

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

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

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

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

vorgelegt von

Susanne Roswitha Johanna Barking

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Borrmann

Tag der Disputation: 24.04.2017

Für meine Familie

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
2 Grundlagen.....	2
2.1 Erythrozyten.....	2
Die Bildung der Erythrozyten.....	2
2.2 Apoptose und Nekrose	3
2.2.1 Extrinsische Signalkaskade.....	5
2.2.2 Intrinsische Signalkaskade	6
2.3 Eryptose	8
Medizinische und physiologische Relevanz der Eryptose.....	11
2.4 Malaria.....	12
2.4.1 Übertragung.....	17
2.5 Mefloquin.....	20
2.5.1 Strukturformel von Mefloquin.....	20
2.5.2 Eigenschaften	20
2.5.3 Arylaminoalkohol Chinin.....	22
2.5.4 Pharmakologische Bedeutung Mefloquin.....	22
2.5.5 Nebenwirkungen von Mefloquin	23
2.5.6 Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole.....	23
3 Ziel der Studie	26
4 Materialien	27
4.1 Erythrozyten.....	27
4.2 Verwendete Substanzen	27
4.2.1 Ringer-Lösung	27
4.2.2 Annexin Wash Buffer	28
4.2.3 Mefloquin	29
4.2.4 DCFDA	29
4.2.5 Fluo-3 AM Ester	29
4.2.6 Annexin-V FITC.....	30
4.2.7 Phosphate Buffered Saline (PBS)	30
4.2.8 FACS-Analyse – Durchflusszytometrie	31
5 Methoden	33
5.1 Die Vorbereitung zur Messung.....	33
5.2 Messung der Phosphatidylserin-Exposition an der Membranoberfläche	34
5.3 Messung des Zellvolumens	34
5.4 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	34
5.5 Messung der Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in den Erythrozyten	35
5.6 Messung des intrazellulären Ceramidgehaltes	36

5.7	Statistik	37
6	Ergebnisse.....	38
6.1	Beeinflussung der Annexin-V Bindung durch Mefloquin	38
6.2	Beeinflussung des Zellvolumens durch Mefloquin.....	41
6.3	Einfluss von Mefloquin auf die Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS).....	44
6.4	Einfluss auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten	47
6.5	Der Einfluss von Mefloquin auf die Menge an Ceramid	52
7	Diskussion.....	55
7.1	Methodendiskussion	55
7.2	Ergebnisdiskussion	56
8	Zusammenfassung	62
9	Literaturverzeichnis.....	63
10	Veröffentlichungen	72

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APLT	Aminophospholipidtranslokase
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	B-cell-associated death promoter
Bak	B-cell-2 homologus antagonist/ killer
Bax	B-cell-2 associated X-protein
Bcl	B-cell
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain agonist
Bim	B-cell-2 like protein 11
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CD	Cluster of differentiation
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low PI
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Eritropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorting
FADD	FAS-associated death domain
FITC	Fluoreszenzthiozyanat
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-convertig enzyme
FLIP	FLICE inhibitor protain

FSC	Forward Scatter
H	Wasserstoff
HEPES	N-2- Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
K	Kalium
Mg	Magnesium
mM	Millimolar
N	Probenzahl
N	Stickstoff
Na	Natrium
NO	Stickoxid
O	Sauerstoff
P	Phosphat
PAF	Platelet activating factor
PGE	Prostaglandin E
PTP	Permeability transition pores
RPM	Rounds Per Minute
S	Schwefel
SEM	Standardfehler
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSC	Side Scatter
tBid	Truncated Bid
TNFR	Tumor Necrose Faktor Rezeptor
TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Recptor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der extrinsische Signalweg der Apoptose (Roland Netzker: „Die Apoptose“, S. 517-521 in Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann, Duale Reihe Biochemie, 2006, Georg Thieme Verlag, Stuttgart).....	6
Abbildung 2: Suizidaler Zelltod, induziert durch osmotischen Schock (Lang Lang et al. 2006).....	8
Abbildung 3: Risiko der Malariaausbreitung 2005 (Guerra Snow et al. 2006)...	14
Abbildung 4: Ein Anopheles stephensi Moskito bei der Nahrungsaufnahme (Rinaldi 2004)	17
Abbildung 5: Infektionskreislauf der Malaria (Neill 2011).....	18
Abbildung 6: Strukturformel von Mefloquin (Sousa Milner et al. 2014).....	20
Abbildung 7: Arylaminoalkohole (Schlitzer 2009)	21
Abbildung 8: Wirkungsweise Arylaminoalkohole anhand von Chloroquin (Schlitzer 2009).....	25
Abbildung 9: Original-Histogramm. Annexin-V Bindung von Erythrozyten nach einer Inkubation von 48 h in Ringerlösung mit Mefloquin in steigender Konzentration von 1,25 bis 50 µg/ml (schwarze Linien) und ohne (graue Fläche) Mefloquin. M1 zeigt die Fluoreszenz von Annexin-V an, welche den Prozentsatz der Erythrozyten, die Annexin-V binden, widerspiegelt (Bissinger Barking et al. 2015).....	38
Abbildung 10: Messung der Annexin-V Bindung in Ringer-Lösung/DMSO + 0, 2,5, 5, 10 µg/ml Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)	39
Abbildung 11: Anzahl (%) der Annexin-V bindenden Erythrozyten (n=15) in Prozent in Form einer linearen Funktion in Abhängigkeit der Mefloquinkonzentration (Bissinger Barking et al. 2015)	40
Abbildung 12: Darstellung einer semilogarithmischen Funktion der Annexin-V bindenden Erythrozyten (n=15) in Prozent, abhängig von der Mefloquinkonzentration (Bissinger Barking et al. 2015)	41
Abbildung 13: Darstellung des Histogramms einer Messung des Forward Scatters der Erythrozyten, nach einer Inkubation von 48 Stunden in Ringerlösung mit und ohne Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015).....	42
Abbildung 14: Arithmetisches Mittel (n=10) des Forward Scatters (FSC), in Abhängigkeit verschiedener Mefloquinkonzentrationen (Bissinger Barking et al. 2015).....	43
Abbildung 15: Forward Scatter der Erythrozyten, dargestellt als Funktion in Abhängigkeit der Konzentration von Mefloquin (n=15). Die Messwerte ergaben bei 5 µg/ml (* $P < 0,05$) Mefloquin einen gemittelten Messwert von $433,8 \pm 13,62$ und erreichen so statistische Signifikanz. Bei 50 µg/ml (** $p < 0,001$) Mefloquin ist der Wert mit $238 \pm 23,71$ deutlich niedriger. So wird die Signifikanz zum Kontrollansatz ohne Mefloquin noch deutlicher der bei $509,8 \pm 5,123$ lag (ANOVA) (Bissinger Barking et al. 2015).....	44
Abbildung 16: Histogramm der Messung der Fluoreszenz von 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFDA) in Erythrozyten nach einer Inkubation von 48 Stunden mit und ohne Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015).....	45

Abbildung 17: Mittelwerte der Fluoreszenzen von DCFDA mit den Konzentrationen von 0 und 10 µg/ml Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)	46
Abbildung 18: DCFDA Fluoreszenz, dargestellt als lineare Funktion, in Abhängigkeit der Mefloquinkonzentration (n=9). Die Zunahme der Fluoreszenz war bei ** (P<0,01) und bei *** (P<0,001) signifikant (ANOVA). Bei 5 µg/ml betragen die ermittelten Mittelwerte der Proben 18,77 ± 1,415 und bei 10 µg/ml 21,93 ± 1,685. Die Kontrollprobe lag bei 12,1 ± 0,3207 (Bissinger Barking et al. 2015).	46
Abbildung 19: Originalhistogramm der Fluoreszenz von Fluo-3-AM in Erythrozyten, die ohne (graue Fläche) und mit Mefloquin (schwarze Linien) mit einer Konzentration von 1,25 - 10 µg/ml, inkubiert wurden (Bissinger Barking et al. 2015).	48
Abbildung 20: Arithmetisches Mittel +/- SEM (n=10) der Fluo3-Fluoreszenz von Erythrozyten nach 48 Stunden Exposition in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) Mefloquin (2,5 bis 10 µg/ml). Der intrazellulären Calciumgehalt erreicht mit *** (P<0,001) deutliche Signifikanz bei einer Mefloquinkonzentration von 10 µg/ml (Bissinger Barking et al. 2015).	49
Abbildung 21: Darstellung des intrazellulären Calciumgehaltes in Abhängigkeit der Mefloquinkonzentration (n=15) (Bissinger Barking et al. 2015).	50
Abbildung 22: Originalhistogramm der Annexin-V-Bindung, nachdem die Zellen 48 Stunden in Calciumfreier Ringerlösung inkubiert wurden (Bissinger Barking et al. 2015).	51
Abbildung 23: Arithmetisches Mittel +/- SEM der Phosphatidylserin-Exposition von Erythrozyten (%) in calciumhaltiger/calciumfreier Ringerlösung, jeweils mit und ohne Mefloquin (n=8).	52
Abbildung 24: Histogramm des Ceramidhäufigkeit, an der Oberfläche der erythrozyten, nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden (Bissinger Barking et al. 2015).	53
Abbildung 25: Arithmetisches Mittel +/- SEM des Ceramidgehaltes (n=4) an der Oberfläche der Zellen, nach Inkubation ohne (weißer Balken) und mit 10 µg/ml Mefloquin (schwarzer Balken) (Bissinger Barking et al. 2015).	54
Abbildung 26: Ceramidgehalt der Erythrozyten, abhängig von verschiedenen Konzentrationen an Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015).	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Plasmodien: Erreger der Malaria	13
Tabelle 2: Zusammensetzung der Ringerlösung	28
Tabelle 3: Zusammensetzung des Annexin Wash Buffers	28
Tabelle 4: Zusammensetzung der PBS	31

1 Einleitung

Der Begriff „Blut“ wird in verschiedenen Kulturen und Epochen, mit dem Leben gleichgesetzt.

Ebenso wurden ihm magische und heilende Kräfte zugesprochen, wie zum Beispiel in der alternativen Medizin. Jegliche Krankheiten können hier durch fremdes Blut geheilt werden, sogar Charakterzüge können vom Spender auf den Empfänger übertragen werden. Dem Blut wird somit auch eine Seelenkraft zugeschrieben. Diese wird ebenso in Goethes „Faust“ deutlich. Das Blut gilt hier als „metaphysisches Bindemittel“, welches von Mephisto verwendet wird, der als teuflischer Verführer von Faust auftritt. Er lässt Faust, anstatt mit Tinte, mit dessen Blut den Vertrag unterschreiben, der ihm mit diesem seine Seele verkauft.

Blut hat auch Einfluss auf soziale Gemeinschaften: mit dem Begriff „Blutsverwandtschaft“ wurden Zusammenhänge gebildet, aber auch einzelne Menschen aus Gemeinschaften ausgegrenzt. Die Gesellschaft war somit vom Blut abhängig.

Es galt ebenso als Leben,- und sogar als Todbringer: Menstruationsblut, galt als unrein und schadensbringend (Knust & Groß 2010). Beim „bösen Blut“ wird beispielsweise die weit zurückreichende Angst vor dem Menstruationsblut deutlich, oder auch in der antiken Medizinlehre ist hiermit das venöse Blut gemeint ist, welches Verantwortlich für Hass und Schlechtigkeit ist. Nach einer Redensart kann „gutes Blut“ zu „bösem Blut“ werden (Kempe Lang et al. 2006).

2 Grundlagen

2.1 Erythrozyten

Die Bildung der Erythrozyten

Die Hämatopoese findet beim Menschen, je nach Alter und Entwicklungsstand, an verschiedenen Orten statt. In den ersten zwei Monaten der Schwangerschaft ist der Dottersack des Fetus verantwortlich für die Erythrozytenbildung. In den darauffolgenden zwei Monaten findet die Bildung in Leber und Milz statt. Ab dem fünften Fetalmonat ist es dann hauptsächlich das Knochenmark, welches für die Bildung unserer Erythrozyten verantwortlich ist. Dies ist der Ort, an dem die roten Blutkörperchen vom Kindesalter bis ins Erwachsenenalter gebildet werden. Erythrozyten gehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen hervor, diese wiederum aus pluripotenten Stammzellen (Hoffbrand 2003).

Die roten Zellen des Blutes machen 99 % des Hämatokrits aus. Sie sind scheibenförmig und besitzen eine zentrale Einkerbung. Bei einem Durchmesser von 7,5 µm beträgt ihre Dicke 1,5 µm. In einem Mikroliter Blut des Erwachsenen befinden sich $4,0 - 6,2 \times 10^6$ Erythrozyten. Ihre Aufgabe ist es, Sauerstoff mit Hilfe des Proteins Hämoglobin zu transportieren. Sie übernehmen auch einen Teil des Kohlenstoffdioxidtransportes und beeinflussen den pH Wert des Blutes. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und keine Zellorganellen. Sie sind stark verformbar, was sie durch kleinste Kapillaren hindurch schlüpfen lässt. Ihre Lebenszeit beträgt 120 Tage. Mit steigendem Alter nimmt ihre enorme Verformbarkeit ab und sie werden dann von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) durch Phagozytose abgebaut. Der Abbau erfolgt extravaskulär, in Leber und Milz in den Kupferzellen (Willekens Werre et al. 2008).

Alternde Erythrozyten exprimieren Phosphatidylserin. Sie schrumpfen und geben kleine Vesikel ab, die ferner von Makrophagen aufgenommen werden können (Willekens Werre et al. 2008).

Das frei gewordene Eisen wird dann zum Knochenmark transportiert, in welchem sich die Erythroblasten befinden. Ebenfalls frei gesetztes Protoporphyrin wird zu Bilirubin abgebaut (Hoffbrand 2003).

Die starke Verformbarkeit haben die Erythrozyten ihrem Zytoskelett zu verdanken. Dieses besteht aus Spektrinfilamenten, die durch Aktinfilamente zusammengehalten werden.

2.2 Apoptose und Nekrose

Es können zwei Arten beim Untergang der Zelle unterschieden werden: Apoptose und Nekrose.

Die Nekrose ist, im Gegensatz zur Apoptose, ein pathologischer Prozess, welcher durch verschiedene Bedingungen, die auf die Zelle einwirken, ausgelöst werden kann und eine akute Zellschädigung hervorgerufen wird. Dies können Strahlen oder Gifte sein, oder aber auch mechanische Reize können die Nekrose aktivieren. Hierdurch entsteht eine Zellschwellung und es resultiert die Zerstörung der Zelle und ferner eine Freisetzung des Zellinhalts. Dieses sind Zellorganellen und Zytoplasma, die nun in den Interzellularraum gelangen. Sie müssen anschließend mittels Phagozytose beseitigt werden. Mit der Einwanderung der dafür verantwortlichen Makrophagen, entsteht die Entzündung (Lang & Lang 2007).

Beim physiologischen Prozess, der Apoptose, kommt es zum programmierten Zelltod und es wird in diesem Fall keine Entzündung ausgelöst. Der Körper nutzt dieses kontrollierte Handeln, um beispielsweise Zellüberschuss zu verhindern oder den Tod von Zellen mit fehlerhaftem genetischen Material zu eliminieren (Gulbins Jekle et al. 2000). Apoptose ist ebenfalls wichtig als kontrollierter Prozess bei der Entwicklung des Menschen. Verschiedene Gewebe und Gliedmaßen werden so, durch Apoptose geformt (van den Berg 2005).

Es kommt nicht wie bei der Nekrose zur Zellschwellung, sondern zum Schrumpfen der Zelle. Das Chromatin wird verdichtet, was als Pyknose bezeichnet wird. Anschließend resultiert die Fragmentierung des Chromatins. Die DNA zerfällt in ihre Untereinheiten. Es folgt die Blasenbildung an der Zytoplasmamembran

nach Extrazellulär (Golstein & Kroemer 2007). Dieses wird auch als „Blebbing“ bezeichnet. Die Apoptosekörperchen werden gebildet. Diese können anschließend von Phagozyten aufgenommen werden (Kataoka & Tsuruo 1996). Um die Aufnahme zu ermöglichen, ist es wichtig, dass die Apoptosekörperchen mit dem Phospholipid Phosphatidylserin (PS) markiert sind. Dieses findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembranen und wird nur bei der Apoptose an die Zellaußenseite transloziert. PS ist der „Erkennungstoff“ für die Makrophagen. Somit können diese alle Zellreste der apoptotischen Zelle beseitigen, ohne dass, wie bei der Nekrose üblich, das umliegende Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird.

Bei der Phagozytose der Apoptosekörperchen wird unter anderem Interleukin-10 frei, eines der vielen Cytokine, die hierbei freigesetzt werden. Unter anderem wird der ebenso antiinflammatorisch wirkende Wachstumsfaktor „Beta“ freigesetzt. So spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei vielen Erkrankungen, wie Autoimmun- oder Tumorleiden (Chaurio Janko et al. 2009). Auch bei dem Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) spielt der programmierte Zelltod eine Rolle (Miura & Koyanagi 2005). Bei unversehrter Apoptose werden gebildete Zellen, die eine Gefahr für den Körper darstellen, frühzeitig erkannt und eliminiert. Die Apoptose kontrolliert die Anzahl der Zellen und die Größe von Geweben. Bei der embryonalen Entwicklung werden durch Apoptose Teile der Extremitäten geformt, wie die Finger und Zehen. Auch bei der Bildung von holokrinen Organen, wie Talgdrüsen, ist der programmierte Zelltod erforderlich und beispielsweise bei der Entwicklung des Gehirns werden durch den programmierten Zelltod die Neuronen weiterentwickelt (Burek & Oppenheim 1996).

Es gibt zwei große Signalwege der Apoptose. Der erste Signalweg, der extrinsische Weg, wird durch Todesrezeptoren von außerhalb der Zelle ausgelöst. Der zweite Signalweg ist der intrinsische Weg, oder der mitochondriale Signalweg. Er wird vom Inneren der Zelle her ausgelöst.

2.2.1 Extrinsische Signalkaskade

Hier gibt es verschiedene Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran, die Todessignale in das Zellinnere weiterleiten. Es kann zwischen verschiedenen Todesrezeptoren unterscheiden werden: Den TNFR1-Rezeptor, TRAILR- Rezeptoren und der Fas-Rezeptor, auch CD95- Rezeptor genannt. Zur dessen Aktivierung muss ein Ligand an den Rezeptor binden. Durch diese Bindung wird ein Adapterprotein (FADD) auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran gebunden. Es entsteht ein Proteinkomplex (DISC) aus Ligand, Rezeptor und Adapterprotein. Das gebundene FADD aktiviert die Prokaspase-8, welche einerseits entweder wiederum das BCL-2 Protein Bid spalten kann oder andererseits bei hoher Konzentration an Prokaspase-8, die Prokaspasen-3/7/6 aktiviert und hierdurch die Apoptose einleitet (Suliman Lam et al. 2001).

Das gespaltene Bid verursacht die Ausschüttung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma.

Bei der Bindung des Liganden TNF an den Todesrezeptor TNFR1 entsteht ein erster Komplex. Hierbei wird TRADD mobilisiert und bildet im Zytoplasma einen zweiten Komplex mit FADD und Prokaspase-8. Dieser zweite Komplex hat auch die Möglichkeit, durch FLIPL die weitere Apoptose verhindern (Micheau & Tschopp 2003).

