

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Vegetative und Klinische Physiologie
Leiter: Professor Dr. F. Lang

**Mechanismen des pharmakologisch-induzierten
suizidalen Erythrozyten-Zelltodes am Beispiel von
Nitazoxanid und Mitoxantron**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Arnold, Markus Tobias

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Beer-Hammer

Tag der Disputation: 14.03.2018

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Charakterisierung der Erythrozyten-Alterung <i>in vivo</i>	1
1.1.1 Bildung und Funktionsweise von Erythrozyten.....	1
1.1.2 Die physiologische Lebensspanne von Erythrozyten <i>in vivo</i>	2
1.1.3 Die physiologische Erythrozyten-Alterung (Senescence)	2
1.1.4 Der IgG-abhängige Erythrozyten-Abbau.....	3
1.1.5 Der IgG-unabhängige Erythrozyten-Abbau.....	4
1.1.6 Die Rolle von Phosphatidylserin (PS) bei der Erythrozyten-Alterung.....	5
1.2 Apoptose	5
1.2.1 Bedeutung der Apoptose.....	5
1.2.2 Morphologische Charakteristika der Apoptose.....	8
1.2.3 Mechanismen und Signalwege der Apoptose in kernhaltigen Zellen	9
1.2.3.1 Caspasen	9
1.2.3.2 Extrinsischer Signalweg	10
1.2.3.3 Intrinsischer Signalweg	11
1.2.3.4 Rolle der Bcl-2-Proteine	13
1.2.3.5 ER-Signalweg und Perforin/Granzym-Signalweg.....	14
1.2.4 Die Rolle von Ceramid (CER) in der Apoptose	14
1.2.4.1 Der CER-Metabolismus	14
1.2.4.2 CER-induzierte Apoptose.....	15
1.2.4.3 Medikamentöse Beeinflussung des CER-Metabolismus	16
1.3 Der suizidale Erythrozyten-Zelltod / Eryptose	17
1.3.1 Begriff der Eryptose	17
1.3.2 Trigger und Inhibitoren der Eryptose	18
1.3.3 Pathologien mit gesteigerter Eryptose.....	19
1.3.4 Mechanismen und Signalwege des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes.....	20
1.3.5 Die Rolle von CER bei der Eryptose.....	23

1.3.6 Die Rolle von oxidativem Stress bei der Eryptose.....	24
1.4 Die Substanzen Nitazoxanid (NZA) und Tizoxanid (TIZ).....	26
1.5 Die Substanz Mitoxantron (MX).....	27
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	29
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Erythrozyten.....	30
2.2 Verwendete Substanzen	31
2.2.1 Nitazoxanid (NZA) und Tizoxanid (TIZ).....	31
2.2.2 Mitoxantron (MX)	31
2.2.3 FITC-Annexin-V	32
2.2.4 Fluo-3-AM.....	32
2.2.5 N-Acetylcystein	33
2.2.6 p38-MAPKinase Inhibitoren.....	33
2.2.7 Z-VAD-FMK Pan-Caspase-Inhibitor.....	33
2.2.8 DCFDA	33
2.2.9 CER Detection Kit.....	34
2.3 verwendete Lösungen	34
2.3.1 Ringer-Lösung	34
2.3.2 Annexin-Wasch-Puffer	35
2.3.3 Calciumfreie Lösung	36
2.3.4 PBS-BSA-Lösung	36
2.3.5 Hyperosmolare Lösung und glukosefreie Lösung	37
2.4 Versuche	38
2.4.1 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	38
2.4.2 Messung der PS-Expression.....	38
2.4.3 Messung der Zellgröße	39
2.4.4 Messung des intrazellulären Calciums	39
2.4.5 Messung der PS-Expression in calciumfreier Umgebung.....	40
2.4.6 Messung der PS-Expression und der Zellgröße unter Einfluss zusätzlicher Stressoren.....	40
2.4.7 CER-Bestimmung	40
2.4.8 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	41
2.4.9 Messung der Aktivitäten von p38-MAPKinase und Caspasen.....	42

2.5 FACS-Analyse	42
2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	42
2.5.2 Auswertung der Messungen	44
2.6 Photometrische Hämolyse-Bestimmung	44
2.6.1 Erstellung einer Hämolyse-Eichkurve	44
2.6.2 Messung der Hämolyse	45
2.7 Statistische Aufarbeitung	46
3 ERGEBNISSE	47
3.1 Suizidaler Erythrozyten-Zelltod durch Nitazoxanid (NZA)	47
3.1.1 Effekt von NZA auf die PS-Expression	47
3.1.2 Effekt von NZA auf die Zellgröße	48
3.1.3 Effekt von NZA auf die intrazelluläre Calciumkonzentration	49
3.1.4 Effekt von NZA auf die Bildung von CER	52
3.1.5 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Aktivierung von Caspasen durch NZA	53
3.1.6 Effekt von NZA in Zusammenhang mit zusätzlichen Stressoren	54
3.1.6.1 Einfluss von osmotischem Stress auf den Effekt von NZA und Untersuchung der Aktivierung der p38-MAPKinase	55
3.1.6.2 Einfluss von Energieentzug auf den Effekt von NZA	57
3.1.7 Hämolyse durch NZA	57
3.1.8 Effekt von TIZ auf Erythrozyten	59
3.2 Suizidaler Erythrozyten-Zelltod durch Mitoxantron (MX)	62
3.2.1 Effekt von MX auf die PS-Expression	62
3.2.2 Effekt von MX auf die Zellgröße	63
3.2.3 Effekt von MX auf die intrazelluläre Calciumkonzentration	64
3.2.4 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Aktivierung von Caspasen durch MX	66
3.2.5 Effekt von MX auf die Bildung von CER	68
3.2.6 Effekt von MX auf die Aktivierung der p38-MAPKinase	69
3.2.7 Effekt von MX in Zusammenhang mit zusätzlichen Stressoren	71
3.2.8 Hämolyse durch MX	71
4 DISKUSSION	73
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	73

4.2 Limitationen und methodische Einschränkungen.....	73
4.3 Eryptose durch NZA	76
4.4 Eryptose durch MX	79
4.5 Relevanz der Ergebnisse	81
4.5.1 Klinische Bedeutung der Eryptose.....	81
4.5.2 Erythrozyten als Modellzelle für Apoptose	84
4.6 Ausblick.....	85
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	86
6 LITERATURVERZEICHNIS	88
7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	111
8 VERÖFFENTLICHUNGEN.....	112

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis-inducing factor
AIHA	Autoimmun-hämolytische Anämie
AK	Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
A-SMase	Saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BH3	Bcl-2 homology domain 3
BSA	Bovine serum albumine
CAD	Caspase activated DNase
CAPK	Ceramid-aktivierte Proteinkinase
Caspase	Cystein-Aspartat-spezifische-Protease
Ced-3	Caenorhabditis elegans death gene
CER	Ceramid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DISC	Death-inducing signaling complex
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat
DD	Death domain
DED	Death effector domain
Diablo	Direct IAP binding protein with low pI
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNR	Daunorubicin
DR	Death receptor
DXR	Doxorubicin
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EGTA	Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic-acid
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum

Fas-L	Fas-Ligand
Fas-R	Fas-Rezeptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FC	Crystallisable fragment
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzdetektor
Fluo-3-AM	Fluo-3-Acetoxymethyl-Ester
FSC	Forward scatter
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papilloma Virus
HtrA2	HtrA serine peptidase 2
IgG	Immunglobulin G
IAP	Inhibitor of apoptosis
iCAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KSR	Kinase suppressor of Ras
MLK	Mixed lineage kinase
MS	Multiple Sklerose
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
MX	Mitoxantron
NAC	N-Acetylcystein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
N-SMase	Neutrale Sphingomyelinase
NZA	Nitazoxanid
p38-MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
PCD	Programmed cell death
PKCζ	Atypische Proteinkinase C
PP1	Protein-Phosphatase 1

PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PS	Phosphatidylserin
rcf	Relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SIRP α	Signal regulatory protein α
SM	Sphingomyelin
SMAC	Second mitochondrial activator of caspase
TIZ	Tizoxanid
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
UPR	Unfolded protein response
VCR	Vincristin

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von 1 Liter Ringer-Lösung	35
Tabelle 2: Zusammensetzung von 1 Liter Annexin-Wasch-Puffer.....	35
Tabelle 3: Zusammensetzung von 1 Liter calciumfreier Lösung	36
Tabelle 4: Zusammensetzung der PBS-BSA-Lösung	36
Tabelle 5: Zusammensetzung von 1 Liter hyperosmolarer Lösung.....	37
Tabelle 6: Zusammensetzung von 1 Liter glukosefreier Lösung	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Morphologie der Apoptose und der Nekrose.....	6
Abbildung 2 - Intrinsischer und extrinsischer Signalweg der Apoptose	12
Abbildung 3 - Mechanismus der Zellschrumpfung bei der Eryptose.....	21
Abbildung 4 - Signalwege der PS-Externalisierung im Rahmen der Eryptose.....	25
Abbildung 5 - Struktur von NZA und TIZ.....	31
Abbildung 6 - Struktur von MX.....	32
Abbildung 7 - BD CellQuest™ Dot-Plot.....	43
Abbildung 8 - Beispiel einer Eichkurve	45
Abbildung 9 - Effekt von NZA auf die PS-Expression.....	47
Abbildung 10 - Effekt von NZA auf das Vorwärtsstreulicht.....	49
Abbildung 11 - Effekt von NZA auf die Fluo-3-Fluoreszenz.....	50
Abbildung 12 - Effekt von NZA auf die PS-Expression in calciumfreier Umgebung.....	51
Abbildung 13 - Histogramme des Effekts von NZA auf die PS-Expression in calciumfreier Umgebung.	52
Abbildung 14 - Effekt von NZA auf die Bildung von CER.	53
Abbildung 15 - Effekt von NZA auf die PS-Expression in Anwesenheit von NAC und des Pancaspase-Inhibitors Z-VAD-FMK.....	54
Abbildung 16 - Effekt von NZA auf die PS-Expression und das Vorwärtsstreulicht in hyperosmolarer Lösung	55
Abbildung 17 - Effekt von NZA auf die PS-Expression in Anwesenheit des p38- MAPKinase-Inhibitors SB203580.....	56
Abbildung 18 - Effekt von Energieentzug.....	57
Abbildung 19 - Hämolyse durch NZA.....	58
Abbildung 20 - Effekt von TIZ auf die PS-Expression.	59
Abbildung 21 - Effekt von TIZ auf das Vorwärtsstreulicht.....	60
Abbildung 22 - Effekt von TIZ auf die Fluo-3-Fluoreszenz.	60
Abbildung 23 - Effekt von MX auf die PS-Expression.	62
Abbildung 24 - Effekt von MX auf das Vorwärtsstreulicht.....	63
Abbildung 25 - Effekt von MX auf die Fluo-3-Fluoreszenz	64
Abbildung 26 - Effekt von MX auf die PS-Expression in calciumfreier Umgebung.	65
Abbildung 27 - Effekt von MX auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.	66
Abbildung 28 - Effekt von MX auf die PS-Expression in Anwesenheit von NAC	67

Abbildung 29 - Effekt von MX auf die PS-Expression in Anwesenheit des Pancaspase-Inhibitors Z-VAD-FMK.....	68
Abbildung 30 - Effekt von MX auf die Bildung von CER.....	69
Abbildung 31 - Effekt von MX auf die PS-Expression in Anwesenheit des p38-MAPKinase-Inhibitors SB203580.....	70
Abbildung 32 - Effekt von MX auf die PS-Expression unter zusätzlichem Energieentzug	71
Abbildung 33 - Hämolyse durch MX.	72

