger R, Artunc F, Qadri SM and Lang F (2016) Reduced Erythrocyte Survival in Uremic Patients Under Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. *Kidney Blood Press Res* 41: 966-977.
101. Bonan NB, Steiner TM, Kuntsevich V, Virzi GM, Azevedo M, Nakao LS, Barreto FC, Ronco C, Thijssen S, Kotanko P, Pecoits-Filho R and Moreno-Amaral AN (2016) Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia. *Blood Purif* 41: 317-23.
102. Bissinger R, Schumacher C, Qadri SM, Honisch S, Malik A, Gotz F, Kopp HG and Lang F (2016) Enhanced eryptosis contributes to anemia in lung cancer patients. *Oncotarget* 7: 14002–14014.
103. Maellaro E, Leoncini S, Moretti D, Del Bello B, Tanganelli I, De Felice C and Ciccoli L (2011) Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*. 50: 489–495.

104. Calderon-Salinas JV, Munoz-Reyes EG, Guerrero-Romero JF, Rodriguez-Moran M, Bracho-Riquelme RL, Carrera-Gracia MA and Quintanar-Escorza MA (2011) Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem* 357: 171-179.
105. Nicolay JP, Schneider J, Niemoeller OM, Artunc F, Portero-Otin M, Haik G, Jr., Thornalley PJ, Schleicher E, Wieder T and Lang F (2006) Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem* 18: 223-32.
106. Lang E, Gatidis S, Freise NF, Bock H, Kubitz R, Lauermann C, Orth HM, Klindt C, Schuier M, Keitel V, Reich M, Liu G, Schmidt S, Xu HC, Qadri SM, Herebian D, Pandyra AA, Mayatepek E, Gulbins E, Lang F, Haussinger D, Lang KS, Foller M and Lang PA (2015) Conjugated bilirubin triggers anemia by inducing erythrocyte death. *Hepatology* 61: 275-84.
107. Mahmud H, Ruifrok WP, Westenbrink BD, Cannon MV, Vreeswijk-Baudoin I, van Gilst WH, Sillje HH and de Boer RA (2013) Suicidal erythrocyte death, eryptosis, as a novel mechanism in heart failure-associated anaemia. *Cardiovasc Res* 98: 37-46.
108. Bissinger R, Kempe-Teufel DS, Honisch S, Qadri SM, Randrianarisoa E, Haring HU, Henes J and Lang F (2016) Stimulated Suicidal Erythrocyte Death in Arteritis. *Cell Physiol Biochem* 39: 1068-1077.
109. Lang PA, Beringer O, Nicolay JP, Amon O, Kempe DS, Hermle T, Attanasio P, Akel A, Schafer R, Friedrich B, Risler T, Baur M, Olbricht CJ, Zimmerhackl LB, Zipfel PF, Wieder T and Lang F (2006) Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)* 84: 378-88.
110. Jiang P, Bian M, Ma W, Liu C, Yang P, Zhu B, Xu Y, Zheng M, Qiao J, Shuai Z, Zhou X and Huang D (2016) Eryptosis as an Underlying Mechanism in Systemic Lupus Erythematosus-Related Anemia. *Cell Physiol Biochem* 40: 1391-1400.
111. Basu S, Banerjee D, Ghosh M and Chakrabarti A (2010) Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology* 15: 236-9.
112. Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, Friedrich B, Dreischer P, Wolz C, Schumacher U, Peschel A, Gotz F, Doring G, Wieder T, Gulbins E and Lang F (2007) Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol.Med.* 85: 269-277.

113. Wood BL, Gibson DF and Tait JF (1996) Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88: 1873-1880.
114. Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, Snyder LM, Kiefer CR, Bunyaratvej A, Fucharoen S, Ma L, Styles L, de Jong K and Schrier SL (1998) Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. *Blood* 91: 3044-51.
115. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L and Arese P (1998) Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* 92: 2527-34.
116. Crisp RL, Vota DM, Donato H, Garcia E, Rapetti MC, Maltaner RE, Vittori DC and Nesse AB (2016) Eryptosis is induced by hyperthermia in hereditary spherocytosis red blood cells. *Clin Chem Lab Med* 54: e165-8.
117. Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rubben H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Haussinger D, Gulbins E and Lang F (2007) Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat.Med.* 13: 164-170.
118. Pretorius E, Swanepoel AC, Buys AV, Vermeulen N, Duim W and Kell DB (2014) Eryptosis as a marker of Parkinson's disease. *Aging (Albany NY)* 6: 788-819.
119. Birka C, Lang PA, Kempe DS, Hoefling L, Tanneur V, Duranton C, Nammi S, Henke G, Myssina S, Krikov M, Huber SM, Wieder T and Lang F (2004) Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch.* 448: 471-477.
120. Voelkl J, Alzoubi K, Mamar AK, Ahmed MS, Abed M and Lang F (2013) Stimulation of suicidal erythrocyte death by increased extracellular phosphate concentrations. *Kidney Blood Press Res* 38: 42-51.
121. Abed M, Feger M, Alzoubi K, Pakladok T, Frauenfeld L, Geiger C, Towhid ST and Lang F (2013) Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation. *Kidney Blood Press Res* 37: 567-78.
122. Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K and Hoelzle LE (2011) Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 27: 557-64.