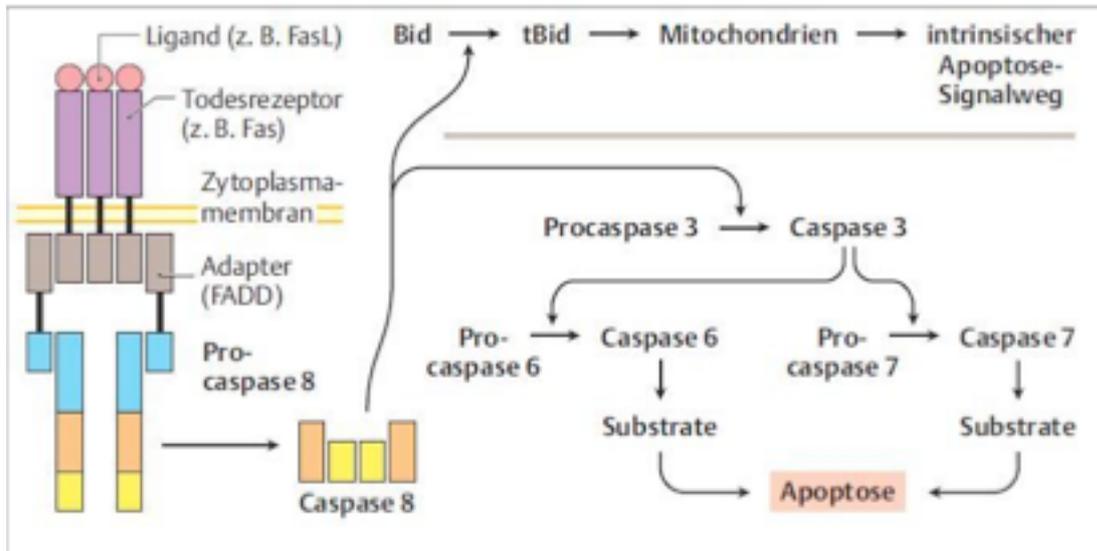


Abbildung 1: Der extrinsische Signalweg der Apoptose (Roland Netzker: „Die Apoptose“, S. 517-521 in Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann, Duale Reihe Biochemie, 2006, Georg Thieme Verlag, Stuttgart)

2.2.2 Intrinsische Signalkaskade

Sie löst die Apoptose aus dem Innern der Zelle aus. Dieses wird hauptsächlich über die BCL-2 Proteine reguliert (Cory & Adams 2002). Auslösende Faktoren für den intrinsischen Weg der Apoptose können Hitze, verschiedene Strahlungsarten, wie ionisierende – und UV Strahlung, oxidativer Stress, sowie chemische Gifte sein (Kluck Bossy-Wetzler et al. 1997). Ebenso ein Mangel an Wachstumsfaktoren kann diesen Weg initiieren (Labi Erlacher et al. 2006). Die Proteine Bax und Bak, welche proapoptotisch wirken, liegen in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Diese werden durch die schon erwähnten antiapoptotischen BCL-2 Proteine inhibiert. Diese wirken auch gegen die Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Zamzami Brenner et al. 1998). BCL-2 Proteine können durch verschiedene Mechanismen inaktiviert werden. Dann verursachen Bax und Bak ungehindert die Freisetzung von Cytochrom C aus der äußeren Mitochondrienmembran durch gebildete Poren. Diese werden PTP (Permeability Transition Pores) genannt und können auch durch den intrazellulären Calciumspiegel beeinflusst werden (Zamzami Brenner et al. 1998; Orrenius 2004). Das

frei gewordene Cytochrom C formt das Apoptosom. Dieses ist ein Gebilde, das gemeinsam mit Apaf-1 und der Prokaspase 9 erzeugt wird. Apaf-1 stellt hier ein im Zytosol vorkommendes Adapterprotein dar. Es lagert sich die Prokaspase-9 dem Apaf1 über die demaskierte CARD Region (caspase activation and recruitment domain) an (Hill Adrain et al. 2004; Pop Timmer et al. 2006). Die, durch die Prokaspase-9 aktivierte Kaspase-9, leitet den Signalweg weiter zu den darauf folgenden Kaspasen. AIF (apoptosis inducing factor) wird aus dem Intermembranraum der Mitochondrien frei, welches im Zellkern zu Chromatin-kondensation und DNA-Fragmentierung führt (Miramar Costantini et al. 2001).

Die intrinsische Signalkaskade kann auch durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) ausgelöst werden. Unter anderem synthetisiert und transportiert es Proteine, es werden Proteine gefaltet und noch dazu stellt das Endoplasmatische Retikulum den intrazellulären Calciumspeicher der Zelle dar. Das ER ist in der Lage durch die Aktivierung von Kaspase 12 die Apoptose auszulösen, ohne Cytochrom C oder Apaf-1. Die Kaspase 12 ist an der Innenseite des ER lokalisiert. Durch Stress auf das ER, zum Beispiel durch fehlerhafte Faltung von Proteinen oder durch Veränderung der Calcium Homöostase, folgt die Aktivierung der im ER lokalisierten Kaspase. Diese initiiert wiederum die Freisetzung der Kaspasen 7 und 9 (Rao Ellerby et al. 2004).

Die Bcl-2 Proteine kontrollieren das intrinsische System. Es gibt proapoptotisch wirkende Proteine dieser Gruppe, wie zum Beispiel Bax und Bak und Proteine aus der Bcl-2 Familie, die antiapoptotisch wirken (Vaux Weissman et al. 1992). Diese sind unter anderem Bcl-2, und Bcl- XL. BH3- only- Proteine wie Bid und Bad erkennen Signale und leiten diese weiter. Beim Entzug von Wachstumsfaktoren wird Bad aktiviert. Über das Spaltprodukt tBid (truncated Bid) wird ein Signal durch Bid bis an das Mitochondrium weitergegeben (Leibowitz & Yu 2010). Die Proteine, die aus der Bcl-2 Gruppe entstammen, überwachen die Freisetzung von Cytochrom C und AIF.

Ebenso ist es den Proteinen „Smac (second mitochondria-derived Activator of Caspases)“ und „Diablo (Direct IAP-binding Protein with low PI)“ möglich, die Apoptose zu regulieren (Shi 2002). Bei ihrer Freisetzung blockieren sie die IAPs und somit können diese die eingeleitete Apoptose nicht mehr verhindern. Smac

und Diablo werden aus der äußeren Mitochondrienmembran bei der Porenbildung freigesetzt (Hengartner 2000). Die IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) regulieren die Apoptose, indem sie spontan ausgelöste Kaspaseaktivierung unterdrücken. Sie blockieren die Kaspasen 3, 7 und 9 im aktiven Zentrum (Deveraux & Reed 1999; Salvesen & Duckett 2002). Aus einem abgespaltenem Peptid, entsteht eine Prokaspase. Beim extrinsischen System verhindert FLIP (FLICE- inhibitor protein) die Bindung und damit die Aktivierung der Kaspase 8 (Yu & Shi 2008).

2.3 Eryptose

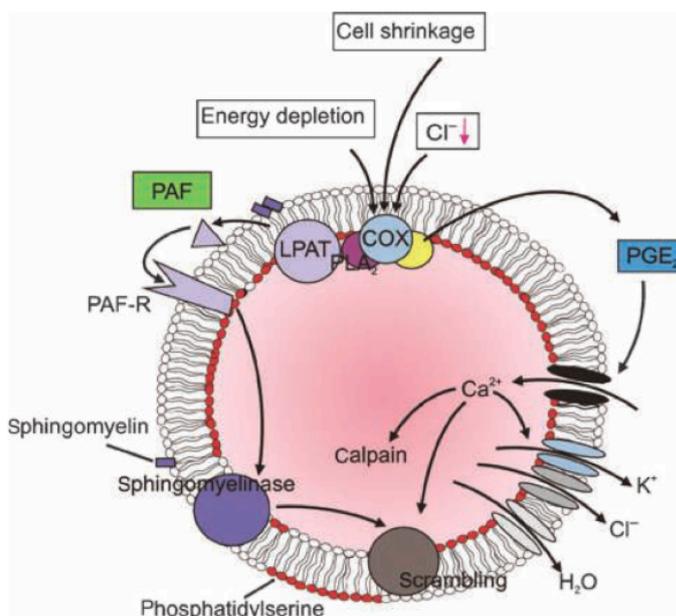


Abbildung 2: Suizidaler Zelltod, induziert durch osmotischen Schock (Lang Lang et al. 2006)

Die Eryptose stellt den suizidalen Zelltod der Erythrozyten dar. Erythrozyten besitzen keine Mitochondrien und Zellkerne. Ihr Zelltod hebt sich in wesentlichen Teilen von kernhaltigen Zellen ab. Es wurde für diese Weise des suizidalen Zelltod so der Begriff „Eryptose“ eingeführt (Lang Lang et al. 2005). Da dem Erythrozyt Mitochondrium und Zellkern fehlt, wurde lange angenommen, dass

dieser zu einem suizidalen Zelltod, wie er bei kernhaltigen Zellen vorkommt, nicht in der Lage ist. Diese Annahme wurde auch durch die Tatsache bestärkt, dass Erythrozyten in vitro ohne Serum sehr lange überleben können, auch wenn eine Zugabe von Staurosporin folgt (Daugas Cande et al. 2001). Als man jedoch Erythrozyten der Kalziumionophore Ionomycin aussetzte, zeigte sich Mikrovesikulation der Plasmamembran der Erythrozyten. Ebenso wurde eine Zellschrumpfung und die Exposition von Phosphatidylserin an der Membranoberfläche beobachtet (Berg Engels et al. 2001). Dies macht es möglich, dass diese Erythrozyten innerhalb einer Stunde aus dem Blutkreislauf eliminiert werden können, indem das exponierte Phosphatidylserin von Makrophagen auffindig gemacht werden kann und ferner der Abbau der Erythrozyten eingeleitet wird (Schroit Madsen et al. 1985; Boas Forman et al. 1998). Die Eryptose tritt bei Erythrozyten physiologisch nach etwa 100 bis 120 Tagen ein. Somit werden die alternden, unbrauchbaren Erythrozyten ausgetauscht und können so, durch junge rote Blutkörperchen, ersetzt werden. In ihrer Lebenszeit werden sie vielen Stressfaktoren ausgesetzt, welche die Eryptose begünstigen. Sie müssen sich durch sehr kleine Öffnungen in den Gefäßwänden zwängen, die viel winziger sind als sie selbst. In den Kapillaren werden sie großen Scherkräften ausgesetzt, was ebenso eine mechanische Belastung darstellt. In der Lunge erwartet sie oxidativer Stress und in der Niere werden sie hyperosmolarem Milieu ausgesetzt.

Es sind verschiedenen Faktoren, die die Eryptose begünstigen und hervorrufen können. Zum einen wird durch oxidativen Stress, welcher auf den Erythrozyt einwirkt, Calcium permeable Kationenkanäle geöffnet. Es kommt zum Einstrom von Calcium in die Zelle. Der intrazelluläre Calcium Spiegel steigt an, es folgt eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Die calciumsensitiven Kalium-Kanäle werden als „Gardos-Kanäle“ bezeichnet. Durch diese kommt es zum Ausstrom von Kalium aus der Zelle. Daraus resultiert zum Ausgleich ein Ausstrom von Chlorid durch die Membran und diesem hängt sich Wasser an, welches osmotisch mitgezogen wird. Es kommt zum Schrumpfen der Zelle (Lang Kaiser et al. 2003). Neben der Faltung der Zellmembran kommt es an der Zelloberfläche auch zur Exposition von Phosphatidylserin (Lang Lang et al. 2005).

Die Gardos-Kanäle, werden durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert. Auch der calciumsensitive Enzymkomplex Scramblase wird durch den steigenden Spiegel an Calcium angeregt. Die Scramblase wird durch das Enzym Translokase ATP-abhängig kontrolliert (Seigneuret & Devaux 1984). Die Translokase wird gehemmt und durch die Scramblase gelangt das auf der Innenseite der Membran gelegene Phosphatidylserin auf die Außenseite (Lang Kaiser et al. 2003) und wird so den Makrophagen präsentiert. Diese beginnen dann den Erythrozyten zu phagozytieren und anschließend in ihrem Innern abzubauen (Fadeel 2004).

Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration kann das aktive Zentrum des Enzyms „Calpain-Protease“ aktivieren, die das Zytoskelett der Erythrozyten auflöst, indem es Spektrin und Ankyrin zerstört (Pant Virmani et al. 1983; Daugas Cande et al. 2001).

In hyperosmolarer Lösung wird durch das Schrumpfen des Erythrozyten der PAF (platelet activating factor) freigesetzt. Dieser aktiviert die Sphingomyelinase, die Ceramid freisetzt. Dieses wird unter Spaltung der Phosphodiesterbindung von Sphingomyelin, einem membranständigen Lipid, freigesetzt. Das gebildete Ceramid sensitiviert voraussichtlich die calciumsensitive Scramblase, was zu einer vermehrten Exposition an Phosphatidylserin an der Membranoberfläche führt (Lang Myssina et al. 2004; Lang Lang et al. 2005).

Prostaglandin E2 ist ein weiterer Trigger der Eryptose. Dieses wird in der Umgebung von chloridfreier und hyperosmolarer Lösung ausgeschüttet und bewirkt eine Öffnung der unselektiven Kationenkanäle und ebenso eine vermehrte Exposition an Phosphatidylserin (Lang Lang et al. 2005; Foller Huber et al. 2008).

Während der Eryptose ist die Rolle der Kaspasen nicht so bedeutend wie bei kernhaltigen Zellen. In Erythrozyten konnte weder Cytochrom C, APAF-1 noch Kaspase 9 gefunden werden (Berg Engels et al. 2001). Es ließen sich jedoch Kaspase 3- und 8 aufweisen, vor allem in gealterten Erythrozyten ist der Anteil an Kaspase 3 höher. Die beiden Kaspasen wirken auf das Enzym Aminophospholipidtranslokase APLT. Dieses hält die Verteilung der Sphingophospholipide in der Zellmembran im Gleichgewicht (Mandal Mazumder et al. 2005).

Die Eryptose kann durch verschiedene Stoffe inhibiert werden:

Das Glykoproteinormon Erythropoietin (EPO) kann die Eryptose hemmen. Es bleiben so mehr aktive Erythrozyten für den Sauerstofftransport vorhanden. EPO hat Einfluss auf die Calcium-permeablen Kationenkanäle. Es bindet an EPO-Rezeptoren an der Membranoberfläche und unterdrückt den Calcium-einstrom in die Zelle und wirkt so inhibierend auf die Eryptose. Die Scramblase wird nicht durch den intrazellulären Calciumanstieg aktiviert und dadurch wird kein PS an der Membranoberfläche exprimiert (Myssina Huber et al. 2003).

Medizinische und physiologische Relevanz der Eryptose

Bei Hämoglobinopathien, deren Folge die hämolytische Anämie ist, spielt teilweise die Eryptose eine wichtige Rolle. Die Lebensdauer der Erythrozyten ist hier deutlich herabgesetzt. Hierzu zählen beispielsweise die Thalassämie, die Sichelzellanämie und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Hierbei reagieren die Erythrozyten sensibel auf osmotischen Schock, Gukoseentzug und oxidativen Stress (Lang Lang et al. 2005). Weitere Krankheiten bei denen Eryptose vermehrt eintritt sind Malaria und Niereninsuffizienz (Eda & Sherman 2002; Lang Lang et al. 2004). Außerdem tritt die Eryptose bei Eisenmangelanämie (Kempe Lang et al. 2006) und bei Phosphatmangel auf (Birka Lang et al. 2004). Ebenso ist bei Malaria der suizidale Zelltod der Erythrozyten in Verbindung mit Hyperthermie zu beobachten. So sterben die Erreger mit der Zelle ab und werden nicht intravasal freigesetzt (Foller Bobbala et al. 2009; Foller Braun et al. 2010).

Durch auf den Erythrozyten einwirkenden Stress setzt die Eryptose deutlich früher ein als die Hämolyse. Dies dient, wie vermutet wird, zum Schutz des Körpers. So werden keine intrazellulären Stoffe im Körper freigesetzt wie es sonst beim Eintreten der Hämolyse geschehen würde. So wird auch verhindert, dass freies Hämoglobin an endotheliales NO bindet, was die Verfügbarkeit von NO drastisch verringern kann. NO wirkt der Aggregation von Thrombozyten entgegen und führt zu Vasodilatation (Lang Beringer et al. 2006). Der bei Stress auf den Erythrozyten ansteigende intrazelluläre Calciumspiegel stimuliert die

Scramblase und dadurch die Phosphatidylserinpräsentation an der Zelloberfläche. Somit wird bewerkstelligt, dass durch die Phagozytose der gesamte Erythrozyt abgebaut werden kann. Auch die Gardoskanäle wirken der Hämolyse, dem Platzen der Zelle, entgegen. Sie werden durch den steigenden intrazellulären Calciumspiegel aktiviert, es wird Kalium aus der Zelle geleitet und die Zellschwellung wird somit verzögert (Lang Lang et al. 2005).

Die Beseitigung der Erythrozyten durch die Phagozytose schützt auch vor der Zirkulation der Phosphatidylserin präsentierenden Zellen. Diese haben eine deutlich höhere Affinität zum Gefäßendothel. So soll vermieden werden, dass diese am Endothel haften bleiben und so den Blutfluss beeinflussen können. Es könnte sonst zur Beeinträchtigung der Hämostase und zu Störungen in der Mikrozirkulation kommen (Andrews & Low 1999), was bei den Erkrankungen Alzheimer (Nicolay Gatz et al. 2007) oder Diabetes mellitus Typ II (Nicolay Schneider et al. 2006) oder beispielsweise bei der Sepsis (Kempe Akel et al. 2007) eine Rolle spielt. Durch die Hämolyse kann es zu Schädigung der Nieren kommen, den sogenannten „Crush-Nieren“. Auch folgt auf Hämolyse eine deutliche Reaktion des Immunsystems auf die frei werdenden intrazellulären Bestandteile, wie Hämoglobin und eventuell vorhandene Krankheitserreger (Harrison Bunting et al. 1947).

Desoxigenierte Erythrozyten sind durch Ausschüttung von Stickoxid (NO) in der Lage, eine Vasodilatation der Gefäße auszulösen. So wirken sie der Eryptose entgegen (McMahon Moon et al. 2002). Koffein ist ebenso ein Stoff, der die Eryptose hemmt (Lang Gulbins et al. 2010).

2.4 Malaria

Am häufigsten verbreitet ist Malaria in Entwicklungsländern wie Afrika, Süd- und Mittelamerika und Südostasien. Schlechte Gesundheitssysteme, schlechte soziale und ökonomische Bedingungen begünstigen die Verbreitung. Pro Jahr stecken sich 300 bis 500 Mio. Menschen mit Malaria an, und es sterben jährlich 3 Millionen Menschen an dieser Krankheit, 90 Prozent davon in Afrika. Die To-

desrate an Kindern bis 5 Jahren ist besonders hoch (1999; Breman Egan et al. 2001).

Malaria wird durch den einzelligen Erreger Plasmodium verursacht. Bislang sind vier Stämme der Plasmodien humanpathogen. Zu diesen zählen das Plasmodium falciparum, das Plasmodium vivax, Plasmodium malariae und Plasmodium ovale (Weatherall Miller et al. 2002). Das Plasmodium knowlesi, welches bislang nur Makaken infizierte, steht jedoch nun im Verdacht, auch den Menschen infizieren zu können (Tachibana Sullivan et al. 2012).