1 Einleitung

1.1 Charakterisierung der Erythrozyten-Alterung *in vivo*

1.1.1 Bildung und Funktionsweise von Erythrozyten

Reife menschliche Erythrozyten gehören zu den am besten untersuchten Zellen. Sie bilden einen Anteil von etwa 10 % des gesamten Zellvolumens des menschlichen Organismus. Die Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Im Mittel befinden sich bei Männern 5,1 Mio. und bei Frauen 4,6 Mio. Zellen in einem Mikroliter Blut. Neben Wasser stellt der Eiweißkörper Hämoglobin mit einem Anteil von 34 % die Hauptmasse der Erythrozyten dar (entspricht ca. 90 % des Trockengewichtes). Morphologisch handelt es sich um kernlose, bikonkave Scheiben mit einem mittleren Durchmesser von 7,5 µm und einer mittleren Größe von 85 – 90 fl. Die charakteristische Form begünstigt sowohl den Gasaustausch als auch ihre leichte Verformbarkeit bei der Passage von kleinkalibrigen Kapillaren. Etwa 0,8 % der Erythrozyten werden innerhalb 24 Stunden erneuert. Die Bildung neuer Erythrozyten findet unter dem Einfluss des hormonell-wirksamen Glykoproteins Erythropoetin (EPO) in den hämatopoetischen Geweben aus pluripotenten Stammzellen statt (Chateauvieux et al., 2011). Sekundär steigern weitere Hormone wie Androgene, Thyroxin und Somatotropin die Sensibilität gegenüber dem Einfluss von EPO (Jelkmann, 2011). Während die kernhaltigen Progenitorzellen der Erythrozyten noch über die üblichen, für die oxidative Glykolyse und Proteinsynthese notwendigen Enzyme verfügen, sind reife, kernlose Erythrozyten zur Energiegewinnung auf die anaerobe Glykolyse angewiesen. Durch die anaerobe Glykolyse und über den Pentosephosphat-Zyklus entstehen Redoxäquivalente wie Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH). NADH dient in diesem Kontext vorwiegend der Reduktion von fortlaufend neu entstehendem Methämoglobin (Hultquist et al., 1971). NADPH wird hingegen zur Reduktion des Glutathions gebraucht. Glutathion wird als Antioxidans zum Schutz anderer

Enzyme vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) benötigt (Worthington et al., 1976). Die besondere Verformbarkeit und Membranresistenz der Erythrozyten beruht auf dem charakteristischen Membran- und Zytoskelett. Die Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die Glykophorin und verschiedene Membranproteine wie der Glukosetransporter GLUT1, Aquaporin oder der Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher (Bande-3-Protein) eingebettet sind. Auf der Innenseite befindet sich ein Maschenwerk von Spektrinmolekülen, Ankyrin und weiteren Verbindungsproteinen wie Bande 4.1-Protein und Aktin (Mohandas et al., 2008).

1.1.2 Die physiologische Lebensspanne von Erythrozyten *in vivo*

Menschliche Erythrozyten haben eine durchschnittliche Lebensspanne von 115 - 120 Tagen (Bosman et al., 2005). Der Abbau findet im retikuloendothelialen System vor allem in der Milz und den Kupffer-Zellen der Leber statt (Kay, 1975; Safeukui et al., 2012). Beim Menschen findet der Abbau der Zellen im Gegensatz zu anderen Spezies (z.B.: Mäuse) nicht zufällig statt. Daraus folgt, dass alle humanen Erythrozyten in etwa die gleiche Lebensspanne haben. Je nach Messmethode und Individuum schwankt die Lebenszeit der Erythrozyten lediglich um etwa 10 – 20 %. Untersuchungen legen nahe, dass der größere Anteil dieser Abweichung auf individuelle Unterschiede zurückzuführen ist (Franco, 2009). Diese Erkenntnisse legen die Existenz eines auf zellulärer Ebene gesteuerten Alterungsprozesses nahe (Erythrozyten-Senescence).

1.1.3 Die physiologische Erythrozyten-Alterung (Senescence)

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Kreislaufsystems bedarf es eines Mechanismus zur Aussortierung gealterter und beschädigter Zellen. Dieser Vorgang wird in Bezug auf die Erythrozyten-Alterung auch Senescence genannt. Ein gesteuerter Abbau ist insbesondere zur Vermeidung von Hämolyse und der damit verbundenen Freisetzung von Hämoglobin in das Plasma erforderlich, da freies Hämoglobin besonders in der Niere zu Schäden bis hin zum akuten Nierenversagen führen kann (Clark et al., 1981). Zudem führt es über den Verbrauch von Stickstoffmonoxid zur Vasokonstriktion und

Plättchenaggregation (Rother et al., 2005). Der Anteil an durch intravasale Hämolyse zerstörten Erythrozyten ist unter physiologischen Bedingungen vernachlässigbar klein, kann jedoch im Rahmen hereditärer oder erworbener Störungen klinisch relevant werden. Zu den gängigen Störungen, die mit einer gesteigerten Hämolyse einhergehen gehören unter anderem Infektionen, hämolytische Mikroangiopathien und die autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) sowie angeborene Störungen der Erythrozyten wie z.B.: der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, die Sichelzellanämie und die hereditäre Sphärozytose (Dhaliwal et al., 2004).

Der gesteuerte Abbau gealterter Erythrozyten erfolgt extravasal über immunologisch vermittelte Phagozytose durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (Kay, 1975). Das anfallende Hämoglobin wird somit direkt verstoffwechselt. Die beim Abbau entstehenden freien Aminosäuren stehen so wieder dem allgemeinen Aminosäurepool zur Verfügung. Der Häm-Komplex wird in den Makrophagen zu indirektem Bilirubin abgebaut und über das Plasma zur Leber transportiert, wo es konjugiert und aktiv in die Galle sezerniert wird. Das freigesetzte Eisen wird über das Transportprotein Transferrin wieder dem Eisenkreislauf zugeführt.

1.1.4 Der IgG-abhängige Erythrozyten-Abbau

Die genauen Mechanismen des IgG-abhängigen Erythrozyten-Abbaus sind nicht vollständig geklärt. Die entscheidende Rolle spielt dabei die immunologische Opsonierung gealterter Zellen. Hierzu werden die Erythrozyten durch autologe Antikörper der Klasse IgG markiert (Kay, 1975; Pantaleo et al., 2008). Eine verstärkte Bindung dieser Antikörper findet besonders in den letzten Lebenstagen gealterter Erythrozyten statt (Christian et al., 1993). Das Antigen hierfür stellt das in Erythrozyten prädominante Membranprotein Bande-3-Protein dar (Kay, 1984, 1990; Kay et al., 1983). Die Tatsache, dass die Fähigkeit zur Neusynthese von Proteinen und Enzymen in Erythrozyten nicht gegeben ist, legt die Vermutung nahe, dass Veränderungen des bereits vorher existierenden Bande-3-Proteins für diesen Vorgang verantwortlich sind. Eine

dieser Veränderungen ist die Clusterbildung von Bande-3-Proteinen (Turrini et al., 1991). Diese erfolgt durch verschiedene Mechanismen in alternden Erythrozyten. Gängige Hypothesen beschreiben die verstärkte Proteinoxidation und Denaturierung von Hämoglobin als mögliche Auslöser der Clusterbildung (Low et al., 1985; Lutz et al., 1987; Rettig et al., 1999). Im Falle der Hämoglobin-Denaturierung bilden sich „cross-links“ zwischen den Bande-3-Proteinen, welche nun das aktive Antigen für die IgG-Antikörper darstellen. Zusätzlich sind die Antikörper befähigt, den Komplementfaktor C3 zu binden und so weitere Komplementreaktionen auszulösen (Lutz et al., 1993a) bzw. das Phagozytose-Signal zu verstärken (Fries et al., 1987; Lutz et al., 1993b).

1.1.5 Der IgG-unabhängige Erythrozyten-Abbau

Neben dem immunologisch vermittelten Abbauprozess sind weitere Abbauprozesse in alternden Erythrozyten beschrieben. Einige Autoren haben eine Veränderung von Dichte, Größe und Verformbarkeit sowie eine damit verbundene erschwerte Passage der engen Kapillaren der Milz als weiteren Mechanismus zur Erythrozytenelimination eingeführt (Bratosin et al., 1998; Clark, 1988; Nash et al., 1981). Auch die Veränderungen des CD47-Oberflächenantigens in alternden Erythrozyten, welches physiologischerweise über Interaktionen mit dem SIRP α - Immun-Rezeptor von Makrophagen als ein „do-not-eat-me“ Signal fungiert (Burger et al., 2012) und der Verlust von Sialinsäure auf der Oberflächenmembran während der Alterung (Durocher et al., 1975), wurden als mögliche Mechanismen einer gesteigerten Phagozytose postuliert. Inwieweit diese Prozesse *in vivo* tatsächlich zur Erythrozyten-Phagozytose führen, ist noch nicht vollständig verstanden (Bratosin et al., 1998). Des Weiteren zeigen Untersuchungen, dass alternde Erythrozyten hämoglobinhaltige Vesikel abschnüren und somit ca. 20 % des Hämoglobins verlieren (Willekens et al., 2003). Diese Vesikel werden ebenfalls in der Milz und Leber abgebaut (Willekens et al., 2005).

1.1.6 Die Rolle von Phosphatidylserin (PS) bei der Erythrozyten-Alterung

Alle bisher genannten Mechanismen stellen Erythrozyten-spezifische Wege der Zellalterung und des Zellabbaus dar. Ein weiteres starkes Phagozytose-Signal ist die Präsentation von Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Zellmembran. Die Expression von PS stellt ein bedeutendes und allgemein anerkanntes Merkmal der Apoptose kernhaltiger Zellen dar. Da reife Erythrozyten weder Mitochondrien noch einen Zellkern besitzen wurde dieser Apoptose-Mechanismus in diesen Zellen lange Zeit ausgeschlossen. Dabei zeigten verschiedene Autoren bereits, dass Erythrozyten auch zur verstärkten Expression von PS befähigt sind und zogen dies auch als Mechanismus während der physiologischen Erythrozyten-Alterung in Betracht (Boas et al., 1998; Connor et al., 1994; McEvoy et al., 1986).

Es war lange unklar, inwieweit die Externalisierung von PS auch als eine Reaktion der Zellen auf äußere Einflüsse und Stressoren verstanden werden kann. Bereits 2001 wurden diese Vorgänge als eine Form der Apoptose in Erythrozyten beschrieben (Bratosin et al., 2001). Eine große Anzahl von Untersuchungen der letzten Jahre legen nahe, dass Erythrozyten ebenfalls zu einem suizidalen Zelltod ähnlich der Apoptose kernhaltiger Zellen befähigt sind und dabei einige apoptose-typische Charakteristika aufweisen (Lang et al., 2015c; Lang et al., 2010; Lang et al., 2006a; Lang et al., 2012c). Dieser Prozess wird im Folgenden in Abgrenzung zur physiologischen Alterung (Senescence) und Apoptose kernhaltiger Zellen als Eryptose bezeichnet und in Abschnitt 1.3 detailliert dargestellt.