123. Sola E, Vaya A, Martinez M, Moscardo A, Corella D, Santaolaria ML, Espana F and Hernandez-Mijares A (2009) Erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 17: 318-22.
124. Zappulla D (2008) Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO<sub>2</sub> increases? *J Cardiometab.Syndr.* 3: 30-34.
125. Abed M, Herrmann T, Alzoubi K, Pakladok T and Lang F (2013) Tannic Acid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 32: 1106-16.
126. Abed M, Zoubi KA, Theurer M and Lang F (2013) Effect of dermaseptin on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 113: 347-52.
127. Alzoubi K, Calabro S, Bissinger R, Abed M, Faggio C and Lang F (2014) Stimulation of suicidal erythrocyte death by artesunate. *Cell Physiol Biochem* 34: 2232-44.
128. Alzoubi K, Egler J, Abed M and Lang F (2015) Enhanced eryptosis following auranofin exposure. *Cell Physiol Biochem* 37: 1018-28.
129. Alzoubi K, Honisch S, Abed M and Lang F (2014) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Penta-O-galloyl-beta-d-glucose. *Toxins (Basel)* 6: 54-65.
130. Arnold M, Bissinger R and Lang F (2014) Mitoxantrone-induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 34: 1756-67.
131. Arnold M, Lang E, Modicano P, Bissinger R, Faggio C, Abed M and Lang F (2014) Effect of nitazoxanide on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114: 421-6.
132. Bhavsar SK, Bobbala D, Xuan NT, Foller M and Lang F (2010) Stimulation of suicidal erythrocyte death by alpha-lipoic acid. *Cell Physiol Biochem.* 26: 859-868.
133. Bissinger R, Barking S, Alzoubi K, Liu G, Liu G and Lang F (2015) Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by the Antimalarial Drug Mefloquine. *Cell Physiol Biochem* 36: 1395-405.
134. Bissinger R, Bouguerra G, Stockinger K, Abbes S and Lang F (2015) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Topotecan. *Cell Physiol Biochem* 37: 1607-18.
135. Bissinger R, Fischer S, Jilani K and Lang F (2014) Stimulation of erythrocyte death by phloretin. *Cell Physiol Biochem* 34: 2256-65.

136. Bissinger R, Lupescu A, Zelenak C, Jilani K and Lang F (2014) Stimulation of eryptosis by cryptotanshinone. *Cell Physiol Biochem* 34: 432-42.
137. Bouguerra G, Aljanadi O, Bissinger R, Abbes S and Lang F (2015) Embelin-Induced Phosphatidylserine Translocation in the Erythrocyte Cell Membrane. *Cell Physiol Biochem* 37: 1629-40.
138. Bouguerra G, Bissinger R, Abbes S and Lang F (2015) Stimulation of Eryptosis by Narasin. *Cell Physiol Biochem* 37: 1807-16.
139. Bouguerra G, Bissinger R, Abbes S and Lang F (2015) Zopolrestat Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 1537-46.
140. Briglia M, Fazio A, Faggio C, Laufer S, Alzoubi K and Lang F (2015) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Ruxolitinib. *Cell Physiol Biochem* 37: 768-78.
141. Briglia M, Fazio A, Signoretto E, Faggio C and Lang F (2015) Edelfosine Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 2221-30.
142. Calabro S, Alzoubi K, Faggio C, Laufer S and Lang F (2015) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death Following Boswellic Acid Exposure. *Cell Physiol Biochem* 37: 131-42.
143. Egler J and Lang F (2015) Licochalcone A Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 2060-70.
144. Egler J, Zierle J and Lang F (2016) Stimulating Effect of Manumycin A on Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem* 38: 1147-56.
145. Faggio C, Alzoubi K, Calabro S and Lang F (2015) Stimulation of suicidal erythrocyte death by PRIMA-1. *Cell Physiol Biochem* 35: 529-40.
146. Fazio A, Briglia M, Faggio C, Alzoubi K and Lang F (2015) Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Garcinol. *Cell Physiol Biochem* 37: 805-15.
147. Jacobi J, Lang E, Bissinger R, Frauenfeld L, Modicano P, Faggio C, Abed M and Lang F (2014) Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mitotane. *Cell Physiol Biochem* 33: 1516-26.
148. Jilani K, Enkel S, Bissinger R, Almilaji A, Abed M and Lang F (2013) Fluoxetine induced suicidal erythrocyte death. *Toxins (Basel)* 5: 1230-43.
149. Jilani K and Lang F (2013) Carmustine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane. *Toxins (Basel)* 5: 703-16.