Je nach Erreger, werden verschiedene Malariaformen unterschieden. P. ovale und P. vivax verursacht die Malaria tertiana, P. malariae führt zu Malaria quartana und P. falciparum ruft die Malaria tropica hervor.

Art der Malaria

Erreger

Art der Malaria	Erreger
Malaria Tertiana	P. ovale und P. vivax
Malaria Quartana	P. malariae
Malaria tropicana	P. falciparum

Tabelle 1 Plasmodien: Erreger der Malaria

In Südostasien, Indien und Westafrika ist der Erreger P. ovale lokalisiert (Mueller Zimmerman et al. 2007). In Südostasien, Lateinamerika und im südlich, der Sahara, gelegenen Afrika, ist P. falciparum am weitesten verbreitet (Sharma Tyagi et al. 2006). P. malariae und P. vivax kommen am häufigsten in Südamerika, Indien und Südostasien vor (Guerra Hay et al. 2007).

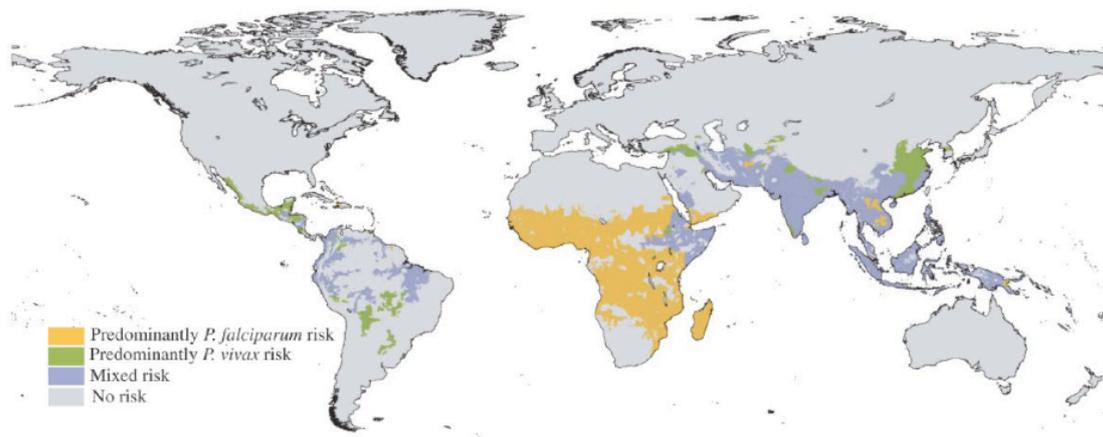


Abbildung 3: Risiko der Malariaausbreitung 2005 (Guerra Snow et al. 2006)

Die Todesrate ist bei Infizierten mit *P. falciparum* am höchsten. Dieser Stamm der Plasmodien ist sehr potent, da er Resistenzen gegenüber einigen Malaria-mitteln gebildet hat. Ein Beispiel hierfür ist das Malariamittel Chloroquin (Schlagenhauf Adamcova et al. 2010). Für Kinder und Schwangere ist der Krankheitsverlauf der Malaria besonders gefährlich. Der Erreger Plasmodium falciparum gilt als besonders bedrohlich. Es wird Reisenden davon abgeraten, sich mit Kindern in die von Malariaerregern befallenen Gebiete zu begeben (Schlagenhauf Adamcova et al. 2011). Die Erreger werden hauptsächlich durch den weiblichen Moskito der Gattung Anopheles übertragen.

Einige Krankheiten scheinen jedoch auch einen gewissen Schutz gegenüber Malaria zu bieten.

In den Epidemieregionen kann durch Malaria eine Art Selektion beobachtet werden (Ferreira Marguti et al. 2011). Individuen mit Sichelzellanämie, einer genetisch-bedingten erythrozytären Veränderung, erkranken nicht so schwer an Malaria. Dies trifft jedoch nur auf die heterozygote Form der Sichelzellanämie zu. Bei der homozygoten Form der Sichelzellanämie verschlechtert Malaria den Allgemeinzustand erheblich (Luzzatto 2012).

Bei Sichelzellanämie kommt es durch Punktmutation an Chromosom 11 in der Beta-Untereinheit des Hämoglobins zu einem Austausch der Aminosäure Glu-

taminsäure. Diese wird hier durch Valin ersetzt (Rees Williams et al. 2010). Dieses veränderte Hämoglobin wird auch Sichelzell-Hämoglobin (HbS) genannt. HbS nimmt bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck eine sichelförmige Gestalt an und führt bei den Betroffenen zu akutem Sauerstoffmangel (Rees Williams et al. 2010). In oxygeniertem Zustand zeigt das Sichelzellhämoglobin keine Auffälligkeit. Die desoxygenierten HbS sind aufgrund ihrer verminderten Verformbarkeit in der Lage, die Kapillaren zu verstopfen. Es kann insbesondere bei der homozygoten Form so zu einer gefährlichen Störung der Durchblutung kommen, welche auch als Sichelzellkrise bezeichnet wird und lebensgefährlich werden kann (Gee 2013). Die verformten Erythrozyten werden im Körper schneller in der Milz abgebaut. Die Folge ist eine hämolytische Anämie. Bei den heterozygoten Merkmalsträgern liegen jedoch nur etwa ein Prozent der Erythrozyten als HbS vor, wohingegen homozygote Merkmalsträger ausschließlich abnormes Hämoglobin bilden.

Die Wahrscheinlichkeit eines komplizierten Verlaufs der Malaria ist bei Individuen mit der heterozygoten Form zehnmal geringer im Vergleich zu Individuen mit normaler Hämoglobinbildung (Ackerman Usen et al. 2005). Mit dem Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten werden bei heterozygoten Merkmalsträgern von Makrophagen bevorzugt und dann schneller von ihnen ausgesondert. Die Anzahl von Plasmodium falciparum infizierten Zellen ist insgesamt geringer, die Sterberate von Malaria ist bei der heterozygoten Form deutlich niedriger (Luzzatto 2012).

Einen gewissen Schutz vor Malaria ist auch bei der Beta-Thalassämie erkennbar. Es kommt durch eine Punktmutation zu einer verringerten Bildung von Alpha- oder Beta Globinuntereinheiten des Hämoglobins. Daraus resultiert die Alpha-oder Beta-Thalassämie (Ghartey-Kwansah Boampong et al. 2016).

Bei der heterozygoten Form der Beta Thalassämie werden kaum klinische Symptome beobachtet, während die homozygote Beta-Thalassämie meist tödlich endet. Träger der homozygoten Form leiden zumeist an schwerwiegender Anämie. Es existieren verschiedene Theorien über die Mechanismen, wie Thalassämie vor Malaria schützt. Durch eine erhöhte Sensibilität der erkrankten Erythrozyten gegenüber oxidativem Stress kann der Parasit im thalassämi-

schen Erythrozyt weniger schnell wachsen (Senok Nelson et al. 1997). Eine weitere These besagt, dass die gesteigerte Eliminierung der infizierten thalassämischen Zellen, im Vergleich zu gesunden Erythrozyten durch ein bestimmtes Antigen hervorgerufen wird. Dieses befindet sich an der Außenseite der vom Parasiten befallenen Erythrozyten (Yuthavong Bunyaratvej et al. 1990). Mit dem Parasit befallene thalassämische Erythrozyten weisen eine verminderte Rosettenbildung auf, was bedeutet, dass weniger infizierte Zellen an nicht infizierten Zellen anhaften, wie dies bei gesunden Erythrozyten im gesteigerten Maße vorkommt (Carlson Nash et al. 1994).

Auch die Stoffwechselerkrankung Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel schützt vor einer schweren Verlaufsform der Malaria. Hier scheint eine verminderte Replikation des Plasmodium falciparum die Vermehrung des Parasiten einzudämmen (Luzzatto Usanga et al. 1969).

2.4.1 Übertragung



Abbildung 4: Ein *Anopheles stephensi* Mosquito bei der Nahrungsaufnahme (Rinaldi 2004)

Die verschiedenen Typen des Plasmodium-Erregers durchlaufen verschiedene Stadien der Entwicklung. Es kommt zur Bildung eines Kreislaufs von der Anopheles- Mücke über den Menschen und wieder zurück zur Mücke.

Es existiert eine asexuelle Phase, welche auch Schizogonie genannt wird. Weiter gibt es eine sexuelle Phase, die Gamogonie. Die asexuelle Phase findet im Menschen statt, während die sexuelle Phase in der Mücke lokalisiert ist.

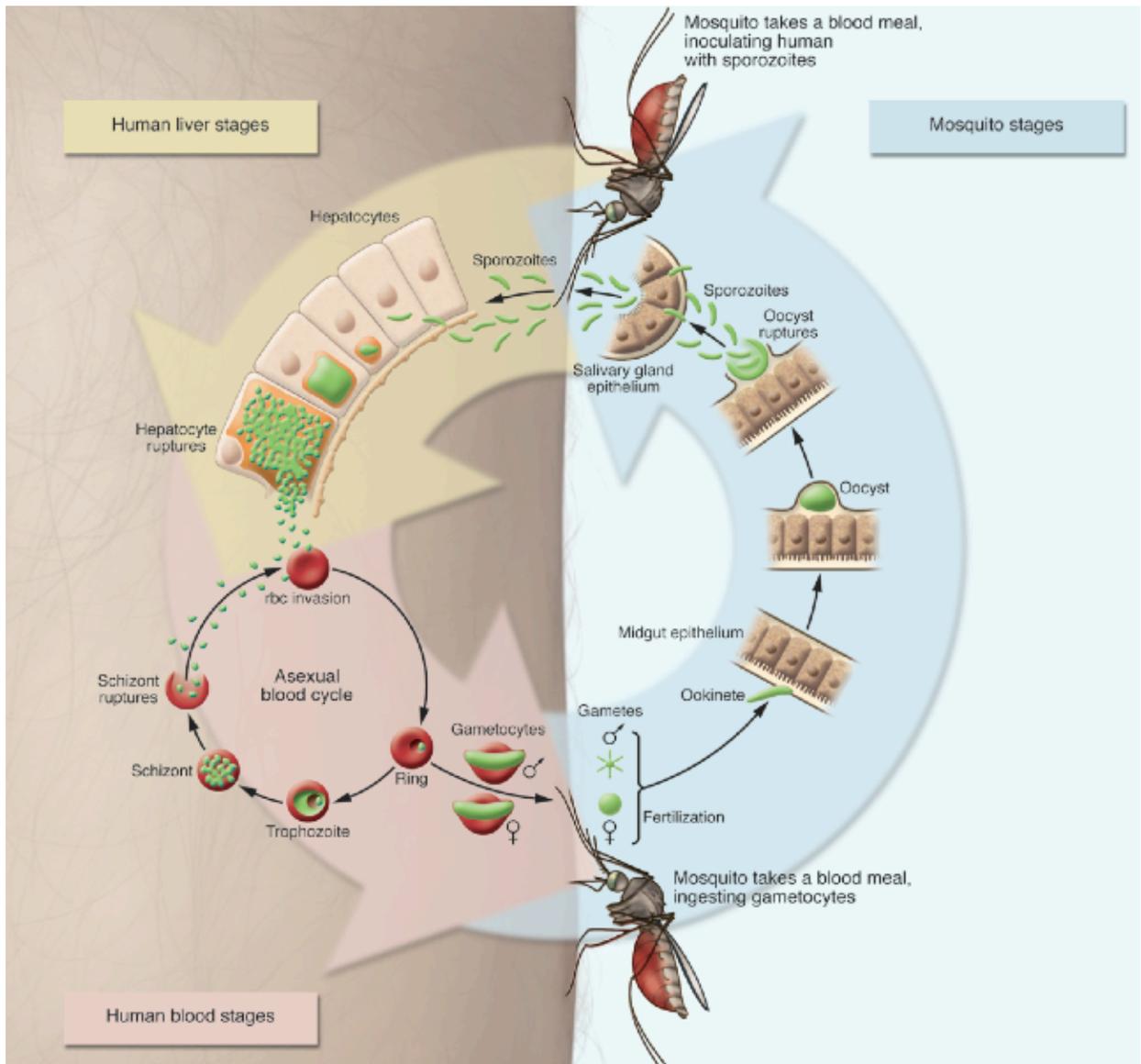


Abbildung 5: Infektionskreislauf der Malaria (Neill 2011)

Durch den Stich des Anopheles-Moskito werden sogenannte Sporozoiten übertragen. Diese wandern durch den Blutkreislauf in die Leber und befallen hier die Hepatozyten. Dort findet dann die Teilung und Vermehrung der Sporozoiten zu Leberschizonten statt (Ejigiri & Sinnis 2009). Dieser Prozess dauert im Menschen 9-16 Tage. Dann zerfallen die Leberschizonten und die frei werdenden Merozoiten werden in Vesikel verpackt und als Merosomen in den Blutkreislauf abgegeben. Einem Teil der Schizonten des Erregers *P. vivax* und *P. ovale* ist es möglich, in der Leber in einer Art Ruhestadium zu verweilen. Diese Schizon-

ten werden dann als Hypnozoiten bezeichnet. Sie sind in der Lage, nach Monaten oder Jahren, zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit zu führen.

Die exo-erythrozytäre Schozogniephase dauert bei *P. vivax* 9-27 Tage, bei *P. malariae* 15-30 Tage, bei *P. falciparum* 8-25 Tage und bei *P. ovale* 9-17 Tage. Im Blut haften sich die Merozoiten an Rezeptormoleküle der Erythrozyten und gelangen so in das Zellinnere. Dieser Prozess wird als erythrozytäre Schozognie bezeichnet. Die Merozoiten reifen in den Erythrozyten zu Trophozyten heran, die sich wiederum zu Schizonten entwickeln. Schizonten ernähren sich hauptsächlich vom Hämoglobin und der Glucose in der Zelle. Hämoglobin wird in die Nahrungsvakuole aufgenommen und hier abgebaut und verwertet. Das zurückbleibende Häm wird zu Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) oxidiert. Weil FPIX auf den Schizont toxisch wirkt, wird es von diesem zu ungiftigem Hämozoin kristallisiert, welches sich im Mikroskop darstellen lässt (Schlitzer 2009).

Aus den Schizonten gehen sehr viele, neue Merozoiten hervor. Somit steigt die Masse im Erythrozyt stark an und es kommt zum „Platzen“ des befallenen Erythrozyten. Durch die Hämolyse, kommt es zu Fieberschüben, die regelmäßig alle 3-4 Tage auftreten. Diese werden somit als „Malaria Tertianä“ und „Malaria Quartana“ bezeichnet. So können die gebildeten und freigegebenen Merozoiten neue Erythrozyten befallen. Wenige der Merozoiten entwickeln sich nach mehreren asexuellen Zyklen zu geschlechtlichen Gametozyten, die im Blutkreislauf darauf warten, von einer erneut stechenden Anopheles Mücke aufgenommen zu werden. So kann in der Mücke dann die Gamogonie ablaufen. Die Gametozyten, die im Darm der Mücke als Makro- und Mikroform vorliegen, differenzieren sich zu Gameten. Durch Kopulation bildet sich eine Zygote. Aus dieser entwickelt sich der Ookinet. Außerhalb des Darmes differenziert sich dieser zur Oozyste, welche wiederum die Sporozoiten bildet, die sich dann in der Speicheldrüse der Mücke einlagern (Tuteja 2007; Lindner Miller et al. 2012).

Die Medikamente, die heutzutage gegen Malaria eingesetzt werden richten sich je nach Wirkstoff gegen die unterschiedliche Stadien der asexuellen Phase, in denen sich der Parasit im Blut des Menschen befindet. Die unten genannten Wirkstoffe werden meist in Kombination mit anderen Präparaten gegeben, je

nach Art der Plasmodien. Ebenso unterscheidet sich die Wahl des Wirkstoffes, ob eine Resistenz vorhanden ist oder nicht.

Die Wirkstoffe lassen sich in folgende Kategorien unterteilen:

Artemisinine, 8- Aminochinoline, Arylaminoalkohole, 4-Aminochinoline, Folsäureantagonisten, Hemmstoffe der Atmungskette, Antibiotika (Schlitzer 2009).

2.5 Mefloquin

2.5.1 Strukturformel von Mefloquin

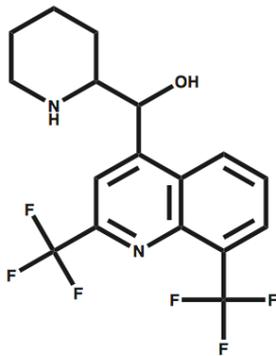


Abbildung 6: Strukturformel von Mefloquin (Sousa Milner et al. 2014)

Mefloquin besitzt die Summenformel: C₁₇ H₁₆ F₆ N₂ O. Die Molare Masse beträgt 378,32 g/mol.

Der chemische Name ist:

(RS-SR)-(2,8-Bis(trifluormethyl)chinolin-4-yl)(piperidin-2-yl)methanol.

2.5.2 Eigenschaften

Mefloquin ist ein fluoriertes Derivat von Chlorin und Piperidin. Es gehört zu der Gruppe der Arylaminoalkohole. Mit einem sekundären Alkohol, einer sekundären

Aminogruppe und einem Arylrest, ist es mit den verwandten Malariawirkstoffen Halofantrin und Lumefantrin ein Analogon von Chinin (Schlitzer 2009).

In Arzneimitteln kommt Mefloquin als Mefloquinhydrochlorid vor. Es ist ein blass-gelbliches bis weißes Pulver. Der Geschmack dieses Pulvers wird als bitter beschrieben. In Wasser ist es nur sehr schwer löslich. Die Löslichkeit ist deutlich besser in Methanol und Ethanol.

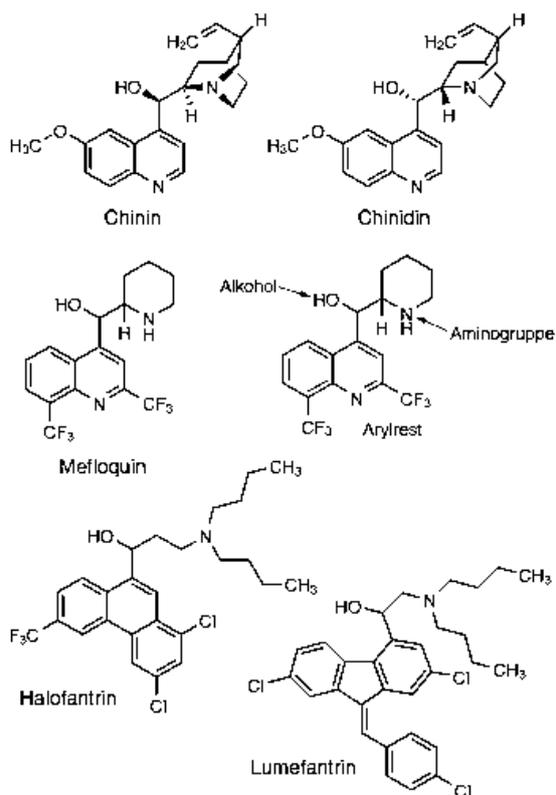


Abbildung 7: Arylaminoalkohole (Schlitzer 2009)

2.5.3 Arylaminoalkohol Chinin

Chinin wurde seit 1820 erfolgreich eingesetzt bei der Behandlung der Malaria. Lange Zeit gab es keinen anderen Wirkstoff neben dem aus der Natur gewonnenen Chinin. Es wurde erstmalig aus der Rinde des roten Chinarindenbaumes mittels Alkohol isoliert (Grkovic Brown et al. 2001). Chinin ist wirksam gegen alle fünf humanpathogenen Erreger. Jedoch gibt es in machen Gebieten Südostasiens einige Chinin resistente Stämme von *P. falciparum*. Schwere Nebenwirkungen von Chinin sind beispielsweise Herzrhythmusstörungen und Hypoglykämie, Schädigung des Innenohres und Schädigung der Augen, beziehungsweise des Sehnervs (Hendriksen Maiga et al. 2013).