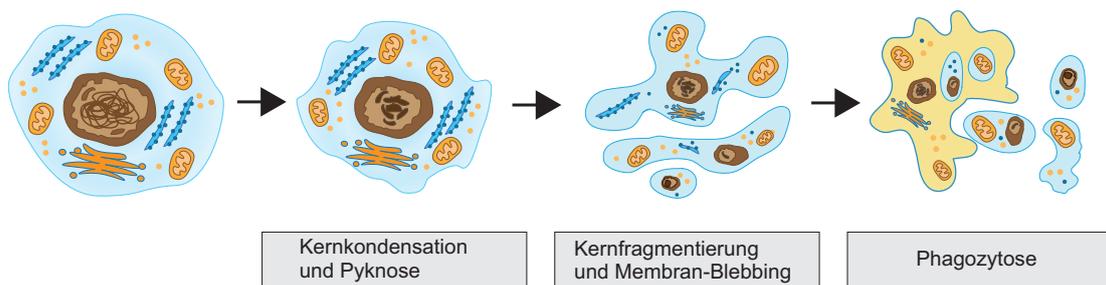
1.2 Apoptose

1.2.1 Bedeutung der Apoptose

Unter dem Begriff der Apoptose versteht man eine Form des programmierten Zelltods kernhaltiger Zellen. Es ist anzunehmen, dass nahezu alle kernhaltigen Zellen höherer Organismen zur Apoptose befähigt sind (Raff et al., 1994). Der Begriff wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt. Sie

beschrieben einen Vorgang in sterbenden Zellen, welcher durch charakteristische morphologische Veränderungen gekennzeichnet ist (Kerr et al., 1972). Dabei handelt es sich um einen streng regulierten, physiologischen Prozess, welcher im Gegensatz zum Vorgang der (weitläufig als pathologisch betrachteten) Nekrose, zu einem gezielten Abbau der Zellen ohne Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und dem damit verbundenen Auslösen einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe gekennzeichnet ist (Wyllie et al., 1980). Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose und der Nekrose.

A Apoptose



B Nekrose

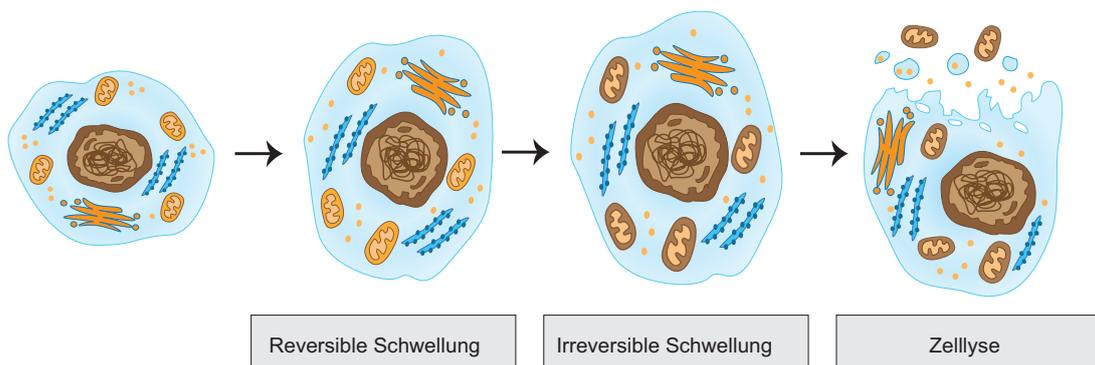


Abbildung 1 - Morphologie der Apoptose und der Nekrose – [A] Typische Veränderungen während der Apoptose. Die Endstrecke der Apoptose stellt die Phagozytose durch Immunzellen ohne begleitende Entzündungsreaktion dar. [B] Bei der Nekrose kommt es zu einer Zellschwellung und Zellyse mit nachfolgender Entzündungsreaktion.

Neben der Apoptose sind weitere Formen des programmierten Zelltodes beschrieben worden sind, welche sich von dem Begriff der Apoptose abgrenzen lassen. Beispiele hierfür sind die Begriffe der Autophagie, Aponekrose und Paraptose (Debnath et al., 2005; Formigli et al., 2000; Sperandio et al., 2000).

Sie alle lassen sich unter dem Begriff des „programmed cell death“, kurz PCD, zusammenfassen. Die genaue Definition und Abgrenzung dieser Zelltodformen ist in der Literatur uneinheitlich vollzogen. Zudem kann man davon ausgehen, dass in Zukunft noch weitere Formen des PCD beschrieben werden.

Apoptose ist in eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Vorgänge involviert. Sie kann als ein Mechanismus zur sicheren Entfernung überflüssiger oder geschädigter Zellen angesehen werden. Um die Homöostase im menschlichen Organismus aufrecht zu erhalten, sterben über diesen Mechanismus, im Erwachsenen, pro Tag etwa 10 Milliarden Zellen ab. Die gleiche Anzahl an Zellen wird parallel dazu durch Mitose neu gebildet (Renehan et al., 2001). Zudem spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei der physiologischen Entwicklung des Immunsystems (Opferman et al., 2003), bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Raff et al., 1993; Yuan et al., 2000), bei der Altersinvolution von Organen (Bar-Dayyan et al., 1999; Tilly et al., 1991), bei der physiologischen Wundheilung (Greenhalgh, 1998) und bei der Embryonalentwicklung (Jacobson et al., 1997). Durch die Vielzahl an physiologischen Vorgängen in welche die Apoptose involviert ist, wird deutlich, dass eine strenge Regulierung auf molekularer Ebene erforderlich ist. Eine Überstimulation bzw. Inhibierung der Apoptose oder eine Entkopplung der Zellen von den zugrundeliegenden Regulationsmechanismen kann zu einer Vielzahl pathologischer Veränderungen führen. Beispiele hierfür sind Autoimmunerkrankungen (Clemens et al., 2000), neurodegenerative Erkrankungen (Shimohama, 2000) und die Tumorbildung (Lowe et al., 2000; Tsujimoto et al., 1985; Wallace-Brodeur et al., 1999). Speziell bei der Erforschung der Tumorentstehung und -therapie spielt die Apoptose eine zentrale Rolle insbesondere bei der Entwicklung von gezielten Therapieansätzen. Auch eine Vielzahl von Viren können Apoptose in Zellen sowohl hemmen als auch induzieren. Relevante Beispiele hierfür sind das HI-Virus (HIV) (Meyaard et al., 1992), das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Gregory et al., 1991) und das humane Papilloma-Virus (HPV) (Finzer et al., 2002).

1.2.2 Morphologische Charakteristika der Apoptose

Apoptose findet typischerweise in einzelnen Zellen oder kleinen Zell-Clustern statt. Morphologische Kennzeichen der Apoptose in kernhaltigen Zellen sind die Ablösung der Zelle aus dem Gewebsverband, die Zellschrumpfung und die Pyknose. Unter dem Begriff der Pyknose versteht man die Verdichtung des Chromatins im Zellkern bei gleichzeitiger Kernmembranschrumpfung. Diese Veränderungen können lichtmikroskopisch beobachtet werden (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). Sie sind der morphologische Ausdruck einer Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA), Kondensation des Kern-Chromatins und Verdichtung des Zytoplasmas. Der Zellkern kann dabei in mehrere Teile zerfallen, was als Karyorrhexis bezeichnet wird. Häufig lässt sich das sogenannte „Membran-Blebbing“ beobachten. Der Begriff beschreibt die Entstehung von Ausstülpungen in der Plasmamembran. Am Ende des Vorgangs entsteht ein homogenes, eosinophiles Apoptosekörperchen (ein ebenfalls durch Kerr et al. geprägter Begriff). Es handelt sich um membrangebundene Vesikel, die sich in ihrer Größe und Zusammensetzung unterscheiden können. Sie bestehen aus Zytoplasma, dicht gepackten Organellen und Teilen des kondensierten Nucleus (Hacker, 2000). Die Plasmamembran bleibt bis dahin vollständig erhalten (Elmore, 2007). Diese Apoptosekörperchen können dann durch Makrophagen ohne Auslösung einer Entzündungsreaktion phagozytiert werden (Savill et al., 2000). Ein wichtiges Signal für die Erkennung und nachfolgende Phagozytose durch Immunzellen ist das Erscheinen von PS auf der äußeren Zellmembran (Fadok et al., 1998). Techniken, die diese Veränderung detektieren, wie die Färbung der Zellen mittels PS-bindendem Annexin-V gehören zu den Standard-Werkzeugen für den Nachweis von Apoptose (Koopman et al., 1994).

1.2.3 Mechanismen und Signalwege der Apoptose in kernhaltigen Zellen

Als zentrale Effektoren der Apoptose in kernhaltigen Zellen konnten vier funktionelle Molekülgruppen identifiziert werden. Dazu zählen Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische-Proteasen), Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Rezeptor Super-Familie, Proteine der Bcl-2 Familie und sogenannte Adaptorproteine, welche die molekulare Verbindung der zuerst genannten drei Gruppen darstellen (Strasser et al., 2000).

1.2.3.1 Caspasen

Die Rolle der Caspasen für die Apoptose wurde von H. Horvitz *et al.* bereits 1993 anhand von Untersuchungen des Ced-3 Gens (*Caenorhabditis elegans* death gene) entdeckt. Ced-3 kodiert für eine Protease, die für den Zelltod während der Entwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* essentiell ist (Yuan et al., 1993). Im Verlauf wurden ähnliche Proteasen in Säugetieren und daraufhin eine ganze Familie von Caspasen entdeckt (Alnemri et al., 1996). Derzeit sind mindestens 14 Caspasen bekannt. Diese können kategorisiert werden in Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10), Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) und inflammatorische Caspasen (Caspase-4, -5) (Cohen, 1997). Darüberhinaus wurden weitere spezifische Caspasen identifiziert. Hierzu zählen Caspase-11, welche die Apoptose im septischen Schock reguliert (Kang et al., 2002), Caspase-12, welche die zytotoxischen Effekte des β -Amyloids vermittelt und als Mediator des spezifischen Apoptose-Wegs des endoplasmatischen Retikulums fungiert (Nakagawa et al., 2000), die bovine Caspase-13 (Koenig et al., 2001) und die nur in embryonalen Geweben und Keratinozyten vorkommende Caspase-14 (Eckhart et al., 2000; Hu et al., 1998). Caspasen liegen in den meisten Zellen als inaktive Proenzyme mit einer niedrigen intrinsischen Aktivität, sogenannte Zymogene, vor. Nach Aktivierung können sie andere Pro-Caspasen spalten und diese ihrerseits aktivieren. Sie sind Bestandteil einer Enzymkaskade, bei der Initiator-Caspasen vornehmlich die Pro-Effektor-Caspasen aktivieren (Cohen, 1997). Dieser Vorgang wird durch die Fähigkeit einiger Caspasen zur Autoaktivierung katalysiert (Thornberry et al., 1998). Effektor-Caspasen spalten letztlich wichtige zelluläre Proteine wie

Lamin, Aktin und DNA-Reparaturenzyme. Für die DNA-Fragmentierung sind Endonucleasen verantwortlich (Wyllie, 1980). Es konnte die Caspase-aktivierte DNase (CAD), welche normalerweise durch einen Inhibitor (iCAD) inaktiviert wird, identifiziert werden. Während der Apoptose wird iCAD durch die Caspase-3 gespalten und somit die CAD aktiviert (Sakahira et al., 1998). Bezüglich der Initiierung der Apoptose unterscheidet man zwischen zwei Hauptsignalwegen, dem extrinsischen Signalweg und dem intrinsischen Signalweg. Daneben gibt es weitere Caspasen-abhängige und Caspasen-unabhängige Signalwege, wie den spezifischen Signalweg des endoplasmatischen Retikulums (ER) und den Perforin / Granzym-Signalweg.