150. Jilani K, Qadri SM and Lang F (2013) Geldanamycin-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane. *Cell Physiol Biochem* 32: 1600-9.
151. Lupescu A, Bissinger R, Herrmann T, Oswald G, Jilani K and Lang F (2014) Induction of suicidal erythrocyte death by novobiocin. *Cell Physiol Biochem* 33: 670-80.
152. Lupescu A, Bissinger R, Jilani K and Lang F (2013) Triggering of suicidal erythrocyte death by celecoxib. *Toxins (Basel)* 5: 1543-54.
153. Lupescu A, Bissinger R, Warsi J, Jilani K and Lang F (2014) Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by gedunin. *Cell Physiol Biochem* 33: 1838-48.
154. Lupescu A, Jilani K, Zbidah M and Lang F (2013) Patulin-induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 32: 291-9.
155. Lupescu A, Jilani K, Zelenak C, Zbidah M, Qadri SM and Lang F (2012) Hexavalent chromium-induced erythrocyte membrane phospholipid asymmetry. *Biometals* 25: 309-18.
156. Malik A, Bissinger R, Calabro S, Faggio C, Jilani K and Lang F (2014) Aristolochic acid induced suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press Res* 39: 408-19.
157. Officioso A, Alzoubi K, Manna C and Lang F (2015) Clofazimine Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 331-41.
158. Oswald G, Alzoubi K, Abed M and Lang F (2014) Stimulation of suicidal erythrocyte death by ribavirin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114: 311-7.
159. Peter T, Bissinger R, Enkel S, Alzoubi K, Oswald G and Lang F (2015) Programmed erythrocyte death following in vitro Treosulfan treatment. *Cell Physiol Biochem* 35: 1372-80.
160. Signoretto E, Zierle J, Bissinger R, Castagna M, Bossi E and Lang F (2016) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Pazopanib. *Cell Physiol Biochem* 38: 926-38.
161. Stockinger K, Bissinger R, Bouguerra G, Abbes S and Lang F (2015) Enhanced Eryptosis Following Exposure to Carnosic Acid. *Cell Physiol Biochem* 37: 1779-91.
162. Waibel S, Bissinger R, Bouguerra G, Abbes S and Lang F (2015) Saquinavir Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 1973-82.

163. Zbidah M, Lupescu A, Jilani K and Lang F (2013) Stimulation of suicidal erythrocyte death by fumagillin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112: 346-51.
164. Zhang R, Xiang Y, Ran Q, Deng X, Xiao Y, Xiang L and Li Z (2014) Involvement of calcium, reactive oxygen species, and ATP in hexavalent chromium-induced damage in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 34: 1780-91.
165. Lang F, Jilani K and Lang E (2015) Therapeutic potential of manipulating suicidal erythrocyte death. *Expert Opin Ther Targets* 19: 1219-27.
166. Lang KS, Myssina S, Tanneur V, Wieder T, Huber SM, Lang F and Duranton C (2003) Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367: 391-6.
167. Covas DT, de Lucena Angulo I, Vianna Bonini Palma P and Zago MA (2004) Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica* 89: 273-80.
168. Foller M, Mahmud H, Qadri SM, Gu S, Braun M, Bobbala D, Hocher B and Lang F (2010) Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death. *Faseb j* 24: 3351-9.
169. Al Mamun Bhuyan A, Ashiqul Haque AKM, Sahu I, Cao H, Kormann MSD and Lang F (2017) Inhibition of Suicidal Erythrocyte Death by Volasertib. *Cell Physiol Biochem* 43: 1472-1486.
170. Al Mamun Bhuyan A, Bissinger R, Cao H and Lang F (2017) Inhibition of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by ASP3026. *Cell Physiol Biochem* 43: 507-517.
171. Jemaa M, Fezai M and Lang F (2017) Inhibition of Suicidal Erythrocyte Death by Reversine. *Cell Physiol Biochem* 41: 2363-2373.
172. Liu C, Jiang P, Xu Y, Zheng M, Qiao J, Zhou X, Huang D and Bian M (2018) Inhibition of Suicidal Erythrocyte Death by Indirubin-3'-Monoxime. *Cell Physiol Biochem* 45: 1108-1120.
173. Johnston SRD, Hegg R, Im SA, Park IH, Burdaeva O, Kurteva G, Press MF, Tjulandin S, Iwata H, Simon SD, Kenny S, Sarp S, Izquierdo MA, Williams LS and Gradishar WJ (2018) Phase III, Randomized Study of Dual Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Blockade With Lapatinib Plus Trastuzumab in Combination With an Aromatase Inhibitor in Postmenopausal Women With HER2-Positive, Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: ALTERNATIVE. *J Clin Oncol* 36: 741-748.