2.5.4 Pharmakologische Bedeutung Mefloquin

Mefloquin gehört zur Wirkstoffklasse der Antiprotozoika. Es wird eingesetzt zur Vorbeugung, Behandlung und Notfallbehandlung von Malaria. Es wirkt antiparasitär gegen das Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malaria und Plasmodium ovale. Ebenso wirkt es beim fünften humanpathogenen Erreger, *P. knowlesi* (Schlagenhauf Adamcova et al. 2010). Deshalb wird es bevorzugt eingesetzt bei Resistenzen von Plasmodium falciparum-Stämmen gegen andere Malariamittel (Gonzalez Hellgren et al. 2014). Durch die lange Halbwertszeit von 21 Tagen muss es wöchentlich nur einmal in der Woche eingenommen werden (Schlitzer 2009). Es wurde herausgefunden, dass Mefloquin ebenso gegen verschiedene Arten von Schistosomen wirkt. Diese sind Parasiten der Saugwürmergattung. Mefloquin wirkt gegen die drei Hauptarten von Schistosomen:

Erstens ist es wirksam gegen *Schistosoma haematobium*, dem Erreger der Bilharziose. Dieser befällt die Harnblase und die ableitenden Harnwege.

Zweitens wirkt es gegenüber *Schistosoma japonicum* und drittens gegen *Schistosoma mansoni* (Xiao 2013). Diese befallen den Darm (Kolarova Horak et al. 2001; Lichtenbergova Lassmann et al. 2011).

Es wird Reisenden empfohlen, die sich in Gebiete mit hohem Risiko der Ansteckung mit Malaria begeben, eine Chemoprophylaxe mit einem Malariamittel durchzuführen, insbesondere bei Gebieten, in denen das *P. falciparum* verbreitet ist. Der Wirkstoff Mefloquin war erstmals 1995 mit dem Handelsnamen Lariam für europäischen Reisende verfügbar und kann ebenfalls für die Chemoprophylaxe eingesetzt werden (Croft & Garner 1997). Jedoch stellte sich heraus, dass die Rate an Nebenwirkungen des Medikaments sehr hoch ist. Daher ist es nicht für die Routineprophylaxe geeignet, sondern vor allem sollte es bei Resistenzen von *P. faciparum* gegen Chloroquin eingesetzt werden (Croft & Garner 1997).

2.5.5 Nebenwirkungen von Mefloquin

Zu den vielen Nebenwirkungen, welche die Nutzung des Präparates deutlich einschränken, zählen Reaktionen der Haut (Smith Croft et al. 1999) und neuropsychiatrischen Störungen. Es wurde beschrieben, dass es zu Alpträumen, Depressionen, Wahnvorstellungen und Halluzinationen kam (Weinke Trautmann et al. 1991; Juckett 1999). Weitere Nebenwirkungen sind ein erhöhtes Risiko an Totgeburt und Missgeburt (Nevin 2012). In der Schwangerschaft sollte Mefloquin deshalb nicht im ersten Trimenon eingenommen werden. Ebenso darf es nicht bei Kindern unter 15 kg angewendet werden (Juckett 1999). Es wurde herausgefunden, dass Mefloquin Zellen der Spiralganglien und Haarzellen des Vestibularorgans und der Cochlea durch Apoptose zerstören kann (Ding Qi et al. 2013).

2.5.6 Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole

Der genaue Mechanismus, wie Mefloquin die Plasmodien in den Erythrozyten abtötet, ist größtenteils noch unbekannt. Jedoch scheint der Wirkstoff auf die

identischen Strukturen zu reagieren wie die 4- Aminoquinoline. So soll dies anhand des bisher bekannteren Wirkmechanismus der 4- Aminoquinoline, am Beispiel von Chloroquin dargestellt werden (Abb.8):

Das strukturell, mit dem Malariamittel Mefloquin, verwandte Medikament Chloroquin hemmt die oben beschriebene Kristallisation zu Hämozoin. Die 4- Aminoquinoline gehen mit FPIX ein solides Gefüge ein. Die nun weiter anfallende FPIX können nicht mehr weiter zu Hämozoin komplexiert werden. So entsteht immer mehr toxisches Material, welches den Parasit schließlich abtötet (Schlitzer 2009). Chloroquin liegt, dank des pH von 5, der in der Nahrungsvakuole vorherrscht, hier als Dication vor. Es kann so die Vakuole nicht mehr verlassen und die Konzentration des Medikaments ist hier weitaus höher als im Zytoplasma (Schlitzer 2009). 4- Aminoquinoline wirken ebenso auf einen bestimmten Zielpunkt in der Membran. Es werden vermehrt Calciumionen ausgeschüttet, die eine verfrühte Verdichtung der Transportvesikel bewirken und somit dem Parasiten weitere Nahrung entzogen wird, indem diese nicht mehr zur Nahrungsvakuole gelangen (Fitch 2004).

Chloroquin galt als Standardmedikament für die Chemoprophylaxe der Malaria. Jedoch ist es nicht wirksam gegen die zunehmenden resistenten Stämme der *P. falciparum*. Hiergegen wird Mefloquin eingesetzt (Juckett 1999).

Die Schuld an der Resistenz bei Chloroquin scheint eine Punktmutation am Chloroquin-Resistenz-Transporter (CRT) zu tragen. Dieser scheint in der Membran der Nahrungsvakuole lokalisiert (Sanchez Stein et al. 2007). Hier wird durch einen Austausch des Lysins in der Seitenkette des Chloroquins ein Abtransport des Medikaments aus der Nahrungsvakuole durch den CRT möglich und dieses wird so unwirksam (Valderramos & Fidock 2006).

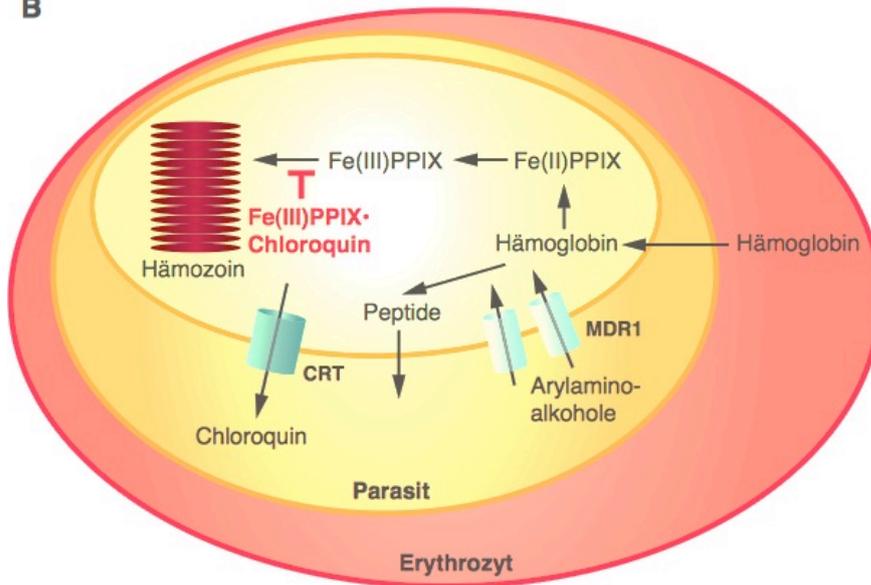
B

Abbildung 8: Wirkungsweise Arylaminoalkohole anhand von Chloroquin (Schlitzer 2009)

Es wird vermutet, dass Mefloquin auf den gleichen Zielpunkt in der Membran einwirkt, wie Chloroquin. Es unterscheidet sich zu Chloroquin jedoch dadurch, dass die Freisetzung von Calcium blockiert wird und somit die Vesikel, die das Hämoglobin zur Nahrungsvakuole transportieren, keine Verbindung mit der Nahrungsvakuole eingehen können (Fitch 2004). So wird die Hämoglobinverwertung der Plasmodien gestört und diese so abgetötet (Schlitzer 2009).

Arylaminoalkohole kommen vom Inneren der Zelle über den multi-drug-resistance-Transporter (MDR-1) in die Nahrungsvakuole (Abb. 8). Eine Resistenz gegenüber den Arylaminoalkoholen beruht auf der hohen Anzahl der MDR-1 Transportern bei einigen Stämmen von *P. falciparum*. Diese werden von Kopien des MDR-Gens im Wildtyp verursacht (Fitch 2004) (Valderramos & Fidock 2006).

3 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, ob und in wie weit das Malariamittel Mefloquin den suizidalen Zelltod, die Eryptose, initiiert und dadurch den suizidalen Zelltod der infizierten Erythrozyten beeinflusst.

Bei der Eryptose kommt es durch den ansteigenden intrazellulären Calcium Gehalt zur Aktivierung der Gardos-Kanäle und somit zum Schrumpfen der Zelle. Ebenso wird durch den erhöhten intrazellulären Anteil an Calcium Phosphatidylserin an der Zelloberfläche präsentiert. Somit kann die Makrophage die Zelle phagozytieren und abbauen. Die Exponierung von Phosphatidylserin wird auch durch das gebildete Ceramid beeinflusst.

Die Erythrozyten wurden durch die Spende von gesunden Probanden gewonnen. Anschließend wurden sie mit und ohne Mefloquin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Es wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt, ob und wie viel Phosphatidylserin an der Oberfläche der Erythrozyten präsentiert wurde. Mit der Durchflusszytometrie wurden auch die Größe der Zellen bestimmt und deren intrazellulärer Calciumgehalt ermittelt. So wurde ebenfalls die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit der Durchflusszytometrie analysiert und die Menge an Ceramid auf den Erythrozyten bestimmt.

4 Materialien

4.1 Erythrozyten

Die verwendeten Erythrozyten wurden durch die Blutbank der Universitätsklinik Tübingen bereitgestellt. Diese wurden von gesunden Spendern, die aus eigenem Willen teilnahmen, gewonnen. Die durchgeführten Versuche und den Gewinn der Erythrozyten genehmigte die Ethikkommission der Universität Tübingen (Projektnummer: 184/2003 V). Das Blut wurde bei 120 g 20 Minuten bei Raumtemperatur (22 °C) zentrifugiert. Anschließend wurden die verschiedenen Blutanteile in unterschiedliche Gefäße gefüllt. Die Erythrozyten wurden mit einem Hämatokrit von 0,4 % mit den jeweils diversen angegebenen Reagenzien bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert.

4.2 Verwendete Substanzen

4.2.1 Ringer-Lösung

Als Nährmedium für die Erythrozyten ist eine einfache Ringer-Lösung ausreichend. Im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen benötigen diese kein Nährmedium mit Wachstumsfaktoren und Proteinen. Es muss lediglich genug Energie in Form von Glucose vorhanden sein, um den Energiebedarf der Zelle zu decken. Desweiteren benötigen sie zur Aufrechterhaltung ihrer Elektrolythomöostase eine entsprechende Konzentration an Ionen. Eine physiologische Osmolarität von 300 mosmol wurde gemessen. Mit Hilfe von HEPES und Natronlauge wurde ein pH von 7,4 titriert.

Substanz	Konzentration [mM]	Menge für 1 l [g]
NaCl	125	7,305
MgSO ₄	1	0,296
CaCl ₂	5	0,373
Glucose	5	0,901
HEPES	32	7,674
NaOH	13	0,541
CaCl ₂	1	0,111
NAOH	13	0,541
Destilliertes H ₂ O		982,798

Tabelle 2: Zusammensetzung der Ringerlösung

4.2.2 Annexin Wash Buffer

Der Annexin Wash Buffer wurde verwendet, um mit Annexin die Menge an Phosphatidylserin-Präsentation an der Zelloberfläche zu messen. Er hat die gleiche Zusammensetzung wie die Ringer-Lösung, jedoch ist hier der Gehalt an Calcium höher.

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

Tabelle 3: Zusammensetzung des Annexin Wash Buffers

4.2.3 Mefloquin

Das Medikament Mefloquin, welches für die Versuche verwendet wurde, entstammt der Firma SigmaAldrich, Hamburg, Deutschland. Mefloquin wurde in DMSO gelöst, welches von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland bezogen wurde. Nach dem Lösen entstand eine Konzentration von 50 mg/ml, die dann zu den angegebenen Konzentrationen weiter verdünnt wurde. Bei Nichtgebrauch wurde DMSO, von Licht geschützt, gelagert.

4.2.4 DCFDA

Der Farbstoff, 2', 7' – Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFDA), mit dem die Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) bestimmt werden konnte, wurde von der Firma Sigma in Schnelldorf, Deutschland bezogen.

Monoklonal-basierte Antikörper

Anti-Ceramid Antikörper (clone MID15B4; Alexis, Grünberg, Deutschland)

Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)

Albumin von Rinderserum (Kabir Islam et al.)

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) – konjugiertes Ziege anti Maus IgG, IgM spezifische Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland)

4.2.5 Fluo-3 AM Ester

Wie in 2.3 beschrieben, ist unter anderem der Anstieg des intrazellulären Calciums im Erythrozyt ein Hinweis auf beginnende Eryptose. Dieses Calcium kann mit Hilfe des Farbstoffes Fluo-3 AM (Acetoxymethyl-) Ester ($C_{51}H_{50}Cl_2N_2O_{23}$) markiert werden und im Durchflusszytometer sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff Fluo-3 AM ist mit Acetoxymethyl verestert und bindet selbst kein Cal-

cium. Er ist in der Lage, die Membran des Erythrozyten zu durchdringen. In der Zelle bildet es einen Chelatkomplex mit den Calciumionen. Dies ist möglich, weil vorher das Fluo-3 durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und Acetoxymethyl abgespalten wurde. So sind jetzt die Bindungsstellen für die Chelatkomplexbildung frei und in diesem Zustand ist es dem Fluo-3 nicht mehr möglich, die Zellmembran zu passieren. Somit wird nur intrazelluläres Calcium sichtbar gemacht.

Das Fluo-3 wurde in Pulverform von der Firma Calbiochem (Bad Soden) bezogen. Es wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Lagerung findet bei -20 °C statt.

Das Exzitationsmaximum liegt bei 506 nm Wellenlänge und die Emission von 526 nm ist im FL1-Kanal im FACSCalibur messbar.

4.2.6 Annexin-V FITC

Annexin-V FITC wurde von der Firma Roche Applied Science in Mannheim bezogen. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) dient als Färbemittel, welches mit dem Stoff Annexin-V verbunden ist. Dieses weist eine besonders hohe Affinität zu Phosphatidylserin auf, welches an der Außenseite der Membran von Erythrozyten exprimiert wird, sobald diese in den apoptotischen Zustand übergehen. So kann Phosphatidylserin dann von Makrophagen erkannt werden und die apoptotischen Erythrozyten können von diesen phagozytiert werden. Somit ist es möglich, mit Annexin-V FITC, die zu Grunde gehenden Erythrozyten sichtbar zu machen.

4.2.7 Phosphate Buffered Saline (PBS)

PBS wurde für die Bestimmung von Ceramid zum Waschen von Zellen benötigt. Es wurde für die Versuche auf einen pH von 7,4 titriert.

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

Tabelle 4: Zusammensetzung der PBS

4.2.8 FACS-Analyse – Durchflusszytometrie

Die Messungen wurden mit Hilfe des FACS Calibur durchgeführt. Dieses Gerät wurde durch das Medizintechnologie-Unternehmen BD in Heidelberg hergestellt.

Es besitzt zwei Laser. Einen Argon-Ionen-Laser, der mit einer Wellenlänge von 488 nm arbeitet. Dieser wird durch Luft gekühlt. Der zweite Laser ist ein roter Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm.

Die Durchflusszytometrie wird auch FACS genannt (fluorescence activated cell sorting). Es werden Zellen, hier Erythrozyten, durch sehr enge Kapillaren gesaugt. Die Erythrozyten liegen in einer Flüssigkeit vor. Durch das Ansaugen durch die Kapillare werden die Zellen aufgereiht und können nacheinander durch einen Laserstrahl vermessen werden, ohne dass sich die Messergebnisse durch übereinander liegende Zellen addieren. Durch den Strahl des Lasers mit einer bestimmten Wellenlänge kann die Größe, Gestalt und auch die Färbung der Zelle bestimmt werden. Durch die Zellen wird der eintreffende Laserstrahl in einem bestimmten Winkel reflektiert und mit verschiedenen Detektoren aufgefangen. Die Größe der Zellen wird mit Hilfe dem Vorwärtsstreulicht, auch „forward scatter“ genannt, gemessen. Hier wird von den Detektoren Streulicht aufgenommen, welches bis zu 10 Grad Abweichung zum eintreffenden Laserstrahl durch Lichtbeugung reflektiert wird. Entsprechend der Zellgröße wird mehr oder weniger gebeugtes Licht eingefangen. So senden große Zellen ein

großes Signal, während sich bei kleinen Zellen nur ein kleines Signal ergibt. Mit Hilfe der Lichtbrechung, die durch den Inhalt der Zellen, bzw. die Granulierung und die Oberflächenbeschaffenheit der Membran unterschiedlich ausfällt, wird das Seitwärtsstreulicht gemessen. Dieses wird entsprechend „side scatter“ genannt. Die Detektoren sind im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl lokalisiert. Diese fangen das durch Lichtbrechung, entstandene Licht ein. Wie schon oben erwähnt, kann so auf die Oberflächenbeschaffenheit der Zelle und auf die Zellgranulierung geschlossen werden. Bei einer Zelle mit hoher Granularität, ist ebenso die Menge an gestreutem Licht höher.

Die Durchflusszytometrie ist ebenfalls in der Lage, Bestandteile von Zellen, die sich mit Fluorchromen färben lassen, sichtbar zu machen. Mit Fluorchrom eingefärbte Antikörper binden an die Oberflächenmoleküle auf der Zellmembran, die sichtbar gemacht werden sollen. Durch den einfallenden Laserstrahl wird die Energie des Lichts in einem festgelegten Wellenbereich von den Fluorchromen absorbiert. Die Elektronen des Fluorchroms werden durch die Energie des Lasers auf ein höheres Energieniveau angehoben. Dabei geben sie diese Energie in Form von Licht mit einer bestimmten Wellenlänge ab. Dieses wird dann von den dafür ausgerichteten Detektoren aufgefangen und gemessen.

5 Methoden

5.1 Die Vorbereitung zur Messung

Zunächst wurden jeweils 1 ml Ringer-Lösung in mehrere Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Dann wurde die Testsubstanz in den gewünschten Konzentrationen hinzugegeben. Diese wurde vorher mit DMSO (Carl Roth, Karlsruhe) zu einer höheren Konzentration gemischt.

Die Ausgangsmenge an Mefloquin war 100 mg. Diese wurde in 2 µl DMSO gelöst, woraus man eine Konzentration von 50 mg/ml erhielt. Sie wurde dann nochmals im Verhältnis 1 : 5 verdünnt, woraus sich eine weitere Konzentration von 10 mg/ml ergab. Von der Testsubstanz wurden die Konzentrationen 1,25 µg, 2,5 µg, 3,75 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg, 50 µg und 100 µg hinzugegeben.