1.2.3.2 Extrinsischer Signalweg

Die Initiierung der Apoptose über den extrinsischen Signalweg beinhaltet die Liganden-Bindung an transmembranösen Rezeptoren, welche von vielen Autoren als sogenannte Todesrezeptoren bezeichnet werden. Sie stammen aus der TNF-Rezeptor-Familie und besitzen eine zytoplasmatische Todesdomäne (death domain [DD]), welche eine kritische Rolle bei der Übermittlung der Signale von der Zelloberfläche nach intrazellulär spielt (Ashkenazi et al., 1998; Locksley et al., 2001). Es sind mehrere Rezeptor-Liganden-Paare und nachfolgende intrazelluläre Signalwege bekannt, unter anderem Fas-L / Fas-R, TNF- α / TNF-R1, Apo3 / DR3, Apo2 / DR4, und Apo2L / DR5 (Ashkenazi et al., 1998; Peter et al., 1998). Am besten charakterisiert sind die nachfolgenden molekularen Vorgänge an den Fas-L / Fas-R und TNF- α / TNF-R1 - Modellen. Nach Ligandenbindung an den Rezeptoren werden Adaptorproteine rekrutiert. Die Bindung von TNF- α an TNF-R1 führt zu der Rekrutierung des ebenfalls eine Todesdomäne tragenden Proteins TRADD (TNF receptor type 1-associated DD protein) (Hsu et al., 1995). TRADD rekrutiert ein weiteres Protein, FADD (Fas-Associated protein with DD). Dieses trägt eine Todeseffektor-Domäne (DED), welche an die Caspase-8 binden kann und diese aktiviert (Hsu et al., 1996). Die Bindung von Fas-L an Fas-R führt hingegen direkt zur Bindung von FADD (Chinnaiyan et al., 1995). Daraus entsteht der „death inducing signaling complex“ (DISC). Er besteht aus dem Todesrezeptor, FADD und Caspase-8. Im

Folgendes kommt es zu einer weiteren Aktivierung der Initiator-Caspasen (Peter et al., 2003).

1.2.3.3 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird über nicht-rezeptorvermittelte, intrazelluläre Signale aktiviert. Diese wirken direkt auf molekulare Ziele innerhalb der Zelle. Vor allem die Mitochondrien spielen hier eine entscheidende Rolle (Marchetti et al., 1996). Es existieren positive Stimuli wie beispielsweise Strahlung, Hypoxie, Toxine, freie Radikale, Hyperthermie oder virale Infektionen und negative Stimuli wie beispielsweise der Wegfall bestimmter Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine, welche normalerweise die Apoptose unterdrücken (Elmore, 2007). Alle Stimuli führen zur Freisetzung proapoptischer Proteine aus den Mitochondrien. Zu dieser Gruppe gehören Cytochrom C (Liu et al., 1996), Smac / Diabolo (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) und die Serinprotease HtrA2 / Omi (van Loo et al., 2002). HtrA2 / Omi und Smac / Diabolo binden und inaktivieren sogenannte „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs). IAPs sind eine Gruppe strukturell und funktionell verwandter Proteine, welche befähigt sind Caspasen zu hemmen (Deveraux et al., 1997). Über den Verlust der über IAPs vermittelten Caspase-Hemmung wirken sie proapoptisch. Cytochrom C befindet sich normalerweise im intermembranösen Raum der Mitochondrien, wo es als Elektronencarrier bei der oxidativen Phosphorylierung innerhalb des Energiestoffwechsels dient. Nach Translokation in das Zytosol bindet und aktiviert Cytochrom C direkt den „apoptotic protease activating factor-1“ (Apaf-1) (Zou et al., 1997). Apaf-1 führt durch Oligomerisierung zur Bildung des Apoptosoms, welches für die Aktivierung der Pro-Caspase-9 verantwortlich ist (Chinnaiyan, 1999). Als Apoptosom wird der Komplex aus Cytochrom C, Apf-1-Multimeren, Desoxyadenosintriphosphat (dATP), und Pro-Caspase-9 bezeichnet (Zou et al., 1999). Die so aktivierte Caspase-9 spaltet dann Caspase-3 und setzt so die Effektor-Kaskade in Gang (Slee et al., 1999). Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der Signalwege des extrinsischen und intrinsischen Weges.

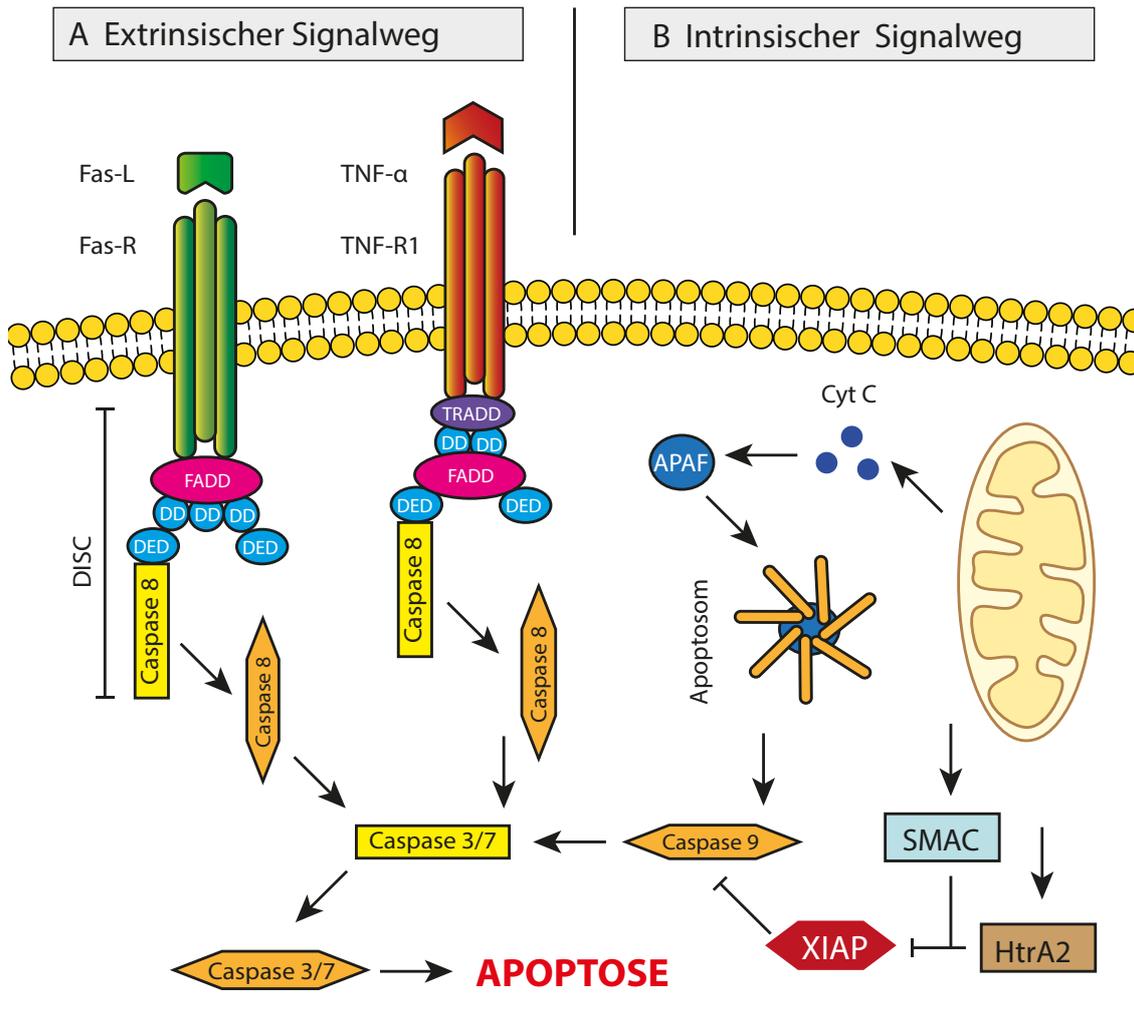


Abbildung 2 - Intrinsischer und extrinsischer Signalweg der Apoptose – [A] Rezeptorvermittelte Apoptose durch Fas-L / Fas-R und TNF- α / TNF-R1. Über Aktivierung von Caspase-8 erfolgt die Aktivierung der Effektor-Caspasen. [B] Intrinsischer Signalweg durch Cytochrom C-Freisetzung und Bildung eines Apoptosoms erfolgt die Aktivierung der Effektor-Caspasen.

Als weiterer mitochondrial kontrollierter, aber Apaf-1 / Caspase-9 unabhängiger Signalweg wird die Freisetzung des „apoptosis inducing factor“ (AIF) diskutiert (Susin et al., 1999). AIF bewirkt *in vitro* eine DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation und hat zusätzlich einen Einfluss auf die Membranpermeabilität der Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom C (Susin et al., 1999).

1.2.3.4 Rolle der Bcl-2-Proteine

Die Regulation der mitochondrial vermittelten Apoptose erfolgt durch Proteine der Bcl-2 Familie (Cory et al., 2002). Bereits 1980 wurde entdeckt, dass Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) in hämatopoetischen Zelllinien anti-apoptotisch wirkt (Vaux et al., 1988). Bisher sind mindestens 20 Proteine als Mitglieder der Bcl-2 Familie identifiziert (Cory et al., 2002; Reed, 2000). Diese umfasst drei funktionelle Gruppen: die anti-apoptotischen Proteine ähnlich dem Bcl-2, die pro-apoptotischen Proteine der Bax-Familie (Bcl-2-associated X protein) und die ebenfalls pro-apoptotische „BH3-only“-Familie.

Zu den anti-apoptotischen Proteinen zählen neben Bcl-2 auch Bcl-XL, Bcl-w, A1, Mcl1 und andere (Cory et al., 2002). Die kritische Rolle im Vorgang der Apoptose vermitteln die Proteine unter anderem über ihre Fähigkeit, die Permeabilität der Mitochondrienmembran zu regulieren und so die Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Mediatoren wie Smac / Diablo zu kontrollieren (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). Dies bewerkstelligen sie unter anderem durch die Hemmung der pro-apoptotischen Proteine der Bax-Familie (Oltvai et al., 1993).

Zu den pro-apoptotischen Proteinen der Bax-Familie zählen Bax, Bak und Bok (Chittenden et al., 1995; Hsu et al., 1997; Oltvai et al., 1993). Bax und Bak scheinen entscheidend für die Induktion der Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran und nachfolgender Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle wie Cytochrom C zu sein (Newmeyer et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen denen die beiden Proteine Bax und Bak fehlen gegen eine Vielzahl apoptotischer Stimuli wie beispielsweise UV-Strahlung, Wachstumsfaktorenzug oder Medikamente wie Etoposid und Staurosporin resistent sind (Wei et al., 2001). Eine gängige Theorie über den Mechanismus der Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran ist die Induktion von Poren durch Bax und Bak, der genaue Mechanismus ist noch unklar (Antonsson et al., 2000; Cory et al., 2002).

Zu der Gruppe der „BH3-only“-Familie gehören unter anderem Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa und Puma (Cory et al., 2002). Der komplexe Modus ihrer Interaktion mit den anti- und pro-apoptotischen Proteinen ist nicht vollständig

geklärt. Auch das Protein p53 spielt bei der Regulation der Apoptose eine komplexe Rolle, indem es direkt und indirekt die Aktivität der Bcl-2 Proteine reguliert (Hemann et al., 2006).