174. Segovia-Mendoza M, Gonzalez-Gonzalez ME, Barrera D, Diaz L and Garcia-Becerra R (2015) Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Am J Cancer Res* 5: 2531-61.
175. Yuan P and Gao SL (2017) Management of breast cancer brain metastases: Focus on human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Chronic Dis Transl Med* 3: 21-32.
176. Nolting M, Schneider-Merck T and Trepel M (2014) Lapatinib. *Recent Results Cancer Res* 201: 125-43.
177. Nagaria TS, Shi C, Leduc C, Hoskin V, Sikdar S, Sangrar W and Greer PA (2017) Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems. *Oncotarget* 8: 80804-80819.
178. Ramlau R, Thomas M, Novello S, Plummer R, Reck M, Kaneko T, Lau MR, Margetts J, Lunec J, Nutt J and Scagliotti GV (2015) Phase I Study of Lapatinib and Pemetrexed in the Second-Line Treatment of Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With Assessment of Circulating Cell Free Thymidylate Synthase RNA as a Potential Biomarker. *Clin Lung Cancer* 16: 348-57.
179. Christodoulou C, Kalogera-Fountzila A, Karavasilis V, Kouvatseas G, Papandreou CN, Samantas E, Varaki K, Papadopoulos G, Bobos M, Rallis G, Razis E, Goudopoulou A, Kalogeras KT, Syrigos KN and Fountzilas G (2017) Lapatinib with whole brain radiotherapy in patients with brain metastases from breast and non-small cell lung cancer: a phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *J Neurooncol* 134: 443-451.
180. Gandhi MD and Agulnik M (2014) Targeted treatment of head and neck squamous-cell carcinoma: potential of lapatinib. *Onco Targets Ther* 7: 245-51.
181. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM and Jemal A (2017) Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26: 444-457.
182. Xu ZQ, Zhang Y, Li N, Liu PJ, Gao L, Gao X and Tie XJ (2017) Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 7: e013053.
183. Medina PJ and Goodin S (2008) Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clin Ther* 30: 1426-47.

184. D'Amato V, Raimondo L, Formisano L, Giuliano M, De Placido S, Rosa R and Bianco R (2015) Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev* 41: 877–883.
185. Opdam FL, Guchelaar HJ, Beijnen JH and Schellens JH (2012) Lapatinib for advanced or metastatic breast cancer. *Oncologist* 17: 536-42.
186. Shiota M, Bishop JL, Takeuchi A, Nip KM, Cordonnier T, Beraldi E, Kuruma H, Gleave ME and Zoubeidi A (2015) Inhibition of the HER2-YB1-AR axis with Lapatinib synergistically enhances Enzalutamide anti-tumor efficacy in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget* 6: 9086-98.
187. Wan X, Zheng X, Pang X, Zhang Z, Jing T, Xu W and Zhang Q (2015) The potential use of lapatinib-loaded human serum albumin nanoparticles in the treatment of triple-negative breast cancer. *Int J Pharm* 484: 16-28.
188. Liu CY, Hu MH, Hsu CJ, Huang CT, Wang DS, Tsai WC, Chen YT, Lee CH, Chu PY, Hsu CC, Chen MH, Shiau CW, Tseng LM and Chen KF (2016) Lapatinib inhibits CIP2A/PP2A/p-Akt signaling and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* 7: 9135-49.
189. Lupescu A, Shaik N, Jilani K, Zelenak C, Lang E, Pasham V, Zbidah M, Plate A, Bitzer M, Foller M, Qadri SM and Lang F (2012) Enhanced erythrocyte membrane exposure of phosphatidylserine following sorafenib treatment: an in vivo and in vitro study. *Cell Physiol Biochem* 30: 876-88.
190. Shaik N, Lupescu A and Lang F (2012) Sunitinib-sensitive suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 30: 512-22.
191. Al Mamun Bhuyan A, Bissinger R, Cao H and Lang F (2017) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Exemestane. *Cell Physiol Biochem* 42: 1-12.
192. Al Mamun Bhuyan A, Cao H and Lang F (2017) Triggering of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death by Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) inhibitor Temsirolimus. *Cell Physiol Biochem* 42: 1575-1591.
193. Al Mamun Bhuyan A, Wagner T, Cao H and Lang F (2017) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Gefitinib. *Cell Physiol Biochem* 41: 1697-1708.
194. Inoue K, Kuroi K, Shimizu S, Rai Y, Aogi K, Masuda N, Nakayama T, Iwata H, Nishimura Y, Armour A and Sasaki Y (2015) Safety, pharmacokinetics and efficacy findings in an open-label, single-arm study of weekly paclitaxel plus lapatinib as first-line therapy for Japanese