Zur Kontrolle wurde eine Probe ohne Testsubstanz und eine Probe mit DMSO anstelle der Testsubstanz untersucht. Die Konzentration an DMSO entsprach der höchsten Konzentration von Mefloquin. Zu diesem vorbereiteten Ansatz, wurden jeweils 4 µl Blut pipettiert. Es ergab sich ein Hämatokrit von 0,4 %. Es wurden Blutproben von verschiedenen Spendern verwendet. Mit jeder Blutprobe wurde eine Konzentrationsreihe an Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Ringer Kontrolle und DMSO-Kontrolle hergestellt. Die Proben wurden gründlich durchmischt und bei 37 °C 48 Stunden lang inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden aus den Proben jeweils 150 µl entnommen und auf zwei 96 Well Plates in der gleichen Versuchsanordnung überführt. Die Well Plates wurden dann für 3 Minuten bei 1600 rpm und 20 °C zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend verworfen. Die fluoreszierenden Farbstoffe Annexin-V (Lösung 1:200, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) und Fluo-3 (Biotinum, Hayward, USA) wurden jeweils mit Annexin-Waschpuffer in einem Verhältnis von 1 : 200 gemischt. Von beiden Lösungen wurden jeweils 150 µl entnommen und in die vorhandenen Well Plates pipettiert, in FACS Röhrchen überführt und bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Annexin-V Mischung wurde 20 Minuten lang inkubiert. Für Fluo-3 folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Dann wurden die

Proben im Durchflusszytometer analysiert. Für alle Messungen wurden die Proben bis 50 000 Zellen gezählt. Die Auswertung wurde mit der Software der Firma Beckton Dickinson CellQuest durchgeführt.

5.2 Messung der Phosphatidylserin-Exposition an der Membranoberfläche

Da auch Erythrozyten bei Eintreten der Eryptose Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche exponieren, kann man sich dieses zu Nutze machen, indem man dieses Phospholipid sichtbar macht. Dies geschieht durch das Protein Annexin-V-FITC. Annexin-V ist kalziumabhängig und weist eine hohe Affinität gegenüber Phosphatidylserin auf. Sichtbar wurde Annexin mithilfe eines fluoreszierenden Markers. Hier wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. Die Messung der Zellen wurden im FL1-Kanal durchgeführt. Das Absorptionsmaximum von FITC lag bei 496 nm. Die Wellenlänge des Lasers war ebenfalls in diesem Bereich. Die Wellenlänge der Anregung befand sich bei 488 nm. Die Emissionswellenlänge wurde mit 530 nm im FL1-Kanal gemessen.

5.3 Messung des Zellvolumens

Bei der Bestimmung des Zellvolumens im FL-1 Kanal wurde der Forward Scatter gemessen. Hier wird Aufschluss über das Zellvolumen gegeben.

5.4 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Intrazelluläres Kalzium lässt sich mit dem Farbstoff Fluo-3-AM markieren. Dieses kann dann in der Durchflusszytometrie bestimmt werden (Andrews Yang et al. 2002). Der Anstieg von intrazellulärem Kalzium leitet die Eryptose ein. Mit dem Farbstoff Fluo-3-AM kann dieses Kalzium sichtbar gemacht werden. Das

Molekül ist kalziumsensitiv. Fluo-3 bindet alleine kein Kalzium. Es wird mit Acetoxymethyl verestert und ist in der Lage die Zellmembran zu durchdringen. Hier in der Zelle, bildet es mit den Kalziumionen einen Chelatkomplex. Möglich ist dies, da zuvor intrazelluläre Esterasen Fluo-3-AM hydrolysieren und dadurch das Acetoxymethyl abgespalten wird. Die Bindungsstelle für die Chelatkomplexbildung wird frei. Der Chelatkomplex kann so mit Kalziumionen und Fluo-3 gebildet werden. Da das Fluo-3 alleine nicht mehr durch die Zellmembran hindurchdringen kann, ist es möglich, dass so nur der intrazelluläre Anteil an Kalzium gemessen werden kann. Im Durchflusszytometer kann Fluo-3 unterschieden werden von Fluo-3-AM, welches einen Chelatkomplex mit Kalzium eingegangen ist. Dieses verfügt über eine andere Fluoreszenz als freies Fluo-3 und somit hat dieses ein anderes Absorptionsverhalten (Minta Kao et al. 1989). Es wurde das Fluo-3-AM der Firma Biotinum, Hayward, USA für die Versuche verwendet. Fluo-3-AM wurde von Licht geschützt, bei -20 °C, aufbewahrt.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit 150 µl Ringerlösung gewaschen und dann mit Fluo-3-AM Ringer, welche 5 mM Calciumchlorid enthielt und 5 µM Fluo-3-AM versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 30 Minuten inkubiert und anschließend nochmals zwei Mal mit Ringerlösung gewaschen, die 5 mM Calciumchlorid enthielt. Diese Erythrozyten resuspendiert und mit dem FACS Calibur wurde die abhängige Fluoreszenz gemessen. Die Anregungswellenlänge lag bei 488 nm und die Emissionswellenlänge wurde im FL-1 Kanal bei 530 nm gemessen.

5.5 Messung der Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in den Erythrozyten

ROS sind chemisch reaktive Substanzen, die Sauerstoff enthalten. Dieses sind Moleküle wie H_2O_2 , Hydroxylradikale (HO) oder Hydroxylionen (Klionsky Abdelmohsen et al.). Diese Moleküle können bei Stoffwechselfvorgängen in der Zelle entstehen. Sie sind sehr reaktionsfreudig und müssen daher von der Zelle wieder eliminiert werden.

Bei der Eryptose entstehen viele der ROS, welche die Zelle unter oxidativen Stress versetzen. Dieser kann mit Hilfe des Farbstoffes 2', 7'- Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFDA) sichtbar gemacht werden. Nach der Inkubation von 48 Stunden wurden 150 µl der Erythrozytenlösung in Ringerlösung gewaschen und dann mit einer weiteren Ringerlösung versetzt, die DCFDA in einer Konzentration von 10 µM enthielt. Die Erythrozyten wurden dann bei 37 °C, 30 Minuten im Dunkeln gelagert und anschließend 3 Mal mit Ringerlösung gewaschen. Den mit DCFDA versetzten Erythrozyten wurden nun 200 µl Ringerlösung beigefügt. Anschließend wurde die ROS spezifische Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und das Emissionsspektrum lag bei 530 nm im FACS Calibur.

5.6 Messung des intrazellulären Ceramidgehaltes

Um die Menge an Ceramid in den Erythrozyten zu bestimmen, wurde eine Probe von monoklonal basierten Antikörpern verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1µg/ml anti- Ceramid Antikörpern (clone MID 15B4; Alexis, Grünberg, Deutschland), in phosphat- gepufferter Salzlösung (PBS), eingefärbt. Die PBS enthielt zu 0,1 % Albumin vom Rinderserum (BSA) (Kabir Islam et al.). In PBS und BSA wurden die Ceramid Antikörper 1:5 verdünnt. So wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit dieser Lösung angefärbt. Nachdem die Zellen in zwei Schritten mit der Lösung aus Albumin Rinderserum und phosphat- gepufferter Salzlösung gewaschen wurden, wurden die Zellen mit polyklonalen fluorescein-isothiocyanat (FITC) konjugierten Ziegen, anti - Maus IgG und IgM spezifischen Antikörpern der Firma Pharmingen, Hamburg, Deutschland, für eine halbe Stunde gefärbt. Diese wurde vorher im Verhältnis 1:50 in PBS-BSA verdünnt. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und so die nicht gebundenen Antikörper herausgelöst. Darauf folgend wurde 200 µl PBS-BSA hinzugegeben und ausgewertet. Die Proben wurden im Durchflusszytometer analysiert. Hier lag die Anregungswellenlänge bei 488 nm, die Emissionswellenlänge wurde bei 530 nm gemessen.

5.7 Statistik

Die Daten werden als arithmetische Mittel \pm Standardfehler (SEM) angezeigt. Nach den Experimenten wurde eine statistische Auswertung, ANOVA und Tukey-Test als post-Test angewendet. Ebenso wurde bei Bedarf der t-Test angewendet. Die Anzahl der verschiedenen Erythrozytenkonzentrate, wird als n bezeichnet. Da die verschiedenen Proben der Erythrozyten in den verschiedenen Experimenten unterschiedlich reagieren, wurden für jeden Versuch ein Kontrollversuch mit der entsprechenden Probe an Erythrozyten durchgeführt. Mit dem Programm Microsoft Excel erfolgte die statistische Analyse.

6 Ergebnisse

6.1 Beeinflussung der Annexin-V Bindung durch Mefloquin

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, steigt durch Stressoren auf die Zelle die intrazelluläre Calciumkonzentration an. Dadurch wird die Scramblase aktiviert und Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran exponiert. Dieses kann mit Hilfe von Annexin-V sichtbar gemacht werden, welches Calcium-abhängig an Phosphatidylserin bindet. So können in der Durchflusszytometrie von Erythrozyten betroffene Zellen sichtbar gemacht werden kann, indem die durch das Färbemittel FITC vermittelte Lichtemission sichtbar gemacht wird.

Es konnte so (Abb. 9, 10, 11) gezeigt werden, dass die Erythrozyten, die mit Mefloquin 48 Stunden inkubiert wurden, ein deutlich gesteigertes Maß an Phosphatidylserinexposition aufwiesen. Mit steigender Konzentration von 1,25 bis 50 $\mu\text{g/ml}$ an Mefloquin in den verschiedenen Proben nahm auch Annexin-V-Bindung zu und folglich auch die Exposition von Phosphatidylserin. Bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ erreichten die Ergebnisse statistische Signifikanz.

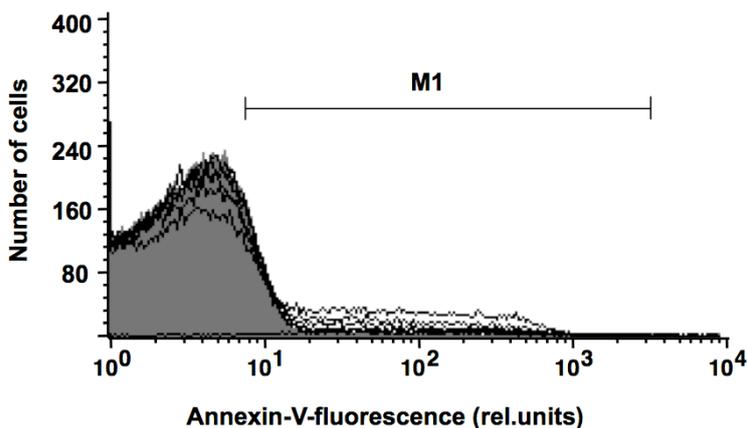


Abbildung 9: Original-Histogramm. Annexin-V Bindung von Erythrozyten nach einer Inkubation von 48 h in Ringerlösung mit Mefloquin in steigender Konzentration von 1,25 bis 50 $\mu\text{g/ml}$ (schwarze Linien) und ohne (graue Fläche) Mefloquin. M1 zeigt die Fluoreszenz von Annexin-V an, welche den Prozentsatz der

Erythrozyten, die Annexin-V binden, widerspiegelt (Bissinger Barking et al. 2015)

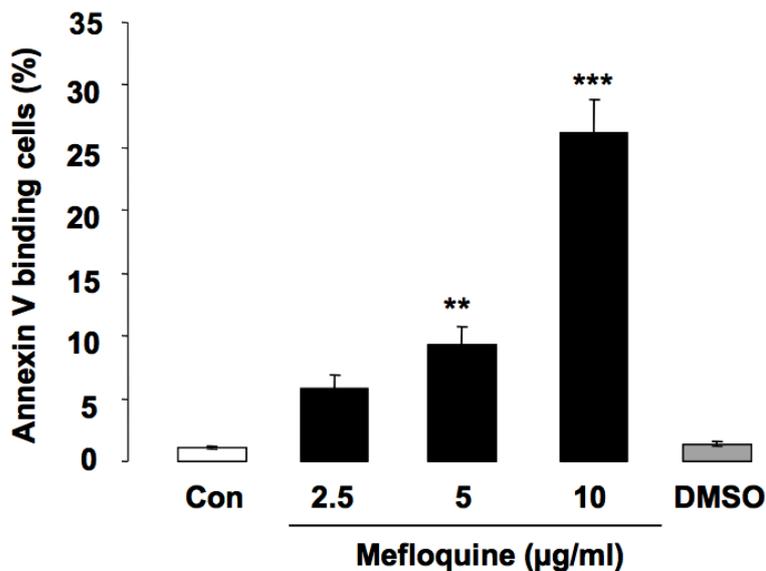


Abbildung 10: Messung der Annexin-V Bindung in Ringer-Lösung/DMSO + 0, 2,5, 5, 10 µg/ml Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)

Die Abbildung 10 zeigt die Annexin-V Bindung der Erythrozyten (n=10) nach Inkubation über 48 Stunden in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Mefloquin in ansteigender Konzentration von 2,5-10 µg/ml (schwarzer Balken). Die Ergebnisse stellen das arithmetischen Mittel +/- SEM der Messergebnisse dar. Die Ergebnisse bei den Konzentration von 5 µg/ml ($p < 0,01$) und 10 µg/ml zeigt einen deutlichen Unterschied zur Kontrollprobe ohne Mefloquin (ANOVA). Bei den Kontrollen ohne Mefloquin betrug der Mittelwert der Annexin-V bindenden Zellen $1,057 \pm 0,099$. Mit Mefloquin, in einer Konzentration von 5 µg/ml, betrug er $9,245 \pm 1,441$ und bei einer Konzentration von 10 µg/ml lag er bei $26,15 \pm 2,691$. Das Ansteigen der Annexin-V-Bindung ist bei diesen Konzentrationen deutlich signifikant.

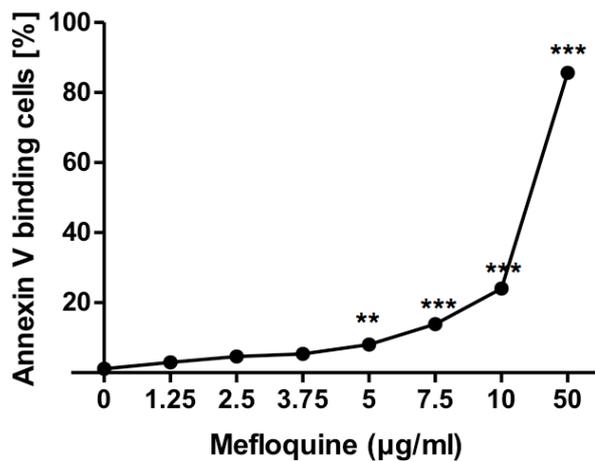


Abbildung 11: Anzahl (%) der Annexin-V bindenden Erythrozyten (n=15) in Prozent in Form einer linearen Funktion in Abhängigkeit der Mefloquinkonzentration (Bissinger Barking et al. 2015)

In Abbildung 11 wird die Annexin-V Bindung der Erythrozyten in Abhängigkeit von der Konzentration an Mefloquin ($\mu\text{g/ml}$) (n=15) angegeben. Dies stellt sich als lineare Funktion dar und erreicht bei einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ Mefloquin statistische Signifikanz (**($P < 0,01$)) mit einem gemittelten Messwert von $8,051 \pm 1,612$ und hebt sich noch deutlicher zur Kontrollprobe bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ Mefloquin (***($P < 0,001$)) mit einem gemittelten Messwert von $24,02 \pm 1,472$ ab welcher deutlich höher ist. Der Wert der Kontrollprobe lag bei $1,112 \pm 0,1946$.

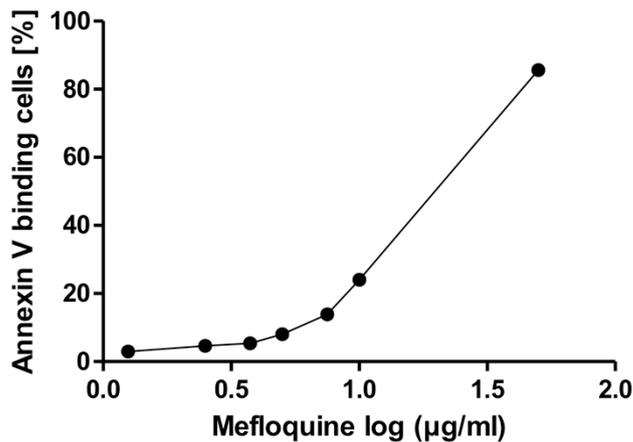


Abbildung 12: Darstellung einer linearen Funktion der Annexin-V bindenden Erythrozyten (n=15) in Prozent, abhängig von der Mefloqinkonzentration (Bissinger Barking et al. 2015)

6.2 Beeinflussung des Zellvolumens durch Mefloquin

Wie in Kapitel 2.3. dargestellt, ist die Schrumpfung der Zelle ein wichtiger Hinweis auf die Eryptose.

Durch den ansteigenden intrazellulären Calciumspiegel werden die Gardos Kanäle aktiviert und es kommt zum Ausstrom von Kalium. Die Zelle gerät in Gefahr des Verlusts ihres Membranpotentials, was sie durch einen Chlorid-Ionen-Ausstrom auszugleichen versucht. Daraus resultiert eine extrazelluläre Hyperosmolarität, gefolgt von einem Wasserausstrom. Die Zelle schrumpft. Mit der Durchflusszytometrie wird die Zellgröße der Erythrozyten nach 48- stündiger Inkubation mit Mefloquin in aufsteigender Konzentration von 1,25 bis 50 µg/ml bestimmt. Diese wird durch das FSC-Signal, welches als Maß für die Größe der Zelle dient, bestimmt. Es konnte ein signifikanter Volumenverlust der Erythrozyten infolge von Mefloquin-Zugabe gezeigt werden (Abb.14 und 15).

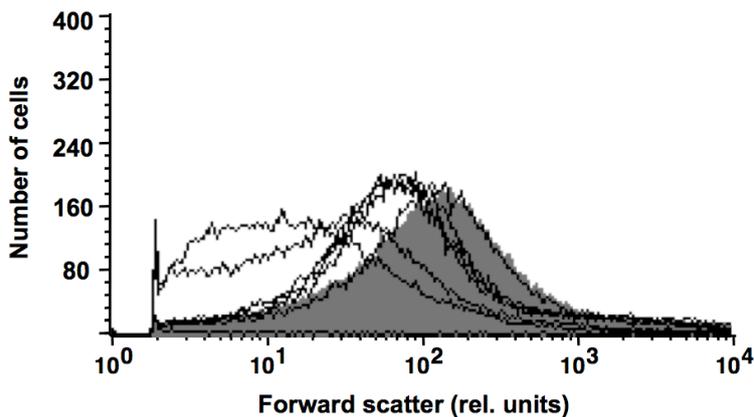


Abbildung 13: Darstellung des Histogramms einer Messung des Forward Scatterers der Erythrozyten, nach einer Inkubation von 48 Stunden in Ringerlösung mit und ohne Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)

Die graue Fläche stellt den Kontrollansatz ohne Mefloquin dar, die schwarzen Linien zeigen den Forward Scatter mit Mefloquin in den Konzentrationen 1,25 - 50 µg/ml an.

Abbildung 14 zeigt den konzentrationsabhängigen Volumenverlust der Erythrozyten ohne (weißer Balken) und mit Mefloquin in ansteigender Konzentration von 2,5-10 µg/ml (schwarzer Balken). Die Ergebnisse stellen das arithmetische Mittel \pm SEM ($n=10$) der Messergebnisse dar. Die Werte zeigen bei den Konzentrationen 5 µg/ml ($* (P<0,05)$) und bei 10 µg/ml ($*** (P<0,001)$) im Gegensatz zum Kontrollansatz starke Signifikanz. Bei 5 µg/ml lag das arithmetische Mittel bei $412,1 \pm 12,22$ bei einer Konzentration von 10 µg/ml bei $327,8 \pm 16,52$ während die Kontrollprobe ohne Mefloquin bei $477,3 \pm 10,22$ lag.