1.2.3.5 ER-Signalweg und Perforin/Granzym-Signalweg

Ein erst später entdeckter Mechanismus der Apoptose wird über das endoplasmatische Retikulum (ER) induziert (Kozutsumi et al., 1988). Er ist unabhängig von Death-Rezeptor-Signalen und dem mitochondrialen Apoptose-Signalweg. Trigger dieses Signalwegs sind ER-Stresssignale wie die Akkumulation fehlgefalteter Proteine (UPR - unfolded Protein Response) (Chapman et al., 1998).

Ein weiterer Signalweg, der vor allem die Zytotoxizität von T-Zellen und NK-Zellen vermittelt ist der Perforin / Granzym-Signalweg (Trapani et al., 2002). Neben der Fähigkeit, über Fas-L / Fas-R-Interaktion den extrinsischen Apoptoseweg auszulösen (Brunner et al., 2003), besitzen T-Zellen die Fähigkeit über das porenformierende, transmembranöse Protein Perforin und der nachfolgenden Freisetzung von Granzym-A / -B in die Zielzelle deren Apoptose auszulösen (Trapani et al., 2002; Voskoboinik et al., 2015). Granzym-B kann beispielsweise direkt Caspase-3 und -8 spalten (Atkinson et al., 1998; Medema et al., 1997) und die mitochondriale Cytochrom C-Freisetzung beeinflussen (Heibein et al., 1999; MacDonald et al., 1999).

1.2.4 Die Rolle von Ceramid (CER) in der Apoptose

Ceramid (CER) ist ein Sphingolipid bestehend aus Sphingosin und über eine Amid-Bindung gebundene Fettsäuren. Ceramide sind Bestandteil des Sphingomyelin (N-Acylsphingosin-1-Phosphorylcholine; SM), welches neben Glycerophospho-lipiden und Cholesterol mit einem Anteil von ca. 1 - 2 % eines der Hauptbestandteile der Zellmembran darstellt (Barenholz et al., 1980).

1.2.4.1 Der CER-Metabolismus

Der CER-Metabolismus ist komplex und wird durch eine Vielzahl von Enzymen bewerkstelligt. Die de-novo Synthese erfolgt durch Kondensation von Palmitoyl-Coenzym A und Serin durch die Serin-Palmitoyl-Transferase. Das dabei

entstehende 3-Ketosphinganin wird zu Dihydrosphingosin reduziert (Merrill et al., 1990). Dihydrosphingosin wird durch die CER-Synthase (Sphinganin N-Acyltransferase) und die Dihydroceramid-Reduktase zu CER umgewandelt (Mandon et al., 1992; Rother et al., 1992). Neben der de-novo Synthese wird CER hauptsächlich aus Sphingomyelin durch die Sphingomyelinase, eine Sphingomyelin-spezifische Form der Phospholipase C, generiert (Kolesnick, 1991). Es sind mindestens fünf Isoformen der Sphingomyelinase bekannt, die jeweils durch ihr charakteristisches pH-Optimum gekennzeichnet sind. Hierzu zählen die saure Sphingomyelinase (A-SMase), die sich in den sauren Zellkompartimenten befindet (Gatt, 1963) sowie die neutralen Magnesium-abhängigen und -unabhängigen Sphingomyelinasen (N-SMase) (Gatt, 1976; Yamaguchi et al., 1978), die sich an der Plasmamembran befinden. Die Isoformen N- und A-SMase sind für die CER-Generierung in einem Zeitrahmen von Sekunden bis Minuten verantwortlich, weshalb sie wahrscheinlich die größte Rolle in der frühen Signaltransduktion spielen (Kolesnick et al., 1998). Daneben kann CER durch Hydrolyse von komplexer Glykosphingolipide generiert werden (Hannun et al., 2011). Die Rolle dieses Signalweges im Rahmen der Apoptose durch exogene Stimuli ist noch unklar (Kitatani et al., 2008).

1.2.4.2 CER-induzierte Apoptose

CER kann die Aktivität von bestimmten Enzymen modulieren und auf diesem Weg eine Vielzahl zellulärer Signalwege beeinflussen. Beispiele hierfür sind die Regulation der Zellalterung (Venable et al., 1995), die Förderung der zellulären Differenzierung, die Steuerung des Zellwachstums (Okazaki et al., 1990), die Beeinflussung der Zellteilung (Jayadev et al., 1995) sowie die Induktion der Apoptose (Obeid et al., 1993). Durch Untersuchungen an Patienten mit der Niemann-Pick-Krankheit – einem hereditären Defekt der sauren Sphingomyelinase und dadurch verminderter CER-Produktion – konnte die Rolle von CER bei der Apoptose aufgezeigt werden. So zeigen sich Lymphoblasten dieser Patienten, ebenso wie Lymphoblasten von A-SMase knock-out Mäusen unempfindlich gegenüber der Apoptose-Induktion durch ionisierende Strahlung (Santana et al., 1996).

Es sind verschiedene Zytokine und externe Stresssignale bekannt, die zu einer CER-Akkumulation und nachfolgender Auslösung der Apoptose führen. Dazu gehören TNF- α (Kolesnick et al., 1994; Obeid et al., 1993), Fas-L (Gulbins et al., 1995), ionisierende Strahlung (Haimovitz-Friedman et al., 1994), Hitzeschock, oxidativer Stress und ultraviolette Strahlung (Verheij et al., 1996). Zudem beeinflussen eine Reihe von Xenobiotika die CER-Generierung. Obwohl die Signalwege der CER-induzierten Apoptose nur unzureichend verstanden sind, sind einige Zielmoleküle von CER bekannt. Dazu gehören die CER-aktivierte Proteinkinase (CAPK) (Mathias et al., 1991), welche später als Kinase suppressor of Ras (KSR) identifiziert werden konnte (Zhang et al., 1997), die Mixed lineage Kinase (MLK) (Sathyanarayana et al., 2002), die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) / Stress-aktivierte Phosphokinase (SAPK) (Verheij et al., 1996), die atypische Proteinkinase C (PKC ζ) (Bourbon et al., 2000), Cathepsin D (Heinrich et al., 2000) und die Serin/Threonin-spezifischen Protein-Phosphatasen PP1 (Chalfant et al., 1999) und PP2A (Dobrowsky et al., 1993). Zudem kann CER die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran beeinflussen (Colombini, 2016).

1.2.4.3 Medikamentöse Beeinflussung des CER-Metabolismus

Eine Reihe pharmakologischer Substanzen, insbesondere darunter einige klinisch relevante Zytostatika, scheinen ihre Apoptose-induzierende Wirkung in kernhaltigen Zellen über die Aktivierung von CER-assoziierten Signalwegen zu vermitteln. Die Beeinflussung des CER-Metabolismus erfolgt dabei über *de novo* Synthese, Sphingomyelinase-Aktivierung oder Blockierung der Glukosylceramid-Bildung (Senchenkov et al., 2001). Zu diesen pharmakologischen Substanzen gehören die Anthracycline Daunorubicin (DNR) und Doxorubicin (DXR). Beide erhöhen die CER-Konzentration in verschiedenen Zelltypen. DNR stimuliert die CER-Synthase in P388- und U937-Zellen (Bose et al., 1995) sowie die Sphingomyelin-Hydrolyse in U937- und HL-60-Zellen (Jaffrezou et al., 1996). DXR erhöht ebenfalls die CER-Konzentration in HL60-Zellen (Kawase et al., 2002). Die Vincaalkaloide Vincristin (VCR) und Vinblastin (VBL) können ihren zytotoxischen Effekt in ALL-697-Zellen und KB-3-1-Zellen ebenfalls über CER vermitteln (Cabot et al., 1999; Zhang et al., 1996).

Tamoxifen blockiert die Umwandlung von CER in Glucosylceramid (Cabot et al., 1996). Weitere Substanzen, die in Untersuchungen einen Einfluss auf den CER-Metabolismus gezeigt haben sind Etoposide (Tepper et al., 1999), 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ (Okazaki et al., 1989), Fludarabine (Mengubas et al., 1999), Paclitaxel (Charles et al., 2001) und Mitoxantron (Bettaieb et al., 1999). Die gezielte Untersuchung der Möglichkeiten zur Beeinflussung des CER-Metabolismus in der Tumorthherapie ist Gegenstand aktueller Forschung (Liu et al., 2013; Morad et al., 2013; Senchenkov et al., 2001).

1.3 Der suizidale Erythrozyten-Zelltod / Eryptose

1.3.1 Begriff der Eryptose

Da reife Erythrozyten weder einen Zellkern noch Organellen wie Mitochondrien besitzen ging man lange davon aus, dass sie nicht zur klassischen Apoptose befähigt sind. So sind sie die einzigen Zellen, bei denen die Exposition gegenüber Cycloheximid und Staurosporin nicht zur Einleitung des Apoptose-typischen Zelltodes führt (Weil et al., 1996). Interessanterweise reicht das Fehlen eines Zellkerns nicht aus um dies zu erklären. Am Beispiel von kernlosen Zytoblasten und mit Hilfe von Cytochalasin B enukleierten Zellen konnte gezeigt werden, dass auch Zellen ohne Nucleus zur Apoptose befähigt sind (Jacobson et al., 1994; Schulze-Osthoff et al., 1994). Andererseits sind kernhaltige fetale Erythrozyten wie auch kernhaltige Hühner-Erythrozyten befähigt, auf Apoptose-Stimuli mit dem suizidalem Zelltod zu reagieren (Sekizawa et al., 2000; Weil et al., 1998). Letztlich konnten Untersuchungen von Schulze-Osthoff / Wesselborg sowie Bratosin 2001 zeigen, dass auch reife kernlose Erythrozyten befähigt sind einen zellulären Prozess zu durchlaufen, an dessen Ende der Zelluntergang steht und der wesentliche charakteristische Merkmale der Apoptose aufweist (Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001). Sie konnten außerdem zeigen, dass reife Erythrozyten ebenfalls Caspase-3 und Caspase-8 enthalten, welche aber nicht zwangsweise aktiviert werden, während weitere wichtige Mediatoren der Apoptose wie beispielsweise Apaf-1, Cytochrom C und Caspase-9 fehlen (Berg et al., 2001). Inwieweit man von

erythrozytärer Apoptose sprechen kann, wird daher weiterhin kontrovers diskutiert. In Anlehnung an den Begriff der Apoptose wurde 2005 durch Lang *et al.* der Terminus Eryptose eingeführt. Er beschreibt den suizidalen, programmierten Erythrozyten-Zelltod (Lang *et al.*, 2005a). Dieser zeigt ähnliche Charakteristika und wird über Mechanismen vermittelt, welche ebenfalls bei der Apoptose kernhaltiger Zellen vorkommen. So sind beispielsweise die Externalisierung von PS und nachfolgende Phagozytose durch Makrophagen, die Ausbildung von Mikrovesikeln in der Zellmembran, die Zellschrumpfung sowie die Zunahme des intrazellulären Calciums auch für die Eryptose charakteristisch.