- women with HER2-positive metastatic breast cancer. *Int J Clin Oncol* 20: 1102-9.
195. Cizkova M, Bouchalova K, Friedecky D, Polynkova A, Janostakova A, Radova L, Cwierka K, Trojanec R, Zezulova M, Zlevorova M, Hajduch M and Melichar B (2012) High lapatinib plasma levels in breast cancer patients: risk or benefit? *Tumori* 98: 162-5.
  196. Abdel-Rahman O and Fouad M (2015) Risk of mucocutaneous toxicities in patients with solid tumors treated with lapatinib: a systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 31: 975-86.
  197. Frankel C and Palmieri FM (2010) Lapatinib side-effect management. *Clin J Oncol Nurs* 14: 223-33.
  198. Botrel TE, Paladini L and Clark OA (2013) Lapatinib plus chemotherapy or endocrine therapy (CET) versus CET alone in the treatment of HER-2-overexpressing locally advanced or metastatic breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Core Evid* 8: 69-78.
  199. Hofheinz RD, Arnold D, Kubicka S, Prasnikař N and Vogel A (2015) Improving Patient Outcomes with Regorafenib for Metastatic Colorectal Cancer - Patient Selection, Dosing, Patient Education, Prophylaxis, and Management of Adverse Events. *Oncology Research and Treatment* 38: 300-308.
  200. Shirley M and Keating GM (2015) Regorafenib: A Review of Its Use in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumours. *Drugs* 75: 1009-1017.
  201. Ray EM and Sanoff HK (2017) Optimal therapy for patients with hepatocellular carcinoma and resistance or intolerance to sorafenib: challenges and solutions. *J Hepatocell Carcinoma* 4: 131-138.
  202. Brodowicz T, Liegl-Atzwager B, Tresch E, Taieb S, Kramar A, Gruenwald V, Vanseymortier M, Clisant S, Blay JY, Le Cesne A and Penel N (2015) Study protocol of REGOSARC trial: activity and safety of regorafenib in advanced soft tissue sarcoma: a multinational, randomized, placebo-controlled, phase II trial. *Bmc Cancer* 15: 127.
  203. Ettrich TJ and Seufferlein T (2014) Regorafenib. *Recent Results Cancer Res* 201: 185-196.
  204. Torre LA, Siegel RL, Ward EM and Jemal A (2016) Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25: 16-27.
  205. Kircher SM, Nimeiri HS and Benson AB, 3rd (2016) Targeting Angiogenesis in Colorectal Cancer: Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer J* 22: 182-9.

206. Strumberg D and Schultheis B (2012) Regorafenib for cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21: 879-889.
207. Abou-Elkacem L, Arns S, Brix G, Gremse F, Zopf D, Kiessling F and Lederle W (2013) Regorafenib Inhibits Growth, Angiogenesis, and Metastasis in a Highly Aggressive, Orthotopic Colon Cancer Model. *Molecular Cancer Therapeutics* 12: 1322-1331.
208. Carr BI, Cavallini A, Lippolis C, D'Alessandro R, Messa C, Refolo MG and Tafaro A (2013) Fluoro-Sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: Growth inhibition, quiescence, and recovery. *Journal of Cellular Physiology* 228: 292-297.
209. Chen DS, Wei L, Yu J and Zhang L (2014) Regorafenib Inhibits Colorectal Tumor Growth through PUMA-Mediated Apoptosis. *Clinical Cancer Research* 20: 3472-3484.
210. D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Giannuzzi G, Carella N, Messa C, Cavallini A and Carr BI (2014) Antagonism of Sorafenib and Regorafenib actions by platelet factors in hepatocellular carcinoma cell lines. *Bmc Cancer* 14: 351.
211. Fan LC, Teng HW, Shiao CW, Lin H, Hung MH, Chen YL, Huang JW, Tai WT, Yu HC and Chen KF (2014) SHP-1 is a target of regorafenib in colorectal cancer. *Oncotarget* 5: 6243-6251.
212. Tai WT, Chu PY, Shiao CW, Chen YL, Li YS, Hung MH, Chen LJ, Chen PL, Su JC, Lin PY, Yu HC and Chen KF (2014) STAT3 Mediates Regorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 20: 5768-5776.
213. D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Carella N, Messa C, Cavallini A and Carr BI (2015) Modulation of Regorafenib effects on HCC cell lines by epidermal growth factor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 75: 1237-1245.
214. Tsai JJ, Pan PJ and Hsu FT (2017) Regorafenib induces extrinsic and intrinsic apoptosis through inhibition of ERK/NF-kappaB activation in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 37: 1036-1044.
215. Tuchen M, Wilisch-Neumann A, Daniel EA, Baldauf L, Pachow D, Scholz J, Angenstein F, Stork O, Kirches E and Mawrin C (2017) Receptor tyrosine kinase inhibition by regorafenib/sorafenib inhibits growth and invasion of meningioma cells. *Eur J Cancer* 73: 9-21.
216. Cha Y, Kim HP, Lim Y, Han SW, Song SH and Kim TY (2018) FGFR2 amplification is predictive of sensitivity to regorafenib in gastric and colorectal cancers in vitro. *Mol Oncol* 12: 993-1003.