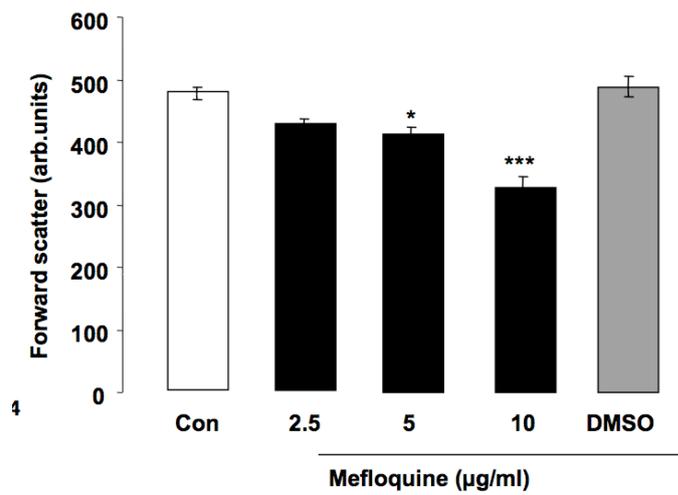


Abbildung 14: Arithmetisches Mittel (n=10) des Forward Scatters (FSC), in Abhängigkeit verschiedener Mefloquinkonzentrationen (Bissinger Barking et al. 2015)

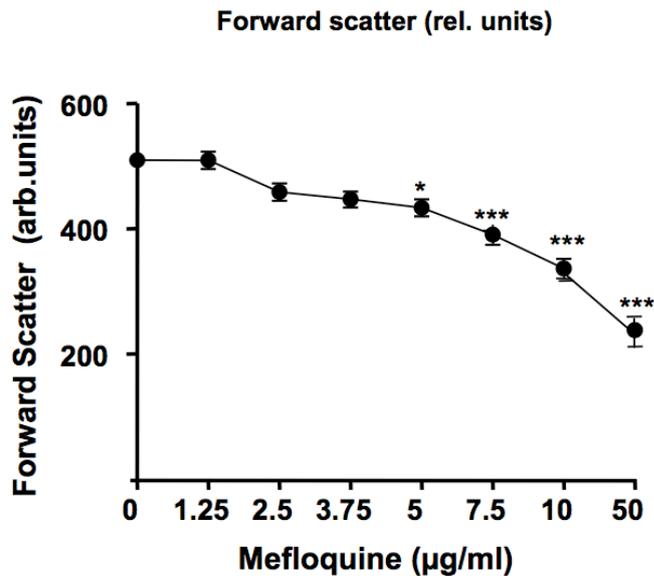


Abbildung 15: Forward Scatter der Erythrozyten, dargestellt als Funktion in Abhängigkeit der Konzentration von Mefloquin (n=15). Die Messwerte ergaben bei 5 µg/ml (* $(P<0,05)$) Mefloquin einen gemittelten Messwert von $433,8 \pm 13,62$ und erreichen so statistische Signifikanz. Bei 50 µg/ml (***($p<0,001$)) Mefloquin ist der Wert mit $238 \pm 23,71$ deutlich niedriger. So wird die Signifikanz zum Kontrollansatz ohne Mefloquin noch deutlicher der bei $509,8 \pm 5,123$ lag (ANOVA) (Bissinger Barking et al. 2015).

6.3 Einfluss von Mefloquin auf die Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies sorgen im Organismus für oxidativen Stress und sind zum Beispiel in der Lage Proteine zu oxidieren oder führen zu Schädigung von DNA und Lipiden durch Lipidperoxidation. Durch diese Vorgänge werden die genannten Strukturen geschädigt.

Mittels 2', 7'- Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFDA) wurde ermittelt, ob Mefloquin einen Einfluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zeigt. Wie in den folgenden Abbildungen zu erkennen ist, konnte dies belegt werden. Mefloquin führt demnach also zu oxidativem Stress.

In Abbildung 16 beschreibt die graue Fläche die Fluoreszenz der Zellen ohne Mefloquin, die schwarzen Linien zeigen die Fluoreszenz mit dem Medikament. Dieses wurde in den Konzentrationen von 1,25-10 µg/ml beigemischt.

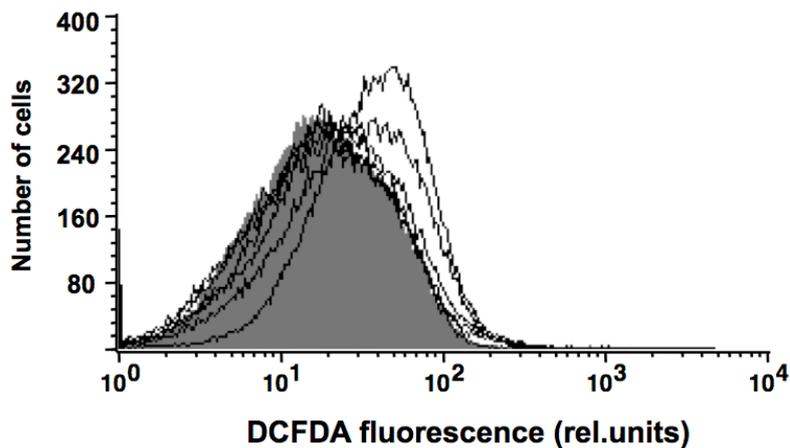


Abbildung 16: Histogramm der Messung der Fluoreszenz von 2', 7'- Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFDA) in Erythrozyten nach einer Inkubation von 48 Stunden mit und ohne Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)

In Abbildung 17 werden die Mittelwerte der Messergebnisse (n=4) und die Standardabweichungen graphisch zusammengefasst. Die weißen Balken geben die Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer Lösung an, die schwarzen Balken zeigen die Fluoreszenz nach Inkubation mit Ringerlösung, versetzt mit DCFDA, an. Bei 10 µg/ml (***(p<0,001) wies die Fluoreszenz mit einem Wert von $15,05 \pm 0,3682$ deutliche Signifikanz auf im Vergleich zum Kontrollwert ohne Mefloquin. Hier lag der ermittelte Mittelwert bei $12,5 \pm 0,1265$.

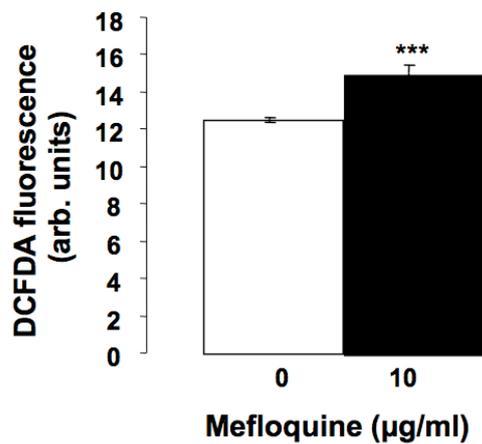


Abbildung 17: Mittelwerte der Fluoreszenzen von DCFDA mit den Konzentrationen von 0 und 10 µg/ml Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)

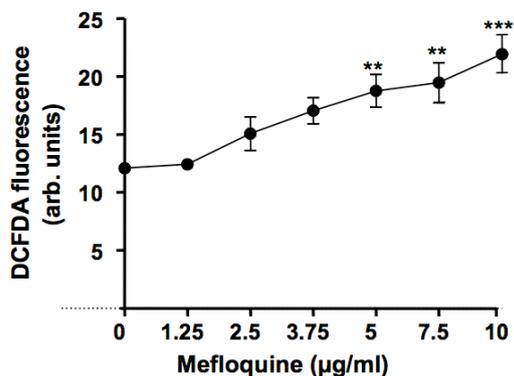


Abbildung 18: DCFDA Fluoreszenz, dargestellt als lineare Funktion, in Abhängigkeit der Mefloquinkonzentration (n=9). Die Zunahme der Fluoreszenz war bei ** (P < 0,01) und bei *** (P < 0,001) signifikant (ANOVA). Bei 5 µg/ml betragen die ermittelten Mittelwerte der Proben $18,77 \pm 1,415$ und bei 10 µg/ml $21,93 \pm 1,685$. Die Kontrollprobe lag bei $12,1 \pm 0,3207$ (Bissinger Barking et al. 2015)

Im t-Test erwies die Fluoreszenz bei 10 µg/ml Mefloquin (***) (P < 0,001) deutliche Signifikanz im Vergleich zu den Ansätzen ohne Mefloquin. Bei 10 µg/ml ergab sich ein Mittelwert von $15,05 \pm 0,3682$, wobei der Kontrollwert bei $12,5 \pm 0,1265$ lag.

6.4 Einfluss auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten

Der intrazelluläre Calciumspiegel spielt bei der Eryptose eine wichtige Rolle. Er aktiviert die Scramblase, die für die Externalisierung von Phosphatidylserin zuständig ist. Außerdem werden calciumsensitive Gardoskanäle aktiv, durch die es, wie in 2.3 beschrieben, aufgrund von Ionenaustausch zu Wasserverlust und damit zur Zellschrumpfung kommt.

Um zu überprüfen, ob Mefloquin den intrazellulären Calciumgehalt beeinflusst, wurde Fluo-3-AM nach 48-stündiger Inkubation zu Erythrozyten in Lösungen mit verschiedenen Mefloquinkonzentrationen gegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Proben im Durchflusszytometer gemessen. Diese korreliert mit der intrazellulären Calciumkonzentration, was in der Abbildung 20 und 21 gezeigt wird.

Es ist in Abbildung 20 zu erkennen, dass ab einer Mefloquin-Konzentration von 10 µg/ml eine intrazellulär erhöhte Calciumkonzentration von statistischer Signifikanz nachzuweisen ist (***($P < 0,001$)). Diese lag bei einem gemittelten Messwert bei $28,1 \pm 1,678$. Die Kontrollprobe ohne Mefloquin erwies sich mit $20,11 \pm 0,8262$ als deutlich niedriger.

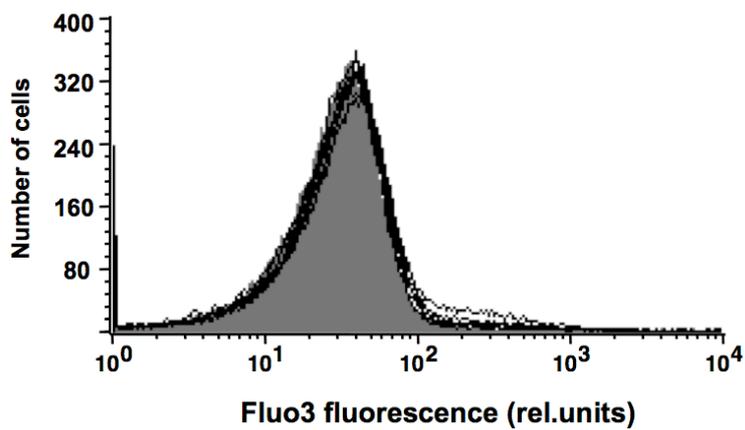


Abbildung 19: Originalhistogramm der Fluoreszenz von Fluo-3-AM in Erythrozyten, die ohne (graue Fläche) und mit Mefloquin (schwarze Linien) mit einer Konzentration von 1,25 - 10 $\mu\text{g/ml}$, inkubiert wurden (Bissinger Barking et al. 2015)

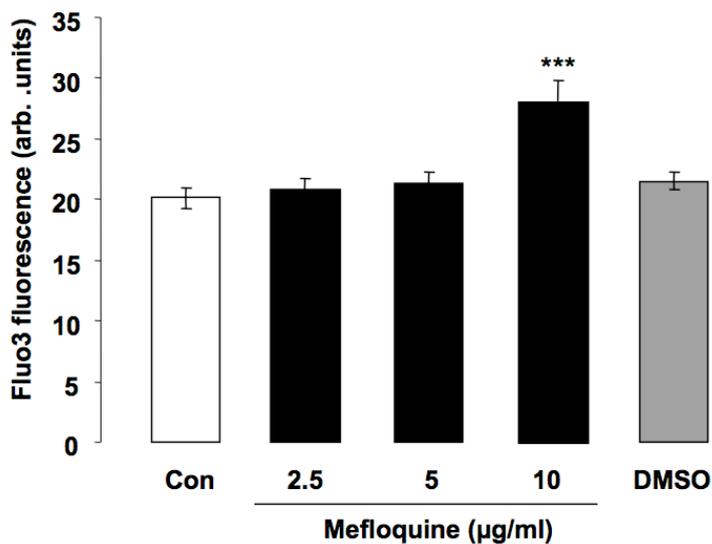


Abbildung 20: Arithmetisches Mittel +/- SEM (n=10) der Fluo3-Fluoreszenz von Erythrozyten nach 48 Stunden Exposition in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) Mefloquin (2,5 bis 10 µg/ml). Der intrazellulären Calciumgehalt erreicht mit ***($P < 0,001$) deutliche Signifikanz bei einer Mefloquinkonzentration von 10 µg/ml (Bissinger Barking et al. 2015)

Zur Veranschaulichung einer weiteren Versuchsreihe wurde die Fluoreszenz von Fluo-3 noch einmal in einer Funktion (Abb. 21) dargestellt, in Abhängigkeit von der jeweiligen Mefloquinkonzentrationen.

Hier wird mit $26,94 \pm 1,408$ bei $*(P < 0,05)$ 7,5 µg/ml und mit einem Mittelwert von $35,75 \pm 2,404$ bei 10 µg/ml $***(P < 0,001)$ statistische Signifikanz erreicht. (ANOVA).

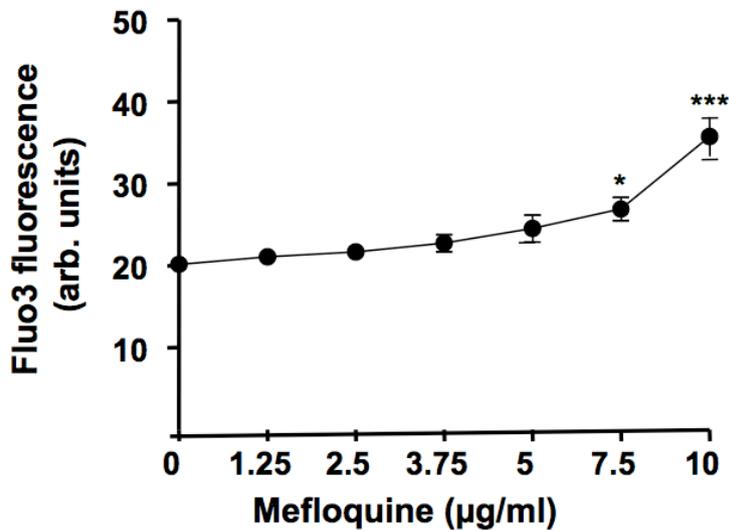


Abbildung 21: Darstellung des intrazellulären Calciumgehaltes in Abhängigkeit der Mefloquinkonzentration (n=15) (Bissinger Barking et al. 2015)

Im weiteren Verlauf der Experimente sollte untersucht werden ob die ermittelte gesteigerte Phosphatidylserinexposition infolge von Mefloquin-Zugabe das Vorhandensein von extrazellulärem Calcium erfordert.

Zu diesem Zweck wurde die Annexin-V-Bindung der Erythrozyten nach Inkubation in calciumfreier Ringerlösung und in calciumhaltigem Milieu getestet.

Es ergab sich, dass Mefloquin unabhängig vom jeweiligen Milieu zu einer signifikanten Steigerung der Phosphatidylserin-Exposition führt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese in calciumhaltigem Milieu deutlich ausgeprägter ist.

Die Elimination von extrazellulärem Calcium führte zu einem signifikanten Einbruch der Annexin-V-Bindung im Vergleich zu den Proben die in Calciumhaltiger Ringerlösung inkubiert wurden. In Calcium-haltiger Ringerlösung ergaben sich Messwerte von $28,43 \pm 2,07$ bei 10 µg/ml, in Calcium-freier Ringerlösung lediglich $21,64 \pm 1,51$ (Abb. 23).

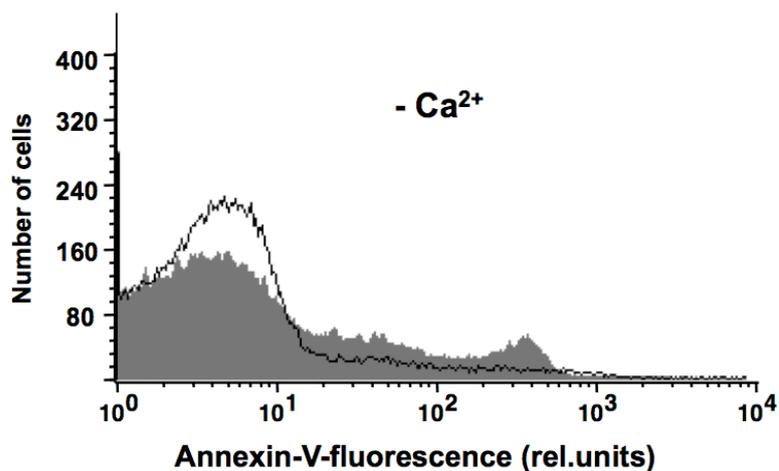


Abbildung 22: Originalhistogramm der Annexin-V-Bindung, nachdem die Zellen 48 Stunden in Calciumfreier Ringerlösung inkubiert wurden (Bissinger Barking et al. 2015)

Die graue Fläche spiegelt diejenigen Zellen wieder, die nicht mit Mefloquin versetzt wurden, die schwarze Linie zeigt die Fluoreszenz der Zellen, die mit 10 µg/ml Mefloquin behandelt wurden.

Die Messergebnisse werden in Abbildung 23 graphisch zusammengefasst. Hier werden die gemittelten Messwerte und die Standardabweichungen angegeben. Verglichen werden Proben ohne Mefloquin (weiße Balken) und mit 10 µg/ml Mefloquin (schwarze Balken). Links im Schaubild sind die Messergebnisse der Proben in Calcium-haltiger Ringerlösung zu erkennen und rechts diejenigen in calciumfreiem Milieu.

Es ist zu erkennen, dass die Elimination von extrazellulärem Calcium zu einem signifikanten Einbruch in der PS-Exposition führt.

Der gemittelte Messwert mit 10 µg/ml Mefloquin in calciumhaltiger Ringerlösung erreicht $***(P<0,001)$ deutliche Signifikanz mit $28,43 \pm 2,07$ verglichen mit dem weitaus niedrigeren Wert der Annexin-V Bindung der Zellen, die in calciumfreier Ringerlösung mit 10 µg/ml Mefloquin inkubiert wurden. Hier wurde mit $##(P<0,01)$ ein statistisch signifikanter Mittelwert von $21,64 \pm 1,51$ gemessen.

Die Kontrollprobe ohne Mefloquin mit calciumfreier Ringerlösung lag bei $0,825 \pm 0,06795$, die Kontrolle mit calciumhaltiger Ringerlösung lag bei $1,016 \pm 0,1766$.