1.3.2 Trigger und Inhibitoren der Eryptose

Eine Vielzahl von pharmakologisch aktiven Substanzen und endogenen Molekülen haben in Untersuchungen gezeigt, dass sie die bekannten Charakteristika der Eryptose (PS-Externalisierung, Anstieg des intrazellulären Calciums und Zellschrumpfung) hervorrufen und somit Eryptose *in vitro* auslösen können. Aktuell sind über 100 Substanzen bekannt, die als Stimulatoren der Eryptose angesehen werden können, darunter auch viele gängige Medikamente wie Celecoxib, Cisplatin, Cyclosporin, Fluoxetin, Methyldopa, Nystatin, Paclitaxel, Ribavirin, Rifampicin, Sorafenib und Sunitinib (Lang *et al.*, 2015d). Die meisten dieser Xenobiotika vermitteln Eryptose über einen Anstieg des intrazellulären Calciums, einige auch über eine gesteigerte Produktion von endogenem CER. Die Aktivierung von Calpain, Caspasen und verschiedenen Kinasen (z.B.: AMPK, GK, PAK2, CK1 α , JAK3, PKC, p38-MAPK) sind ebenfalls in der Regulation der Eryptose involviert (Lang *et al.*, 2015c). Auch eine Reihe von zellulären Stressoren sind befähigt, den suizidalen Erythrozyten-Zelltod auszulösen. Dazu gehören unter anderem der Energieentzug beispielsweise in Form von Adenosintriphosphat (ATP)-Mangel (Klarl *et al.*, 2006), osmotischer Stress (Lang *et al.*, 2003a), oxidativer Stress (Lang *et al.*, 2014) und Temperaturveränderungen (Foller *et al.*, 2010). Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, dass die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Eryptose-Signalen mit dem Alter der Erythrozyten zunimmt

(Ghashghaieina et al., 2012). Der zugrundeliegende Mechanismus für die höhere Empfindlichkeit am Ende der Lebensspanne ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Im Gegensatz zur Stimulierung kann Eryptose auch durch bestimmte Substanzen gehemmt werden. Hierzu gehören endogene Substanzen wie Erythropoetin (Myssina et al., 2003; Vota et al., 2012) und Stickstoffmonoxid (Nicolay et al., 2008). Inwieweit diese Substanzen bei der physiologischen Regulation des Erythrozyten-Zelltodes eine Rolle spielen ist nicht vollständig erklärt. Als weitere endogene Moleküle mit hemmendem Einfluss konnten beispielsweise Adenosin, Harnstoff und Glutathion identifiziert werden (Dumaswala et al., 2000; Lang et al., 2004b; Niemoeller et al., 2007). Auch eine Reihe von Xenobiotika wie beispielsweise Amitriptylin, Katecholamine und Furosemid können eine Hemmung der Eryptose vermitteln (Brand et al., 2008; Kucherenko et al., 2012; Lang et al., 2005b). Es muss davon ausgegangen werden, dass eine Vielzahl weiterer Xenobiotika existieren, die Eryptose induzieren oder hemmen können.

1.3.3 Pathologien mit gesteigerter Eryptose

Es existiert eine Reihe von Erkrankungen, die mit einer Erhöhung der Eryptose beziehungsweise einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber proeryptotischen Stimuli einhergehen. Hierzu gehören Hämoglobinstörungen wie die Sichelzellanämie und Thalassämie (Basu et al., 2010a; Weiss et al., 2012), Enzymdefekte wie der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Lang et al., 2002), Defekte der Membranproteine wie beispielsweise bei der hereditären Sphärozytose und Defekte des GLUT1-Proteins (Basu et al., 2010a; Weber et al., 2008). Auch bei einer Infektion mit dem Malaria-Erreger Plasmodium zeigt sich eine gesteigerte Eryptose (Foller et al., 2009a).

Bei folgenden Erkrankungen oder pathologischen Zuständen wurde ebenfalls eine gesteigerte Eryptose nachgewiesen: Eisenmangelanämie (Kempe et al., 2006), Typ II Diabetes mellitus (Calderon-Salinas et al., 2011; Maellaro et al., 2013), Niereninsuffizienz (Abed et al., 2014), Leberversagen (Lang et al., 2015b), myelodysplastisches Syndrom (Basu et al., 2010b), paroxysmale

nächtliche Hämoglobinurie (Basu et al., 2010b), hämolytisch-urämisches Syndrom (Lang et al., 2006b), Sepsis (Kempe et al., 2007), Phosphat-Mangel (Birka et al., 2004), Dehydratation (Abed et al., 2013), Fieber (Foller et al., 2010), Parkinson (Pretorius et al., 2014), M. Wilson (Lang et al., 2007) und Mutationen des adenomatous polyposis coli (APC)-Gens (Qadri et al., 2012).

Das Resultat einer gesteigerten Eryptose mit nachfolgender Phagozytose PS-exponierender Erythrozyten durch Makrophagen führt sobald die Kompensationskapazität zur Neubildung überschritten ist zu einem Abfall der Erythrozytenzahlen mit resultierender Anämie (Lang et al., 2006a). Einige der oben genannten Erkrankungen gehen zudem parallel mit einer gesteigerten Hämolyse einher. Eryptose könnte daher auch als ein physiologischer Mechanismus zur Verhinderung exzessiver Hämolyse und damit verbundener Freisetzung von Intrazellulärsubstanz angesehen werden (Lang et al., 2012b).

1.3.4 Mechanismen und Signalwege des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes

Einer der wichtigsten Auslöser der Eryptose ist der Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Ein Mechanismus für die gesteigerte Ca^{2+} -Aktivität ist der gesteigerte Calciumeinstrom von extrazellulär. Sowohl die Zellschrumpfung als auch die Membranveränderungen sind Folge der intrazellulären Calciumerhöhung (Lang et al., 2006a). Der Anstieg des zytosolischen Calciums erfolgt durch Aktivierung Ca^{2+} -permeabler, nichtselektiver Kationenkanäle (Huber et al., 2001; Lang et al., 2003a). Diese Kanäle werden unter anderem durch Prostaglandin E2 aktiviert, welches beispielsweise bei osmotischem Stress gebildet wird (Kaestner et al., 2002; Lang et al., 2005c). So konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibierung der Cyclooxygenase oder Phospholipase A1 unter osmotischem Stress die Aktivierung dieser Kanäle hemmt (Lang et al., 2005c). Auch oxidativer Stress bzw. die Hemmung der antioxidativen Schutzsysteme aktivieren diese Kanäle (Damonte et al., 1992; Durantou et al., 2002). Die genaue molekulare Charakterisierung der Kanäle ist noch nicht vollständig erfolgt. Untersuchungen an Mausmodellen und mit Hilfe

von direkten Antikörpern legen eine Involvierung von TRCP6-Kanälen (transient receptor potential channel) nahe (Foller et al., 2008b).

Der zytosolischen Calcium-Erhöhung folgt eine Aktivierung calciumabhängiger Kalium-Kanäle (Bookchin et al., 1987; Lang et al., 2003b). Diese Kanäle werden nach seinem Erstbeschreiber auch Gardos-Kanäle genannt (Gardos, 1958). Eine durch Öffnung dieser Kanäle resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran und Erhöhung des elektrischen Gradienten für Chlorid führt zum zellulären Verlust von Kalium und Chlorid und damit verbunden zum gleichzeitigen Austritt von Wasser aus den Erythrozyten. Dies führt zur charakteristischen Zellschrumpfung (Lang et al., 2003b). Der Chlorid-Austritt erfolgt über Cl-Kanäle (Myssina et al., 2004), welche ebenfalls durch oxidativen Stress aktiviert werden können (Huber et al., 2002). Der Mechanismus der Zellschrumpfung ist zusammenfassend in Abbildung 3 dargestellt.

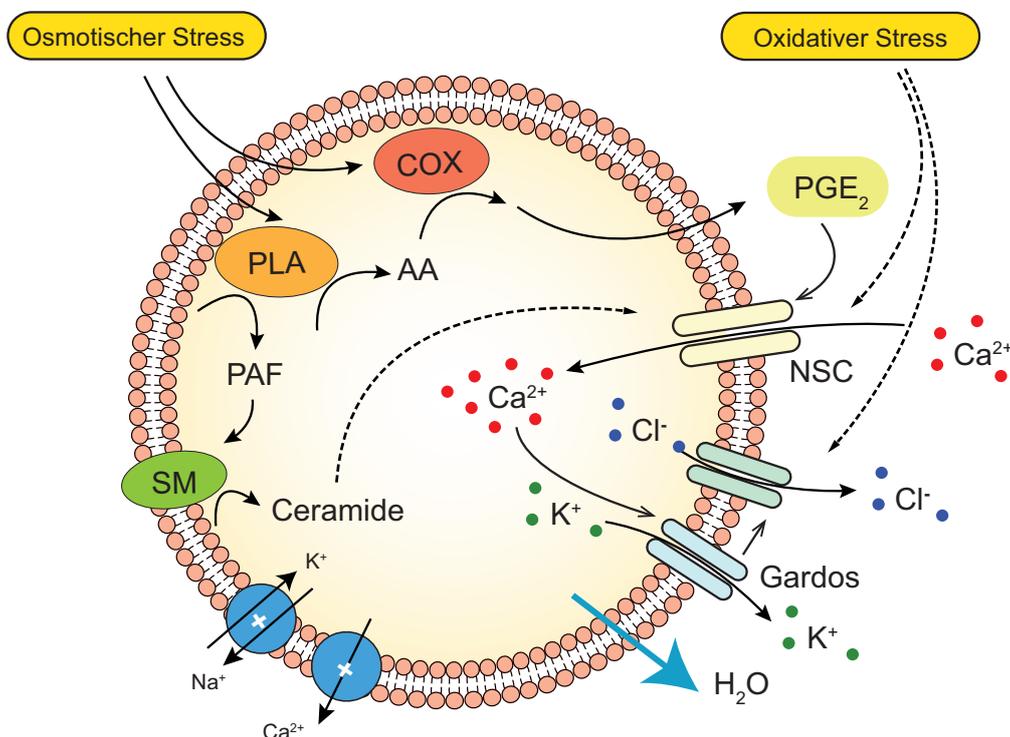


Abbildung 3 - Mechanismus der Zellschrumpfung bei der Eryptose – Durch osmotischen Stress erfolgt die Aktivierung von PLA [Phospholipase A] und COX [Cyclooxygenase], durch PGE₂ [Prostaglandin E₂] erfolgt die Öffnung der NSC-Kanäle [nichtselektive Kationenkanäle], welche auch durch oxidativen Stress aktiviert werden. Es folgt die intrazelluläre Calcium-Erhöhung und Öffnung von Kalium- und Chlorid-Kanälen mit nachfolgendem Austritt von Wasser. [AA= Arachidonsäure, SM=Sphingomyelinase, PAF=Plättchenaktivierender Faktor]

Die gesteigerte Calcium-Aktivität führt zudem zu Membranveränderungen, allen voran der Verlust der PS-Asymmetrie mit Externalisierung von PS auf die äußere Erythrozytenmembran (Henseleit et al., 1990). Der suizidale Erythrozyten-Zelltod kann mit der Aktivierung von Caspasen einhergehen (Matarrese et al., 2005). Caspasen spalten den Anionen-Austauscher AE1 (Bande-3) und stimulieren die PS-Externalisierung (Mandal et al., 2003; Mandal et al., 2002). Caspasen werden bei der Eryptose durch Leukotriene (Foller et al., 2009b), oxidativen Stress (Matarrese et al., 2005) und Diabetes mellitus Typ 2 aktiviert (Maellaro et al., 2013). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Caspasen keine zwingende Voraussetzung für den Calcium-Einstrom und die PS-Externalisierung ist (Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Weil et al., 1998). Die PS-Externalisierung erfolgt wahrscheinlich durch die Phospholipid-Scramblase, ein bisher noch nicht genau charakterisiertes Protein, welches durch Calcium-Einstrom aktiviert wird (Bever et al., 2010). Daneben spielen wohl auch Phospholipid-Flippasen und ABC-Transporter eine Rolle in der Regulation der Phospholipid-Asymmetrie der Erythrozytenmembran (Daleke, 2008). Des Weiteren ist Calpain, eine calciumabhängige Cystein-Protease welche ubiquitär in menschlichen Zellen, so auch in Erythrozyten vorkommt, in die Eryptose involviert (Michetti et al., 1997). Sie spaltet unter anderem Spektrin und trägt so zum Abbau des Zytoskeletts bei. Untersuchungen zeigen, dass Calpain-Inhibitoren die durch Calcium-Anstieg ausgelöste Zellschrumpfung, nicht aber die PS-Externalisierung, hemmen (Berg et al., 2001).