217. Mross K, Frost A, Steinbild S, Hedbom S, Buchert M, Fasol U, Unger C, Kratzschmar J, Heinig R, Boix O and Christensen O (2012) A phase I dose-escalation study of regorafenib (BAY 73-4506), an inhibitor of oncogenic, angiogenic, and stromal kinases, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 18: 2658-67.
218. Jones RL, Bendell JC, Smith DC, Diefenbach K, Lettieri J, Boix O, Lockhart AC, O'Bryant C and Moore KN (2015) A phase I open-label trial evaluating the cardiovascular safety of regorafenib in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 76: 777-84.
219. Kim ST, Kim TW, Kim KP, Kim TY, Han SW, Lee JY, Lim SH, Lee MY, Kim H and Park YS (2015) Regorafenib as Salvage Treatment in Korean Patients with Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Res Treat* 47: 790-5.
220. Osawa H (2017) Response to regorafenib at an initial dose of 120 mg as salvage therapy for metastatic colorectal cancer. *Mol Clin Oncol* 6: 365-372.
221. Nannini M, Nigro MC, Vincenzi B, Fumagalli E, Grignani G, D'Ambrosio L, Badalamenti G, Incorvaia L, Bracci R, Gasperoni S, Saponara M, Gatto L, Indio V, Astolfi A, Di Scioscio V, Casali PG, Tonini G, Aglietta M, Russo A, Biasco G and Pantaleo MA (2017) Personalization of regorafenib treatment in metastatic gastrointestinal stromal tumours in real-life clinical practice. *Ther Adv Med Oncol* 9: 731-739.
222. Zhao B and Zhao H (2017) Incidence and risk of hematologic toxicities in cancer patients treated with regorafenib. *Oncotarget* 8: 93813-93824.
223. Bayas A and Maurer M (2015) Teriflunomide for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: patient preference and adherence. *Patient Prefer Adherence* 9: 265-74.
224. Chan A, de Seze J and Comabella M (2016) Teriflunomide in Patients with Relapsing-Remitting Forms of Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 30: 41-51.
225. He D, Zhang C, Zhao X, Zhang Y, Dai Q, Li Y and Chu L (2016) Teriflunomide for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 3: Cd009882.
226. Miller AE (2017) Oral teriflunomide in the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis: clinical evidence and long-term experience. *Ther Adv Neurol Disord* 10: 381-396.
227. Fragoso YD and Brooks JB (2015) Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Pharmacol* 8: 315-20.

228. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J and Wiendl H (2014) Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* 74: 659-74.
229. Kasarello K, Cudnoch-Jedrzejska A, Czlonkowski A and Mirowska-Guzel D (2017) Mechanism of action of three newly registered drugs for multiple sclerosis treatment. *Pharmacol Rep* 69: 702-708.
230. Korn T, Magnus T, Toyka K and Jung S (2004) Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide-mechanisms independent of pyrimidine depletion. *J Leukoc Biol* 76: 950-60.
231. Li L, Liu J, Delohery T, Zhang D, Arendt C and Jones C (2013) The effects of teriflunomide on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Neuroimmunol* 265: 82-90.
232. Hail N, Jr., Chen P and Bushman LR (2010) Teriflunomide (leflunomide) promotes cytostatic, antioxidant, and apoptotic effects in transformed prostate epithelial cells: evidence supporting a role for teriflunomide in prostate cancer chemoprevention. *Neoplasia* 12: 464-75.
233. Hail N, Jr., Chen P, Rower J and Bushman LR (2010) Teriflunomide encourages cytostatic and apoptotic effects in premalignant and malignant cutaneous keratinocytes. *Apoptosis* 15: 1234-46.
234. Hail N, Jr., Chen P, Kepa JJ and Bushman LR (2012) Evidence supporting a role for dihydroorotate dehydrogenase, bioenergetics, and p53 in selective teriflunomide-induced apoptosis in transformed versus normal human keratinocytes. *Apoptosis* 17: 258-68.
235. Bilger A, Plowshay J, Ma S, Nawandar D, Barlow EA, Romero-Masters JC, Bristol JA, Li Z, Tsai MH, Delecluse HJ and Kenney SC (2017) Leflunomide/teriflunomide inhibit Epstein-Barr virus (EBV)- induced lymphoproliferative disease and lytic viral replication. *Oncotarget* 8: 44266-44280.
236. Jiang L, Zhang W, Li W, Ling C and Jiang M (2018) Anti-inflammatory drug, leflunomide and its metabolite teriflunomide inhibit NSCLC proliferation in vivo and in vitro. *Toxicol Lett* 282: 154-165.
237. Huang O, Zhang W, Zhi Q, Xue X, Liu H, Shen D, Geng M, Xie Z and Jiang M (2015) Teriflunomide, an immunomodulatory drug, exerts anticancer activity in triple negative breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 240: 426-37.
238. Zhang C and Chu M (2018) Leflunomide: A promising drug with good antitumor potential. *Biochem Biophys Res Commun* 496: 726-730.