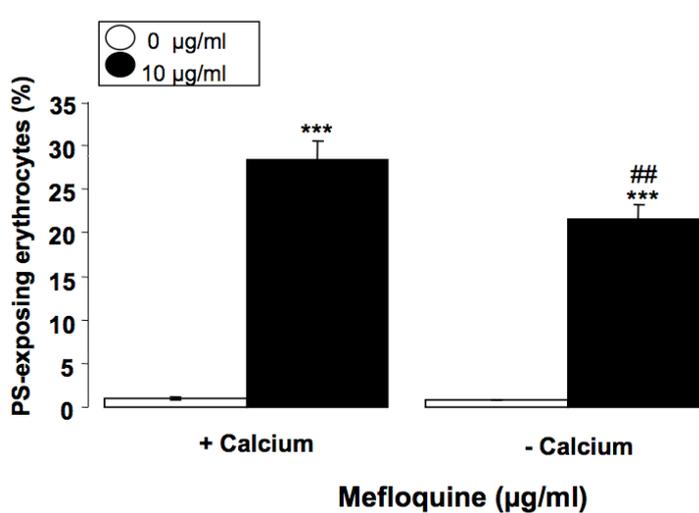


Abbildung 23: Arithmetisches Mittel \pm SEM der Phosphatidylserin-Exposition von Erythrozyten (%) in calciumhaltiger/calciumfreier Ringerlösung, jeweils mit und ohne Mefloquin (n=8).

6.5 Der Einfluss von Mefloquin auf die Menge an Ceramid

Ceramid ist ein Spaltprodukt der Sphingomyelinase, die bei Eryptose aktiviert wird. Es sensitiviert die für die Phosphatidylserin-Externalisierung zuständige Scramblase für einströmendes Calcium und treibt so die Eryptose weiter an. Die im folgenden gezeigten Untersuchungen sollten klären, ob der Ceramidgehalt auf den Zellen erhöht war.

Es ließ sich zeigen (Abb. 25), dass 10 ug/ml Mefloquin zu einer statistisch signifikant erhöhten Ceramidanhäufung auf der Zellmembran führt. Ohne Mefloquin ergaben sich gemittelte Messwerte von $15,58 \pm 0,07106$, wobei bei den Proben mit Mefloquin Werte von $17,93 \pm 0,4373$ erreicht wurden (**(P<0,01)).

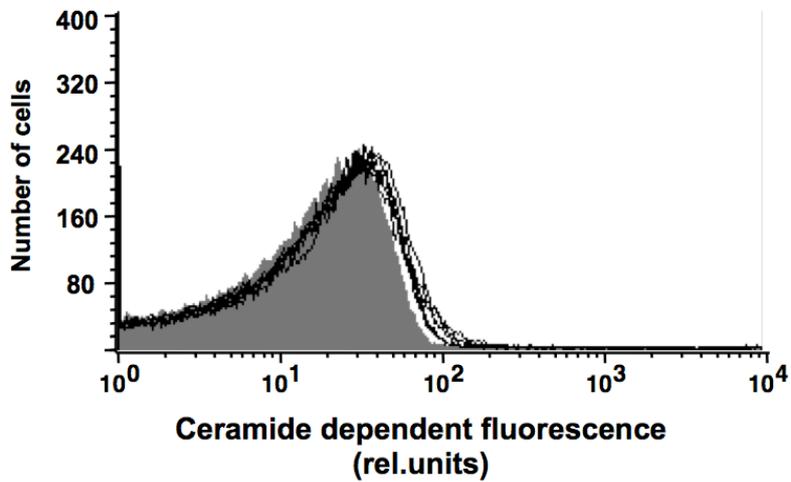


Abbildung 24: Histogramm des Ceramidhäufigkeit, an der Oberfläche der erythrozyten, nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden (Bissinger Barking et al. 2015)

Die graue Fläche zeigt die Fluoreszenz der Zellen an, die in Ringerlösung inkubiert wurden, während die schwarzen Linien die Fluoreszenzen der Zellen anzeigen, die in mefloquinhaltiger Ringerlösung in den Konzentrationen von 1, 2,5-10 µg/ml inkubiert wurden.

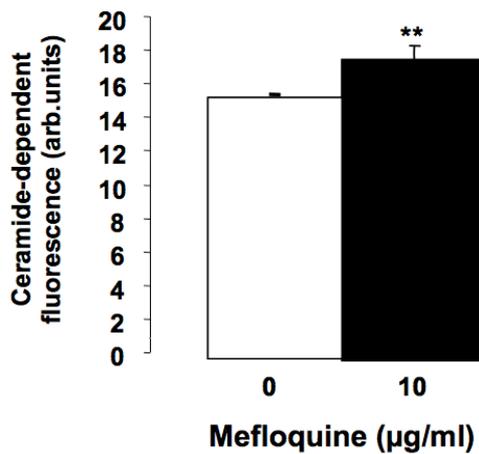


Abbildung 25: Arithmetisches Mittel +/- SEM des Ceramidgehaltes (n=4) an der Oberfläche der Zellen, nach Inkubation ohne (weißer Balken) und mit 10 µg/ml Mefloquin (schwarzer Balken) (Bissinger Barking et al. 2015)

Im folgenden Schaubild (Abb. 26) wird der Gehalt an Ceramid noch einmal als Funktion dargestellt, in Abhängigkeit der Konzentration an Mefloquin (n=10). Bei einer Konzentration von 10 µg/ml *(P<0,05) wird eine statistische Signifikanz mit einem ermittelten Mittelwert von $16,85 \pm 0,5294$ erreicht (ANOVA).

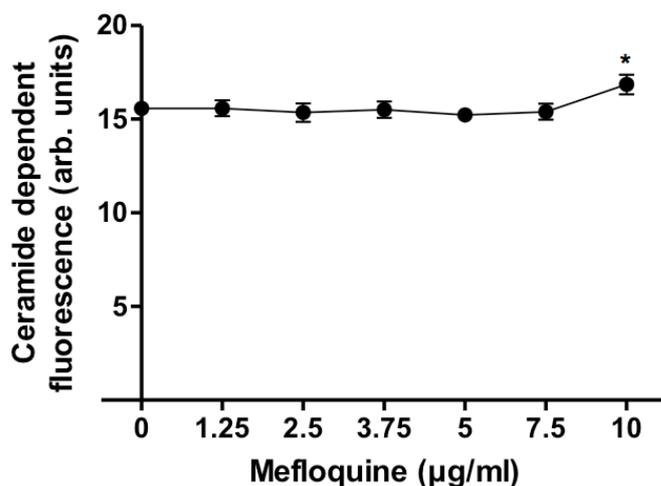


Abbildung 26: Ceramidgehalt der Erythrozyten, abhängig von verschiedenen Konzentrationen an Mefloquin (Bissinger Barking et al. 2015)

7 Diskussion

7.1 Methodendiskussion

Zur Vermeidung von Fehlerquellen, welche die Versuchsergebnisse verfälschen könnten, wurden alle Versuche im Labor auf einer von der Außenluft abgegrenzten sterilen Werkbank durchgeführt. So sollte eine mögliche Verunreinigung der Proben ausgeschlossen werden. Die Proben der Erythrozyten wurden jeden Tag frisch von der Blutbank Tübingen erhalten. Die verwendeten Chemikalien wurden bei Nichtgebrauch nach den jeweiligen Herstellerangaben gelagert. Dies erfolgte bei 4°C im Kühlschrank, bei -20°C im Gefrierschrank oder bei Zimmertemperatur. Sie wurden luftdicht verschlossen und unter Ausschluss von Licht gelagert. Die Ansätze wurden regelmäßig neu hergestellt und die veralteten Proben wurden zur Vermeidung von Verunreinigungen, welche später die Messergebnisse der Versuche verfälschen könnten, aussortiert. Das für die Versuche, verwendete Durchflusszytometer steht in einem abgedunkelten Raum. So wird bei den Versuchen vermieden, dass Streulicht die Messergebnisse verfälschen kann. Damit diese auch durch eventuell auftretende Vibrationen nicht beeinflusst werden, wurde das Gerät auf einem schwingungsarmen Tisch gelagert. Das FACS - Calibur wurde in regelmäßigen Abständen mit den dafür erforderlichen Reinigungsflüssigkeiten in vorgeschriebener Reihenfolge gereinigt und die benötigten Trägerflüssigkeiten wurden stets neu aufgefüllt. Um unbedeutende Populationen von Zellen auszuschließen, die die Messergebnisse, wenn auch nur sehr gering beeinflussen, wurde vor jeder Messung ein Gate festgelegt, welches das Ergebnis auf die relevanten Zellen beschränkt.

7.2 Ergebnisdiskussion

Es wurde untersucht, ob Mefloquin den suizidalen Zelltod der Erythrozyten, die Eryptose, beeinflusst. Die vorliegenden Beobachtungen enthüllen einen bisher unbekanntem Effekt von Mefloquin. Es konnte gezeigt werden, dass Mefloquin an Erythrozyten nicht nur Zellschrumpfung bewirkt, sondern auch Zellmembran Scrambling auslöst. Dieses geht mit einer Translokation von Phosphatidylserin einher, welches vom inneren Blatt der Zellmembran zur Zelloberfläche bewegt wird. Zellmembran-Scrambling und Zellschrumpfung sind die Hauptkennzeichen der Eryptose, wie der suizidale Zelltod von Erythrozyten bezeichnet wird. (Lang Kaiser et al. 2003).

Die Mefloquin-Konzentration, die nötig war, um das Scrambling auszulösen, war etwas höher als die in vivo-Plasmakonzentrationen von Mefloquin, die bislang in anderen Studien ermittelt wurden. Diese lagen bei 2,5 µg/ml (Boudreau Fleckenstein et al. 1990)

Anders verhält es sich bei der Untersuchung des Forward Scatters. Hier waren die Ergebnisse bereits bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml markant.

Die von uns angestellten Experimente stehen im Widerspruch zu Untersuchungen, die bereits vor einigen Jahren veröffentlicht wurden. Hier konnte für Mefloquin keine gesteigerte Phosphatidylserin-Exposition nachgewiesen werden (Totino Daniel-Ribeiro et al. 2009).

So scheint Mefloquin einen begünstigenden Einfluss auf die Eryptose zu haben. Die durch Mefloquin verursachte Zellschrumpfung der Erythrozyten ging einher mit einer gesteigerten intrazellulären Calcium-Aktivität und ist zumindest teilweise auf diese zurück zu führen. Intrazellulär erhöhte Calciumkonzentrationen aktivieren Calcium-sensitive Kalium-Kanäle, auch Gardos-Kanäle genannt. Es kommt zu einem Kalium-Ausstrom und die Zelle gerät in Gefahr einer Hyperpolarisation, welche sie durch einen Chlorid-Ionen-Ausstrom auszugleichen versucht. Die resultierende extrazelluläre Hyperosmolarität bewirkt einen Flüssigkeitsausstrom aus der Zelle und sorgt so für die Zellschrumpfung (Lang Kaiser et al. 2003) (Brugnara de Franceschi et al. 1993).

Der intrazelluläre Calciumanstieg könnte Folge von durch Mefloquin ausgelöstem oxidativem Stress sein, welcher zur Öffnung von Stress-sensitiven Kation-Kanälen geführt und den Calcium-Einstrom bewirkt haben könnte. Diese Vermutung wird untermauert durch vorangegangene Studien, die zeigen konnten, dass Mefloquin an kernhaltigen Zellen oxidativen Stress verursachte (Milatovic Jenkins et al. 2011; Ding Qi et al. 2013; Yadav Dwivedi et al. 2014).

So kann davon ausgegangen werden, dass Mefloquin Einfluss auf die calcium-sensitiven Kationenkanäle in der Zellmembran besitzt.

Mefloquin zeigt ebenso Einfluss auf die Bindung von Annexin-V, welches wiederum auf die Exposition von Phosphatidylserin (PS) weist. Durch den Anstieg von intrazellulärem Calcium wird die Scramblase aktiviert und Phosphatidylserin wird an die Außenseite der Erythrozytenmembran exprimiert (Lang Kaiser et al. 2003). Den Messungen zufolge scheint durch Mefloquin eine vermehrte PS-Exposition und ein verstärktes Scrambling der Erythrozytenmembran aufzutreten. Das Scrambling und die Exposition von PS beweist den suizidalen Tod der Erythrozyten.

Die niedrigste Konzentration an Mefloquin, die zu einer vermehrten Bindung von Annexin-V führt, ist nur leicht höher als die in vivo gemessene Konzentration an Mefloquin (2,5 µg/ml) (Boudreau Fleckenstein et al. 1990). Bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml an Mefloquin konnte ein prozentualer Anstieg an Bindung von Annexin-V und damit die PS-Exposition mit einem Mittelwert von $5,853 \pm 0,9924$ gemessen werden. Jedoch, wie schon in 6.1 beschrieben, wird der Messwert der Annexin-V Bindung erst bei einer Konzentration von 5 µg/ml und 10 µg/ml an Mefloquin signifikant. Mit einem arithmetischen Mittel der Annexin-V Bindung von bis zu $26,15 \pm 2,691$ bei 10 µg/ml wird der Einfluss von Mefloquin auf die Exposition von PS sehr deutlich, wenn man im Vergleich den Kontrollansatz ohne Mefloquin mit $1,057 \pm 0,09991$ betrachtet. So scheint Mefloquin sich auf den intrazellulären Anstieg von Calcium auszuwirken.

Es wurde versuchsweise das Calcium aus dem Extrazellularraum entfernt und so konnte ebenso eine Bindung an Phosphatidylserin durch Annexin gemessen werden. Jedoch sank insgesamt die Anzahl der Annexin-bindenden Zellen. Hieraus lässt sich schließen, dass die Phosphatidylserin Exposition nicht auf den

ansteigenden intrazellulären Calciumspiegel aus dem Extrazellularraum zurückzuführen ist. Es müssen somit andere Mechanismen sein, die die Erythrozyten zur PS Exposition bringen. Dies könnte durch oxidativen Stress verursacht worden sein, der durch Mefloquin auf die Zelle einwirkt und somit Calcium sensitive Kationenkanäle aktiviert werden (Lang Qadri et al. 2012). Mefloquin scheint sich auch auf die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auszuwirken, welche mit Hilfe des Farbstoffes DCFDA sichtbar gemacht werden konnte.

Klinisch betrachtet bedeutet eine Exposition an PS an der Außenseite der Erythrozytenmembran einen Einfluss auf die Gerinnung des Blutes: Die Bildung von Thrombin aus Prothrombin wird durch die PS-Exposition angeregt (Chung Bae et al. 2007) und die Bindung von apoptotischen Erythrozyten an die Wände des Gefäßendothels wird ebenso durch Erythrozyten, die PS exprimieren, ermöglicht (Closse Dachary-Prigent et al. 1999). So kann dadurch die Mikrozirkulation in den Gefäßen und somit auch insgesamt die Gerinnung des Blutes beeinflusst werden (Chung Bae et al. 2007).

Es könnte so angenommen werden, dass Mefloquin in einer sehr hohen Konzentration, beispielsweise bei einer Vergiftung mit dem Medikament, zu einer Verklumpung, bzw. Gerinnung des Blutes führen könnte. Bei Erkrankungen, die mit einem überdurchschnittlichen Maß an Eryptose einhergehen, kann so deutlich gemacht werden, dass hier durchaus eine hohe Neigung zur Thrombose herrscht. Bei Malaria oder der Sichelzellanämie ist dies beispielsweise der Fall (Andrews & Low 1999; Abed Towhid et al. 2012).

Weiter wird durch die Makrophagen, die das exponierte PS an der Erythrozytenmembran erkennen, eine Eliminierung der eryptotischen Zellen aus dem Blutkreislauf möglich, bevor die Hämolyse eintritt und das freie Hämoglobin in den Blutkreislauf entleert wird. Wie schon erwähnt, macht die PS-Exposition es so möglich, dass Makrophagen eryptotische Erythrozyten schnell komplett entfernen können. Dies ist auch hinsichtlich der Malaria interessant. Erythrozyten, die mit dem Plasmodium infiziert sind, können durch schnell einsetzende Eryptose mitsamt dem Parasiten entfernt werden (Foller Bobbala et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass das Plasmodium den Erythrozyten mit oxidativem Stress

versetzt, der ein Initiator der Eryptose ist. Es kommt zur Aktivierung Calcium permeabler Kationenkanäle (Kirk 2001; Lang Qadri et al. 2012) und somit zum Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels. Dies führt zum Scrambling der Erythrozytenmembran und zur PS-Exposition. Damit wird die Vernichtung des betroffenen Erythrozyten durch Makrophagen ermöglicht und der Verlauf der Krankheit kann so zum Positiven beeinflusst werden (Foller Bobbala et al. 2009). So kann eine schnell einsetzende Eryptose einen guten Schutz gegen die Erreger der Malaria bieten und sich so positiv auf den klinischen Verlauf auswirken. Die Plasmodien können den genetisch veränderten Erythrozyten bei heterozytärer Sichelzellanämie beispielsweise nichts anhaben und die Menschen mit dieser Anomalie der Erythrozyten können nicht an Malaria erkranken (Missinou Lell et al. 2003). Auch bei Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Defizienz und der Thalassämie wird das Wachstum der eingedrungenen Plasmodien in den Erythrozyten verwehrt (Bremner 2001). Ist genetisch eine schnellere Eryptose möglich ist, ist der Verlauf von Malaria unkritischer. Hier können die erkrankten Zellen schneller ausgesiebt werden, da der programmierte Zelltod schnell eintritt (Cappadoro Giribaldi et al. 1998; Ayi Giribaldi et al. 2002; Ayi Turrini et al. 2004; Lang Qadri et al. 2012)

So wird man verleitet zu vermuten, dass die eryptotische Wirkung von Mefloquin zur Antimalariawirkung beiträgt. Durch den oxidativen Stress, den Mefloquin auf die Erythrozyten ausübt, wird Eryptose ausgelöst und der Erythrozyt kann samt Erreger schnell eliminiert werden (Foller Bobbala et al. 2009).

Durch die erhöhte Exposition von PS werden die betroffenen Erythrozyten aus dem Blut eliminiert und es kann so auch zu einer Ausbildung einer Anämie kommen (Lang Qadri et al. 2012). Krankheiten, die mit gesteigerter Eryptose einhergehen, sind Sepsis (Kempe Akel et al. 2007), Thalassämie (Cappellini Musallam et al. 2012) und auch beim hämolytisch-urämischem Syndrom (Lang Beringer et al. 2006) kommt es zu einem Anstieg des suizidalen Zelltods der Erythrozyten.

Der Anstieg von intrazellulärem Calcium wird, wie oben beschrieben, auch durch oxidativen Stress hervorgerufen, der calcium-sensitive- und permeable Kationenkanäle aktiviert (Lang Qadri et al. 2012). So steuert Mefloquin zur Er-

höhung des intrazellulären Calciumspiegel bei, der so zu oxidativem Stress der Zelle führt.

Dieser konnte mit Hilfe der Fluoreszenz des Farbstoffes DCFDA nachgewiesen werden, wenn die Erythrozyten vorher mit Mefloquin versetzt wurden. DCFDA weist auf die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hin, die in der Zelle gebildet wird und diese unter oxidativen Stress versetzt. Wegen der starken Reaktionsfreudigkeit der ROS kann die Zelle geschädigt werden und diese muss von der Zelle schnell eliminiert werden. Im Versuch konnte bei Zellen, die mit Mefloquin versetzt wurden, ein deutlich höherer Gehalt an DCFDA nachgewiesen werden als in den Zellen des Kontrollversuchs. So konnte gezeigt werden, dass sich in den Zellen, die zuvor mit Mefloquin versetzt wurden, eine größere Menge an ROS gebildet hatte. Da normalerweise diese von gesunden Erythrozyten stetig abgebaut wird, kann vermutet werden, dass die Erythrozyten im Versuch durch das Mefloquin möglicherweise geschwächt wurden und so nicht mehr in der Lage waren, die entstandene ROS zu eliminieren. Der Anstieg an ROS in den Zellen und deren Potential zur Zellschädigung könnte die Eryptose auch beschleunigt haben.