239. Latchoumycandane C, Seah QM, Tan RC, Sattabongkot J, Beerheide W and Boelsterli UA (2006) Leflunomide or A77 1726 protect from acetaminophen-induced cell injury through inhibition of JNK-mediated mitochondrial permeability transition in immortalized human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 217: 125-33.
240. Rozman B (2002) Clinical pharmacokinetics of leflunomide. *Clin Pharmacokinet* 41: 421-30.
241. Papadopoulou A, Kappos L and Sprenger T (2015) Safety of teriflunomide for the management of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Saf* 14: 749-59.
242. Oh J and O'Connor PW (2013) Teriflunomide for the treatment of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 33: 45-55.
243. Jemaa M, Fezai M, Bissinger R and Lang F (2017) Methods Employed in Cytofluorometric Assessment of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem* 43: 431-444.
244. Pretorius E, du Plooy JN and Bester J (2016) A Comprehensive Review on Eryptosis. *Cell Physiol Biochem* 39: 1977-2000.
245. Zierle J, Bissinger R, Egler J and Lang F (2015) Lapatinib Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 2275-87.
246. Zierle J, Bissinger R, Bouguerra G, Abbes S and Lang F (2016) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Regorafenib. *Cell Physiol Biochem* 38: 160-72.
247. Zierle J, Bissinger R and Lang F (2016) Inhibition by Teriflunomide of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling Following Energy Depletion, Oxidative Stress and Ionomycin. *Cell Physiol Biochem* 39: 1877-1890.
248. Foller M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F and Feil R (2008) Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6771-6.
249. Nagata S, Suzuki J, Segawa K and Fujii T (2016) Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ* 23: 952-61.
250. Abed M, Thiel C, Towhid ST, Alzoubi K, Honisch S, Lang F and Konigsrainer A (2017) Stimulation of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by C-Reactive Protein. *Cell Physiol Biochem* 41: 806-818.
251. Koka S, Lang C, Niemoeller OM, Boini KM, Nicolay JP, Huber SM and Lang F (2008) Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on

- parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice. Cell Physiol Biochem 21: 481-8.
252. Lang PA, Kasinathan RS, Brand VB, Duranton C, Lang C, Koka S, Shumilina E, Kempe DS, Tanneur V, Akel A, Lang KS, Foller M, Kun JF, Kremsner PG, Wesselborg S, Laufer S, Clemen CS, Herr C, Noegel AA, Wieder T, Gulbins E, Lang F and Huber SM (2009) Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. Cell Physiol Biochem 24: 415-28.
  253. Alzoubi K, Alktifan B, Oswald G, Fezai M, Abed M and Lang F (2014) Breakdown of phosphatidylserine asymmetry following treatment of erythrocytes with lumefantrine. Toxins (Basel) 6: 650-64.
  254. Ibrahim UA, Yusuf AA and Ahmed SG (2016) The Pathophysiologic Basis of Anaemia in Patients with Malignant Diseases. Gulf J Oncolog 1: 80-89.
  255. Polak-Jonkisz D and Purzyc L (2012) Ca(2+) influx versus efflux during eryptosis in uremic erythrocytes. Blood Purif 34: 209-10; author reply 210.
  256. Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, Niemoeller OM, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F and Duranton C (2005) Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 372: 228-35.
  257. Hamilton LC, Vojnovic I and Warner TD (1999) A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. Br J Pharmacol 127: 1589-96.
  258. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Dominguez-Jimenez C, Aragon-Bodi A, Diaz Sanchez B and Sanchez-Madrid F (2009) Inhibition of tumour necrosis factor and IL-17 production by leflunomide involves the JAK/STAT pathway. Ann Rheum Dis 68: 1644-50.
  259. Siemasko K, Chong AS, Jack HM, Gong H, Williams JW and Finnegan A (1998) Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production. J Immunol 160: 1581-8.
  260. Mattar T, Kochhar K, Bartlett R, Bremer EG and Finnegan A (1993) Inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by leflunomide. FEBS Lett 334: 161-4.
  261. Moore RB, Mankad MV, Shriver SK, Mankad VN and Plishker GA (1991) Reconstitution of Ca(2+)-dependent K+ transport in erythrocyte

- membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J Biol Chem* 266: 18964-8.
262. Low FM, Hampton MB and Winterbourn CC (2008) Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxid Redox Signal* 10: 1621-30.
  263. Brugnara C, de Franceschi L and Alper SL (1993) Inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J.Clin.Invest* 92: 520-526.
  264. Fuentealba RA, Marasa J, Diamond MI, Piwnica-Worms D and Weihl CC (2012) An aggregation sensing reporter identifies leflunomide and teriflunomide as polyglutamine aggregate inhibitors. *Hum Mol Genet* 21: 664-80.
  265. Lang E, Jilani K, Bissinger R, Rexhepaj R, Zelenak C, Lupescu A, Lang F and Qadri SM (2015) Vitamin D-Rich Diet in Mice Modulates Erythrocyte Survival. *Kidney Blood Press Res* 40: 403-12.
  266. Atichartakarn V, Chuncharunee S, Archararit N, Udomsubpayakul U and Aryurachai K (2014) Intravascular hemolysis, vascular endothelial cell activation and thrombophilia in splenectomized patients with hemoglobin E/beta-thalassemia disease. *Acta Haematol* 132: 100-7.
  267. Conran N (2014) Intravascular hemolysis: a disease mechanism not to be ignored. *Acta Haematol* 132: 97-9.
  268. Mellman I, Coukos G and Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-489.
  269. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L and Kroemer G (2017) Immunosuppressive cell death in cancer. *Nature Reviews Immunology* 17: 402.

## 7 Erklärungen zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studien erfolgte in Zusammenarbeit mit Rosi Bissinger, welche als naturwissenschaftliche Doktorandin am Institut für Physiologie tätig war.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Rosi Bissinger von mir eigenständig durchgeführt. Lediglich eine Messung der reaktiven Sauerstoffspezies und eine Messung der Ceramid-Bildung wurden von den Kolleginnen Rosi Bissinger und Ghada Bouguerra übernommen (vgl. Abschnitt 3.1.5 und 3.2.5).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich mit Beratung durch das Institut für Biometrie und nach Anleitung durch Ghada Bouguerra und Rosi Bissinger.

Die Publikationen verfasste Prof. Dr. Florian Lang mit den von mir erhobenen Daten. Das Korrekturlesen und Ergänzen von Informationen erfolgte durch Rosi Bissinger und mich.

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

Tübingen, den 11.07.2018

Jens Timo Zierle

## 8 Veröffentlichungen

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

Zierle J, Bissinger R, Egler J and Lang F (2015) Lapatinib Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37: 2275-87.

Zierle J, Bissinger R, Bouguerra G, Abbas S and Lang F (2016) Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Regorafenib. *Cell Physiol Biochem* 38: 160-72.

Zierle J, Bissinger R and Lang F (2016) Inhibition by Teriflunomide of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling Following Energy Depletion, Oxidative Stress and Ionomycin. *Cell Physiol Biochem* 39: 1877-1890.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Florian Lang danken. Er gab mir die Möglichkeit zu forschen und ließ meinen Jugendtraum wahr werden. Nicht nur seine klugen Ratschläge, seine beständige Unterstützung und bedingungslose Zusammenarbeit, sondern auch seine immens motivierende und positive Art haben mich geleitet und inspiriert. Es war mir eine unbeschreibliche Freude, unter seiner Supervision zu arbeiten.

Meiner Betreuerin Rosi Bissinger danke ich von ganzem Herzen für die verständliche Einführung in die Labortätigkeit, für ihr Vertrauen, für ihre zuverlässige Unterstützung im Labor und beim Erstellen der Publikationen. Die Zusammenarbeit mit ihr schätze ich in höchstem Maße. Ich wünsche ihr auf ihrem Weg alles erdenklich Gute.

Dank gilt auch meinen Laborpartner/innen Ghada Bouguerra, Jasmin Egler, Elena Signoretto, Kousi Al Zoubi, Thomas Peter, Katja Stockinger, Antonella Fazio, Marilena Briglia und Arbace Officioso für freudige Gespräche und einen sehr angenehmen Austausch über die Arbeit, die Politik und das private Leben. Außerdem danke ich Ferruh Artunc für seine Unterstützung bei dem Rekrutieren von Patienten der Dialysestation und Mehrdad Ghasghaeinia für sehr unterhaltsame und oft lehrreiche Konversationen.

Ferner danke ich meinen lieben Freunden für großartige gemeinsame Erfahrungen während der Studienzeit und das Fortbestehen der Freundschaft über Stadt – und Ländergrenzen hinweg.

Last but not least danke ich sehr herzlich meiner Familie. Meinen Großeltern verdanke ich meine Ruhe und Gelassenheit, mein Bruder lehrte mich die Abenteuerlust, mein Vater gab mir den Scharfsinn und meiner Mutter verdanke ich die Liebe. Ohne euch wäre ich nicht bis hier gekommen.