Es konnte mithilfe der Fluoreszenz von Fluo-3-AM gezeigt werden, dass Mefloquin zum Anstieg des intrazellulären Calciums führt. Dies führt, wie von Lang und Kaiser et al. 2003 beschrieben, wiederum zur Öffnung der calciumsensitiven Gardoskanäle und somit schließlich zur Zellschrumpfung, indem Wasser dem austretenden Kalium und Chlorid osmotisch folgt.

Jedoch wird erst bei einer Mefloquinkonzentration von 10 µg/ml ein signifikanter Anstieg an intraerythrozytärem Calcium sichtbar. Die gemessenen fluoreszierenden Einheiten, die bei den Kontrollproben ohne Mefloquin bei $20,11 \pm 0,8262$ lagen, stiegen mit einer Konzentration von 10 µg/ml Mefloquin auf signifikante $28,1 \pm 1,678$ Einheiten an. Dies deutet auf einen enormen Anstieg des intrazellulären Calciums. Mefloquin könnte sich somit erheblich auf den oxidativen Stress auswirken, der zum Anstieg des intrazellulären Calciums führt, wobei neben den Gardoskanälen auch die Scramblase aktiviert wird und dadurch Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran exprimiert wird (Lang Lang et al. 2005).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass Mefloquin Einfluss auf die Ceramidbildung hat. Nach einer 48-stündigen Inkubation von Erythrozyten in einer 10 µg/ml mefloquinhaltigen Lösung konnte ein erheblicher Anstieg an Ceramid nachgewiesen werden. Durch den erhöhten intrazellulären Gehalt an Ceramid, reagiert das Enzym Scramblase vermehrt auf das intrazelluläre Calcium und wird somit für dieses sensibilisiert. Es folgt eine Aktivierung der Scramblase und somit eine Exprimierung von PS an der Außenseite der Membran (Lang Lang et al. 2004; Lang Qadri et al. 2012). So kann vermutet werden, dass Mefloquin potenzierenden Einfluss auf die Eryptose hat und durch Mefloquin die Bildung von Ceramid angeregt wird, oder schon bestehendes Ceramid umgeschichtet wird, welches dann das Enzym Scramblase für den ansteigenden intrazellulären Calciumspiegel sensitiviert. Die Scramblase wird aktiviert und es kommt zu einer vermehrten Exposition von PS (Lang Myssina et al. 2004). Im Jahre 2003 konnte schon von Pankova-Kholmyanski eine Ceramidbildung in kernhaltigen Zellen gezeigt werden, die durch Mefloquin ausgelöst wurde (Pankova-Kholmyansky Dagan et al. 2003). Dies konnte nun auch hier bei den kernlosen Erythrozyten gezeigt werden. Die Folge ist eine herabgesetzte Überlebenszeit der Erythrozyten, die, wie diese Versuche zeigten, durch die induzierte Eryptose durch Mefloquin zustande kommt.

8 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Faktoren wie oxidativer Stress, osmotischer Schock und Energiemangel zur Apoptose von Zellen führen. Ebenso können diese Faktoren auch Auslöser des Zelltodes von Erythrozyten sein, der sogenannten Eryptose. Diese weist hinsichtlich der Morphologie einige Parallelen zur Apoptose auf. Hauptkennzeichen der Eryptose sind der steigende intrazelluläre Calciumspiegel, die Schrumpfung der Zelle und die Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran. Ebenso kommt es zur Abschnürung von Zellvesikeln.

In verschiedenen Studien konnte zuvor gezeigt werden, dass Mefloquin, ein Malariatherapeutikum, an kernhaltigen Zellen Apoptose auslöst (Milatovic Jenkins et al. 2011; Ding Qi et al. 2013; Yadav Dwivedi et al. 2014). Diese in vitro-Studie untersucht, ob Mefloquin ebenso proapoptotisch auf Erythrozyten wirkt.

Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung des Durchflusszytometers die durch Mefloquin vermittelte Phosphatidylserin-Exposition sowie die Zellgröße gemessen. Außerdem wurden die Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels ermittelt. Anschließend wurde untersucht, inwiefern Mefloquin die Ceramidhäufigkeit an der Zelloberfläche beeinflusst.

Es konnte gezeigt werden, dass Mefloquin sowohl die intrazelluläre Calciumkonzentration als auch die Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche deutlich steigert. Ebenso konnte eine Zellschrumpfung gezeigt werden. Die Ceramidhäufigkeit an der Zelloberfläche nahm erkennbar zu.

Es konnte ebenso belegt werden, dass Mefloquin in Erythrozyten zur Bildung sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies führt, also oxidativen Stress verursacht.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass Mefloquin ein Auslöser der Eryptose ist. Durch das Präsentieren von Phosphatidylserin an der Oberfläche der Zellmembran geschädigter Erythrozyten können diese schnell und ohne Hämolyse aus dem Blutkreislauf eliminiert werden.

9 Literaturverzeichnis

- (1999) Making a difference. The World Health Report 1999. *Health Millions* **25**(4), 3-5.
- Abed M, Towhid ST, Mia S *et al.* (2012) Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**(9), C991-999.
- Ackerman H, Usen S, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Kwiatkowski DP (2005) A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet* **69**(Pt 5), 559-565.
- Andrews DA, Low PS (1999) Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol* **6**(2), 76-82.
- Andrews DA, Yang L, Low PS (2002) Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood* **100**(9), 3392-3399.
- Ayi K, Giribaldi G, Skorokhod A, Schwarzer E, Prendergast PT, Arese P (2002) 16alpha-bromoepiandrosterone, an antimalarial analogue of the hormone dehydroepiandrosterone, enhances phagocytosis of ring stage parasitized erythrocytes: a novel mechanism for antimalarial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(10), 3180-3184.
- Ayi K, Turrini F, Piga A, 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**(10), 3364-3371.
- Berg CP, Engels IH, Rothbart A *et al.* (2001) Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* **8**(12), 1197-1206.
- Birka C, Lang PA, Kempe DS *et al.* (2004) Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch* **448**(5), 471-477.
- Bissinger R, Barking S, Alzoubi K, Liu G, Liu G, Lang F (2015) Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by the Antimalarial Drug Mefloquine. *Cell Physiol Biochem* **36**(4), 1395-1405.
- Boas FE, Forman L, 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**(6), 3077-3081.

- Boudreau EF, Fleckenstein L, Pang LW *et al.* (1990) Mefloquine kinetics in cured and recrudescing patients with acute falciparum malaria and in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **48**(4), 399-409.
- Breman JG (2001) The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* **64**(1-2 Suppl), 1-11.
- Breman JG, Egan A, Keusch GT (2001) The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg* **64**(1-2 Suppl), iv-vii.
- Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL (1993) Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* **92**(1), 520-526.
- Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* **6**(4), 427-446.
- Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E *et al.* (1998) Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* **92**(7), 2527-2534.
- Cappellini MD, Musallam KM, Poggiali E, Taher AT (2012) Hypercoagulability in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood Rev* **26** Suppl 1, S20-23.
- Carlson J, Nash GB, Gabutti V, al-Yaman F, Wahlgren M (1994) Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* **84**(11), 3909-3914.
- Chaurio RA, Janko C, Munoz LE, Frey B, Herrmann M, Gaipal US (2009) Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* **14**(12), 4892-4914.
- Chung SM, Bae ON, Lim KM *et al.* (2007) Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(2), 414-421.
- Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR (1999) Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br J Haematol* **107**(2), 300-302.
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**(9), 647-656.
- Croft A, Garner P (1997) Mefloquine to prevent malaria: a systematic review of trials. *BMJ* **315**(7120), 1412-1416.

- Daugas E, Cande C, Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* **8**(12), 1131-1133.
- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**(3), 239-252.
- Ding D, Qi W, Yu D *et al.* (2013) Addition of exogenous NAD⁺ prevents mefloquine-induced neuroaxonal and hair cell degeneration through reduction of caspase-3-mediated apoptosis in cochlear organotypic cultures. *PLoS One* **8**(11), e79817.
- Eda S, Sherman IW (2002) Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem* **12**(5-6), 373-384.
- Ejigiri I, Sinnis P (2009) Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol* **12**(4), 401-407.
- Fadeel B (2004) Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance. *Antioxid Redox Signal* **6**(2), 269-275.
- Ferreira A, Marguti I, Bechmann I *et al.* (2011) Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell* **145**(3), 398-409.
- Fitch CD (2004) Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* **74**(16), 1957-1972.
- Foller M, Bobbala D, Koka S, Huber SM, Gulbins E, Lang F (2009) Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem* **24**(3-4), 133-140.
- Foller M, Braun M, Qadri SM, Lang E, Mahmud H, Lang F (2010) Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. *Eur J Clin Invest* **40**(6), 534-540.
- Foller M, Huber SM, Lang F (2008) Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* **60**(10), 661-668.
- Gee BE (2013) Biologic complexity in sickle cell disease: implications for developing targeted therapeutics. *ScientificWorldJournal* **2013**, 694146.
- Ghartey-Kwansah G, Boampong JN, Aboagye B, Afoakwah R, Ameyaw EO, Quashie NB (2016) The Prevalence of alpha-Thalassemia and Its Relation to Plasmodium falciparum Infection in Patients Presenting to Clinics in Two Distinct Ecological Zones in Ghana. *Hemoglobin* **40**(1), 32-37.
- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**(1), 37-43.

- Gonzalez R, Hellgren U, Greenwood B, Menendez C (2014) Mefloquine safety and tolerability in pregnancy: a systematic literature review. *Malar J* **13**, 75.
- Grkovic S, Brown MH, Skurray RA (2001) Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* **12**(3), 225-237.
- Guerra CA, Hay SI, Lucioparedes LS *et al.* (2007) Assembling a global database of malaria parasite prevalence for the Malaria Atlas Project. *Malar J* **6**, 17.
- Guerra CA, Snow RW, Hay SI (2006) Defining the global spatial limits of malaria transmission in 2005. *Adv Parasitol* **62**, 157-179.
- Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassme H, Lang F (2000) Physiology of apoptosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **279**(4), F605-F615.
- Harrison HE, Bunting H, Ordway NK, Albrink WS (1947) The Pathogenesis of the Renal Injury Produced in the Dog by Hemoglobin or Methemoglobin. *J Exp Med* **86**(4), 339-356.
- Hendriksen IC, Maiga D, Lemnge MM *et al.* (2013) Population pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of intramuscular quinine in Tanzanian children with severe *Falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **57**(2), 775-783.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805), 770-776.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* **23**(10), 2134-2145.
- Hoffbrand AV (2003) *Grundkurs Hämatologie*: Georg Thieme Verlag.
- Juckett G (1999) Malaria prevention in travelers. *Am Fam Physician* **59**(9), 2523-2530, 2535-2526.
- Kabir SR, Islam MF, Alom MJ, Abu Zubair M, Absar N (2012) Purification, characterizations of a snake guard seeds lectin with antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo in mice. *Protein Pept Lett* **19**(3), 360-368.
- Kataoka S, Tsuruo T (1996) Apoptosis. *The oncologist* **1**(6), 399-401.
- Kempe DS, Akel A, Lang PA *et al.* (2007) Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)* **85**(3), 273-281.

- Kempe DS, Lang PA, Duranton C *et al.* (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J* **20**(2), 368-370.
- Kempe DS, Lang PA, Duranton C *et al.* (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**(2), 368-370.
- Kirk K (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* **81**(2), 495-537.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A *et al.* (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**(1), 1-222.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**(5303), 1132-1136.
- Knust C, Groß D (2010) Blut: Der ganz besondere Saft in Medizin, Literatur, Geschichte und Kultur. Kassel: kassel university press.
- Kolarova L, Horak P, Cada F (2001) Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates. *Parasitol Res* **87**(8), 644-650.
- Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A (2006) BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* **13**(8), 1325-1338.
- Lang E, Qadri SM, Lang F (2012) Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* **44**(8), 1236-1243.
- Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Foller M (2010) Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* **26**(1), 21-28.
- Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T (2006) Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* **187**(1-2), 191-198.
- Lang F, Lang P (2007) *Basiswissen Physiologie*: Springer.
- Lang F, Lang PA, Lang KS *et al.* (2004) Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria. *Pflugers Arch* **448**(3), 319-324.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C *et al.* (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* **15**(5), 195-202.
- Lang KS, Myssina S, Brand V *et al.* (2004) Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* **11**(2), 231-243.

- Lang PA, Beringer O, Nicolay JP *et al.* (2006) Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)* **84**(5), 378-388.
- Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM (2003) Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(6), C1553-1560.
- Leibowitz B, Yu J (2010) Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* **9**(6), 417-422.
- Lichtenbergova L, Lassmann H, Jones MK, Kolarova L, Horak P (2011) *Trichobilharzia regenti*: host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice. *Exp Parasitol* **128**(4), 328-335.
- Lindner SE, Miller JL, Kappe SH (2012) Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* **14**(3), 316-324.
- Luzzatto L (2012) Sick cell anaemia and malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **4**(1), e2012065.
- Luzzatto L, Usanga FA, Reddy S (1969) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* **164**(3881), 839-842.
- Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J (2005) Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* **280**(47), 39460-39467.
- McMahon TJ, Moon RE, Luschniger BP *et al.* (2002) Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* **8**(7), 711-717.
- Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**(2), 181-190.
- Milatovic D, Jenkins JW, Hood JE, Yu Y, Rongzhu L, Aschner M (2011) Mefloquine neurotoxicity is mediated by non-receptor tyrosine kinase. *Neurotoxicology* **32**(5), 578-585.
- Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* **264**(14), 8171-8178.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L *et al.* (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* **276**(19), 16391-16398.
- Missinou MA, Lell B, Kremsner PG (2003) Uncommon asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in Gabonese children. *Clin Infect Dis* **36**(9), 1198-1202.

- Miura Y, Koyanagi Y (2005) Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev Med Virol* **15**(3), 169-178.
- Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC (2007) Plasmodium malariae and Plasmodium ovale--the "bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol* **23**(6), 278-283.
- Myssina S, Huber SM, Birka C *et al.* (2003) Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* **14**(11), 2750-2757.
- Neill US (2011) From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker-DeBakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria. *J Clin Invest* **121**(10), 3768-3773.
- Nevin RL (2012) Mefloquine gap junction blockade and risk of pregnancy loss. *Biol Reprod* **87**(3), 65.
- Nicolay JP, Gatz S, Liebig G, Gulbins E, Lang F (2007) Amyloid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* **19**(1-4), 175-184.
- Nicolay JP, Schneider J, Niemoeller OM *et al.* (2006) Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem* **18**(4-5), 223-232.
- Orrenius S (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* **149**(1-3), 19-23.
- Pankova-Kholmyansky I, Dagan A, Gold D *et al.* (2003) Ceramide mediates growth inhibition of the Plasmodium falciparum parasite. *Cell Mol Life Sci* **60**(3), 577-587.
- Pant HC, Virmani M, Gallant PE (1983) Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **117**(2), 372-377.
- Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* **22**(2), 269-275.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **11**(4), 372-380.
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT (2010) Sickle-cell disease. *Lancet* **376**(9757), 2018-2031.
- Rinaldi A (2004) Fighting malaria at the crossroads. *EMBO Rep* **5**(9), 847-851.
- Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6), 401-410.

- Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M (2007) Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **23**(7), 332-339.
- Schlagenhauf P, Adamcova M, Regep L, Schaerer MT, Bansod S, Rhein HG (2011) Use of mefloquine in children - a review of dosage, pharmacokinetics and tolerability data. *Malar J* **10**, 292.
- Schlagenhauf P, Adamcova M, Regep L, Schaerer MT, Rhein HG (2010) The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis. *Malar J* **9**, 357.
- Schlitzer M (2009) [Active agents and resistance mechanisms. Medicinal Chemistry of drugs against malaria]. *Pharm Unserer Zeit* **38**(6), 512-520.
- Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y (1985) In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* **260**(8), 5131-5138.
- Seigneuret M, Devaux PF (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(12), 3751-3755.
- Senok AC, Nelson EA, Li K, Oppenheimer SJ (1997) Thalassaemia trait, red blood cell age and oxidant stress: effects on *Plasmodium falciparum* growth and sensitivity to artemisinin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**(5), 585-589.
- Sharma SK, Tyagi PK, Padhan K *et al.* (2006) Epidemiology of malaria transmission in forest and plain ecotype villages in Sundargarh District, Orissa, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100**(10), 917-925.
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**(3), 459-470.
- Smith HR, Croft AM, Black MM (1999) Dermatological adverse effects with the antimalarial drug mefloquine: a review of 74 published case reports. *Clin Exp Dermatol* **24**(4), 249-254.
- Sousa JC, Milner E, Carroll D *et al.* (2014) The use of a prodrug approach to minimize potential CNS exposure of next generation quinoline methanols while maintaining efficacy in in vivo animal models. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **39**(4), 231-236.
- Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK (2001) Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **20**(17), 2122-2133.

- Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S *et al.* (2012) Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. *Nat Genet* **44**(9), 1051-1055.
- Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F (2009) Pro-apoptotic effects of antimalarial drugs do not affect mature human erythrocytes. *Acta Trop* **112**(2), 236-238.
- Tuteja R (2007) Malaria - an overview. *FEBS J* **274**(18), 4670-4679.
- Valderramos SG, Fidock DA (2006) Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci* **27**(11), 594-601.
- van den Berg F (2005) *Angewandte Physiologie: Komplementäre Therapien verstehen und integrieren*: Georg Thieme Verlag.
- Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* **258**(5090), 1955-1957.
- Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI *et al.* (2002) Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 35-57.
- Weinke T, Trautmann M, Held T *et al.* (1991) Neuropsychiatric side effects after the use of mefloquine. *Am J Trop Med Hyg* **45**(1), 86-91.
- Willekens FL, Werre JM, Groenen-Döpp YA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, De Pauw B, Bosman GJ (2008) Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol* **141**(4), 549-556.
- Xiao SH (2013) Mefloquine, a new type of compound against schistosomes and other helminthes in experimental studies. *Parasitol Res* **112**(11), 3723-3740.
- Yadav N, Dwivedi A, Mujtaba SF *et al.* (2014) Photosensitized mefloquine induces ROS-mediated DNA damage and apoptosis in keratinocytes under ambient UVB and sunlight exposure. *Cell Biol Toxicol* **30**(5), 253-268.
- Yu JW, Shi Y (2008) FLIP and the death effector domain family. *Oncogene* **27**(48), 6216-6227.
- Yuthavong Y, Bunyaratvej A, Kamchonwongpaisan S (1990) Increased susceptibility of malaria-infected variant erythrocytes to the mononuclear phagocyte system. *Blood Cells* **16**(2-3), 591-597.
- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**(17), 2265-2282.

10 Veröffentlichungen

Folgende Publikation entstand im Rahmen der Dissertation:

Bissinger, R., S. Barking, K. Alzoubi, G. Liu, G. Liu and F. Lang (2015).
"Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by the Antimalarial Drug Mefloquine."
Cell Physiol Biochem **36**(4): 1395-1405.

Erklärung zum Eigenanteil

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

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

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Rosi Bissinger eigenständig oder in Zusammenarbeit mit dieser im Institut durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

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