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass eine Vielzahl von Kinasen an der Vermittlung der Eryptose beteiligt sind. Zu diesen Kinasen zählt die Janus-aktivierte Kinase 3 (JAK3). Sie wird durch Phosphorylierung unter anderem bei Zelltod durch Energieentzug aktiviert und fördert die PS-Externalisierung (Bhavsar et al., 2011). Der Effekt konnte sowohl durch pharmakologische Hemmung als auch an JAK3 knock-out Mäusen unter Energieentzug nachgewiesen werden (Bhavsar et al., 2011). Stimulation der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) hemmt dagegen den Zelltod durch Energieentzug (Foller et al.,

2009c). Auch ohne zelluläre Stresssignale gibt es Hinweise, dass die Eryptose in Mäusen denen die AMPK α 1 fehlt pathologisch gesteigert ist. So leiden diese Mäuse an einer Anämie mit Retikulozytose und Splenomegalie (Foller et al., 2009c). Das Fehlen von AMPK ist begleitet von einer Herunterregulation der p21-aktivierten-Kinase (PAK2), eine pharmakologische Inaktivierung der PAK2 führt zu einer verstärkten PS-Externalisierung und verstärkt den Effekt durch Energieentzug (Zelenak et al., 2011). Glukoseentzug führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), deren direkte Aktivierung und Hemmung zeigt ihre Involvierung in der PS-Externalisierung und Zellschrumpfung unter Energieentzug (Klarl et al., 2006). Osmotischer Stress aktiviert die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPKinase) (Cowan et al., 2003), eine pharmakologische Hemmung der p38-MAPKinase vermindert den Effekt durch osmotischen Stress (Gatidis et al., 2011). Eine pharmakologische Aktivierung der Casein-Kinase-1 α (CK1 α) öffnet Kationenkanäle und führt so zu einem Calciumeinstrom mit nachfolgender Eryptose unter oxidativem Stress oder Energieentzug (Zelenak et al., 2012). Untersuchungen zeigen darüberhinaus eine Hemmung der Eryptose durch die cGMP-abhängige-Proteinkinase (cGKI). Mäuse mit cGKI-Mangel zeigen eine pathologisch gesteigerte Eryptose (Foller et al., 2008a). Die Kinase wird durch Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert (Hofmann et al., 2000), NO ist gleichzeitig ein starker Inhibitor der Eryptose (Nicolay et al., 2008). Auch die Sorafenib- und Sunitinib-sensitive Kinase spielt eine bisher noch nicht vollständig aufgeklärte Rolle in der Hemmung des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes (Lupescu et al., 2012; Shaik et al., 2012). Zusammenfassend handelt es sich bei der Regulation der Eryptose um einen komplexen zellulären Vorgang, dessen genaue Signalwege noch nicht vollständig verstanden sind.

1.3.5 Die Rolle von CER bei der Eryptose

Neben der Erhöhung des intrazellulären Calciums ist die Bildung von endogenem CER einer der wichtigsten Stimulatoren der Eryptose (Lang et al., 2015a). Dies zeigt sich beispielsweise bei der Eryptose durch osmotischen Stress (Lang et al., 2004a). Eine pharmakologische Hemmung der CER-

Produktion unter osmotischem Stress vermindert die PS-Exposition. Demgegenüber zeigen Kontroll-Erythrozyten nach Exposition gegenüber C₆-CER, C₁₆-CER oder der bakteriellen Sphingomyelinase eine gesteigerte PS-Exposition (Lang et al., 2004a). Der zugrundeliegende Mechanismus der CER-vermittelten Eryptose ist nicht vollständig verstanden. CER beeinflusst die Interaktion der Zellmembran mit dem Zytoskelett, führt zu einer reduzierten Verformbarkeit und Ausbildung von Membranvesikeln (Dinkla et al., 2012). Eine vermehrte Bildung von endogenem CER in Erythrozyten konnte bei Fieber, Sepsis, hämolytisch-urämischem Syndrom, M. Wilson, Nierenversagen und Leberversagen nachgewiesen werden (Abed et al., 2014; Foller et al., 2010; Kempe et al., 2007; Lang et al., 2015b; Lang et al., 2006b; Lang et al., 2007). Eine Vielzahl von Xenobiotika und endogenen Substanzen stimulieren oder hemmen die CER-Bildung in Erythrozyten. Stoffe, welche die Bildung stimulieren sind beispielsweise Cyclosporin, Paclitaxel, Methyldopa und Rifampicin (Abed et al., 2012b; Lang et al., 2006c; Mahmud et al., 2008; Niemoeller et al., 2006). Amitriptylin und Harnstoff hingegen wirken hemmend auf die CER-Bildung (Brand et al., 2008; Lang et al., 2004b). In Erythrozyten wird die CER-Bildung zudem durch den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) stimuliert. Bei der osmotischen Zellschrumpfung wird die PAF-Bildung durch Aktivierung der Phospholipase A2 stimuliert. Bei Mäusen, denen der PAF-Rezeptor auf Erythrozyten fehlt, bleibt die CER-Bildung und PS-Externalisierung durch PAF aus (Lang et al., 2005d). PAF öffnet zudem calciumabhängige K⁺-Kanäle (Garay et al., 1986).

1.3.6 Die Rolle von oxidativem Stress bei der Eryptose

Oxidativer Stress aktiviert nicht-selektive Kationenkanäle und führt so zu einem erhöhten Calcium-Einstrom (Lang et al., 2003a). Darüber hinaus existieren womöglich weitere Mechanismen der Eryptose-Stimulation durch oxidativen Stress. Es bestehen Hinweise darauf, dass oxidativer Stress Caspasen in Erythrozyten aktivieren kann (Maellaro et al., 2013; Mandal et al., 2002; Matarrese et al., 2005). Die Aktivierung der Caspasen scheint calciumunabhängig zu sein (Berg et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass

1.4 Die Substanzen Nitazoxanid (NZA) und Tizoxanid (TIZ)

Nitazoxanid (NZA; 2-(Acetyloxy)-N-(5-nitro-2-thiazolyl)benzamid) ist ein synthetisches 5-Nitrothiazolyl-Salicylamid-Derivat. Es wird als Arzneistoff zur Klasse der Antiparasitika gezählt (Bobak, 2006). NZA ist ein Prodrug und wird, nach oraler Aufnahme rasch in den aktiven Metaboliten Tizoxanid (TIZ) (Desacetyl-nitazoxanide) hydrolysiert. Es wurde 1976 von Jean-Francoise Rossignol am Institut Pasteur in Paris entwickelt (Rossignol et al., 1976). In klinischer Verwendung befindet es sich insbesondere zur Behandlung von Diarrhoen durch *Cryptosporidium parvum* und *Gardia lamblia* (Fox et al., 2005). Die FDA (Food and Drug Administration)-Zulassung erfolgte 2002, in Europa liegt derzeit keine Zulassung vor. NZA gilt als „*first-line*“ Medikation oben genannter Infektionen bei immunkompetenten Kindern und Erwachsenen. Es kann ebenfalls zur Behandlung von Erkrankungen durch weitere Protozoen, Trematoden, Cestoden, Nematoden, Bakterien und Viren verwendet werden (White, 2004). In der Vergangenheit wurde besonders die Wirkung von NZA bei chronischer Hepatitis B, chronischer Hepatitis C und weiteren Virusinfektionen untersucht (Nikolova et al., 2014; Rossignol, 2014). Die Rolle des Medikaments in der Behandlung von Hepatitiden ist aktuell nicht abschließend geklärt. NZA besitzt außerdem eine anti-inflammatorische Wirkung (Hemphill et al., 2006). Studien in Protozoen und anaeroben Bakterien haben gezeigt, dass der anti-infektiöse Wirkmechanismus möglicherweise auf der Interferenz mit dem Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase abhängigen Transfer der Elektronen in den Parasiten beruht (Hoffman et al., 2007). Untersuchungen zeigten weiterhin die Fähigkeit von NZA, Apoptose in bestimmten Tumor-Zellen zu triggern (Di Santo et al., 2013, 2014; Muller et al., 2008).

NZA gilt allgemein als gut verträglich. Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen gehören vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen und solche des zentralen Nervensystems. Die Anämie wird zu den seltenen [$< 1\%$] Nebenwirkungen gezählt (Bobak, 2006). Bei einer Standard-Dosierung von 500 mg wird nach etwa 4 Stunden eine maximale Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten TIZ von 2 $\mu\text{g/ml}$ in Menschen bzw. 5,6 $\mu\text{g/ml}$ in Ziegen erreicht

(Stockis et al., 1996; Zhao et al., 2010). In pharmakologischen Studien des Herstellers Romark Laboratories, L.C., Tampa, FL, USA erreicht der aktive Metabolit TIZ nach Gabe von 500 mg eine maximale Plasma-Konzentration von 10,6 µg/ml in Erwachsenen bzw. 9,1 µg/ml in Kindern (Romark Pharmaceuticals, 2007).

1.5 Die Substanz Mitoxantron (MX)

Mitoxantron (MX; 1,4-Dihydroxy-5,8-bis-[2-(2-hydroxyethylamino)-ethylamino] - anthracen-9,10-dion) ist ein zytostatisch und immunmodulatorisch wirksamer Arzneistoff aus der Gruppe der Anthracendione. Es wurde 1979 von der American Cynamid Company entwickelt (Murdock et al., 1979). MX wird in Onkologie vorwiegend zur Behandlung von fortgeschrittenen oder metastasierten Mamma-Karzinomen, Non-Hodgkin Lymphomen, akuter myeloischer Leukämie des Erwachsenen und zur Therapie von fortgeschrittenen und hormonresistenten Prostata-Karzinomen in Kombination mit Glukokortikoiden eingesetzt (Henderson et al., 1989; McLaughlin et al., 1996; Paciucci et al., 1983; Tannock et al., 2004). Ebenso ist es zur Behandlung progressiver Multipler Sklerose (MS) in klinischer Verwendung (Hartung et al., 2002). Die Zulassung durch die FDA erfolgte 1987 zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie und 1996 zur Behandlung des fortgeschrittenen Prostata-Karzinoms sowie 2000 zur Behandlung der schubförmig, remittierenden MS, sekundär progredienten MS und progredient, remittierenden MS. Der zytostatische Effekt beruht wahrscheinlich auf der Hemmung der Topoisomerase II, welche zur Auflockerung bzw. Entspiralisierung und Reparatur beschädigter, Doppelsestrang-DNA dient (Tewey et al., 1984). Studien zeigten, dass MX zwischen den DNA-Basen interkaliert und so DNA-Quervernetzungen und Strangbrüche verursacht (Durr et al., 1983; Kapuscinski et al., 1981). MX wirkt unabhängig vom Zellzyklus zytotoxisch und führt zu einer Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase (Durr et al., 1983). Durch Aktivierung von Caspasen wirkt es zumindest teilweise pro-apoptotisch (Bellosillo et al., 1998). Die immunmodulatorische Wirkung wird auf die Suppression von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen sowie durch

Unterdrückung der durch Makrophagen vermittelten B-Zell-Proliferation zurückgeführt (Fidler et al., 1986; Fox, 2004).

Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen, die nach Einnahme von MX auftreten können, gehören Veränderungen des blutbildenden Systems wie eine Leukopenie und Anämie. Letztere tritt nach Angaben in der Literatur bei etwa 15 % der Patienten auf (Kingwell et al., 2010). Weitere unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind Amenorrhö, Übelkeit, Erbrechen, Alopezie und Harnwegsinfektionen (Martinelli Boneschi et al., 2013). MX ist zudem kardiotoxisch, was sich in einer Kardiomyopathie mit verminderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion äußern kann (Kingwell et al., 2010). Die Entwicklung einer therapie-assoziierten akuten Leukämie unter MX-Gabe wird ebenfalls diskutiert (Chan et al., 2013). MX erreicht *in vivo* eine maximale Plasmakonzentration von 0,8 µg/ml bzw. 6,4 µg/ml nach Applikation von 15 mg/m² bzw. 90 mg/m². MX wird sehr schnell in die Zellen aufgenommen und erreicht daher ähnlich hohe intrazelluläre Konzentrationen (Canal et al., 1993).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob Nitazoxanid (NZA) / Tizoxanid (TIZ) und Mitoxantron (MX) befähigt sind, den als Eryptose charakterisierten suizidalen Zelltod von Erythrozyten *in vitro* auszulösen. Beide Substanzen können eine klinisch relevante Anämie auslösen, bei MX tritt diese Nebenwirkung deutlich häufiger auf. Zudem ist bekannt, dass MX den Ceramid (CER)-Metabolismus in kernhaltigen Zellen beeinflusst und dort Apoptose auslösen kann. Eine Beeinflussung des CER-Metabolismus durch NZA ist bisher nicht beschrieben. Um den Effekt der Substanzen auf Erythrozyten zu untersuchen, werden die bisher bekannten charakteristischen Merkmale der Eryptose mithilfe etablierter Methoden der Durchflusszytometrie analysiert. Des Weiteren sollen mithilfe zusätzlicher Experimente die dabei involvierten Signalwege aufgeklärt werden. Von besonderem Interesse ist dabei, ob eine Erhöhung des intrazellulären Calciums oder eine Steigerung der endogenen CER-Synthese eine Rolle spielen. Es soll außerdem untersucht werden, ob eine pharmakologisch *in vivo* erzielbare Plasmakonzentration der Substanzen ausreicht, um eine signifikante Erhöhung der Eryptose *in vitro* auszulösen und einen Erklärungsansatz der beobachteten Anämieentwicklung durch die Substanzen zu liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Erythrozyten

Die humanen Erythrozyten wurden von der Blutbank der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Entnahme erfolgte an freiwilligen, adulten und gesunden Spendern in Lithium-Heparin Entnahmesystemen (S-Monovette®) der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), welche etwa 16 I.U. Heparin/ml Blut enthalten. Die Ethik-Kommission der Universität Tübingen erteilte die Genehmigung nach eingehender Prüfung unter der Projekt-Nr. 184/2003V. Alle Spender erteilten ihre schriftliche Zustimmung zur weiteren Verwendung der Proben. Bei der Auswahl der Spender galten die Richtlinien der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen welche an die Richtlinie „zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ der Bundesärztekammer in der Fassung vom 16.04.2010 angelehnt ist (Bundesärztekammer, 2010). Nach der Entnahme erfolgte die direkte Aufbereitung. Hierzu wurde das Plasma von den zellulären Bestandteilen separiert. Die heparinisierten Blutproben wurden mit 120 rcf für 20 Minuten bei 23 °C zentrifugiert. Das zellfreie Plasma und der Leukozyten-/ Thrombozyten-Überstand wurden von Hand abpipettiert. Danach erfolgte das zweimalige Waschen mit physiologischer Ringer-Lösung. Die Erythrozyten-Proben wurden bei +4 °C gelagert und noch am jeweils selben Tag für die Experimente verwendet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Experimente bei einem Hämatokrit von 0,4 % in Ringer-Lösung bzw. modifizierten Ringer-Lösungen. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen wurden alle Proben in einer Sterilkammer behandelt. Um Fehlergebnisse möglichst auszuschließen wurde anhand von Kontrollgruppen offensichtliche Kontaminierungen überwacht.

2.2 Verwendete Substanzen

2.2.1 Nitazoxanid (NZA) und Tizoxanid (TIZ)

Nitazoxanid (CAS No. 55981-09-4) wurde von Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen. 10 mg NZA wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen zu 50 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml und 1 mg/ml in DMSO hergestellt und jeweils in den angegebenen Endkonzentrationen verwendet. Tizoxanid (CAS No. 173903-47-4) wurde von der Firma CaymanChemical (Ann Arbor, USA) bezogen. Es wurden identische Verdünnungen wie oben beschrieben in DMSO hergestellt. Die Testsubstanzen wurden bei -20 °C und unter Lichtschutz gelagert.

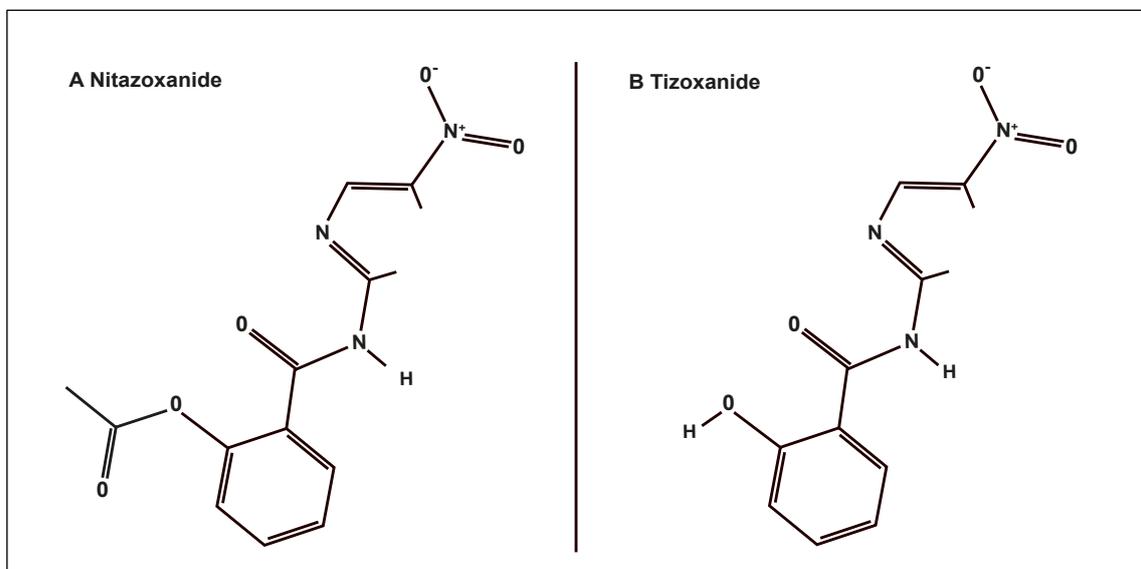


Abbildung 5 - Struktur von NZA und TIZ; modifiziert nach PubChem

2.2.2 Mitoxantron (MX)

Mitoxantron (CAS No. 70476-82-3) wurde von SelleckChemicals (Houston, USA) bezogen. 50 mg MX wurden in einer Konzentration von 50 mg/ml in DMSO gelöst. Es wurden Verdünnungen von 25 mg/ml, 10 mg/ml und 5 mg/ml in DMSO angefertigt. Die Substanzen wurden ebenfalls bei -20 °C unter Lichtschutz gelagert.

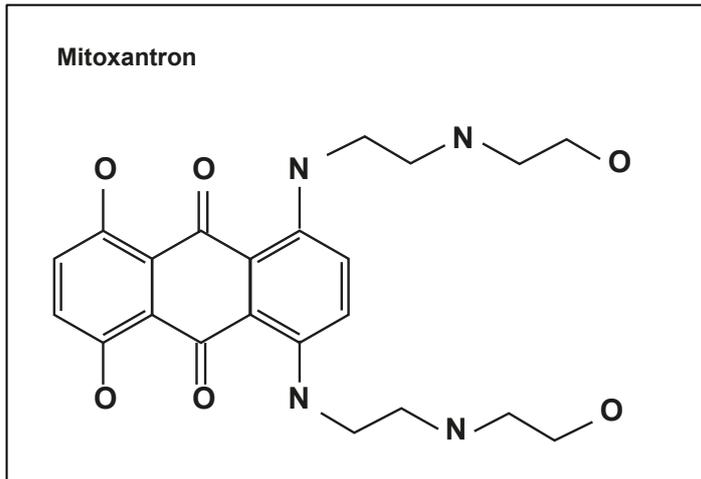


Abbildung 6 - Struktur von MX; modifiziert nach PubChem

2.2.3 FITC-Annexin-V

Zur durchflusszytometrischen Messung der Expression von PS auf der äußeren Erythrozytenmembran wurde FITC-Annexin-V der Firma ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland) verwendet. Annexin-V bindet $[Ca^{2+}]$ -abhängig an PS und Phosphatidylethanolamine (Reutelingsperger et al., 1997). Dadurch ist ein nicht-quantitativer Nachweis der PS-Expression auf der äußeren Zellmembran möglich. FITC (Fluorescein-Isothiocyanate) fluoresziert bei einem Emissionsmaximum von 519 nm (entspricht etwa dem FL-1-Kanal des Durchflusszytometers). FITC-Annexin-V wurde für die Messungen in einer Verdünnung von 1:200 in Annexin-Wasch-Puffer verwendet, welche jeweils direkt vor der Verwendung hergestellt wurde. FITC-Annexin-V wurde bei +4 °C unter Lichtschutz gelagert.

2.2.4 Fluo-3-AM

Zur Messung des intrazellulären Calciums wurde in DMSO gelöstes Fluo-3-AM (Biotium, Hayward, USA) verwendet. Fluo-3-AM ist in der Esterform ein nicht-fluoreszierendes Molekül. Als Acetoxymethyl-Ester (AM) kann es die Zellwand passieren und verbleibt nach Esterspaltung durch unspezifische Esterasen in der Zelle. Das nicht-veresterte Fluo-3 bildet in Verbindung mit Calcium einen Komplex. Durch die Komplexbildung wird die Fluoreszenz um den Faktor 35 - 40 verstärkt (Minta et al., 1989). Somit können mit Hilfe von Fluo-3 Rückschlüsse auf das intrazellulär freigesetzte Calcium gezogen

werden. Das Emissionsmaximum liegt bei 525 nm (entspricht dem FL-1-Kanal des Durchflusszytometers). Fluo-3-AM wurde bei -20 °C unter Lichtschutz gelagert.

2.2.5 N-Acetylcystein

N-Acetylcystein (NAC) (CAS No. 616-91-1) ist ein starkes Antioxidans. Das Molekül verfügt über eine SH-Gruppe, die leicht oxidiert werden kann. Dabei entsteht eine Verbindung von zwei NAC-Molekülen in Form einer Disulfidbrücke. NAC wirkt analog zum zelleigenen, erythrozytären Gluthation-Redox-System, indem es zum Abbau verschiedener ROS-Subtypen beiträgt. Es wurde NAC der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, USA) benutzt, welches in DMSO gelöster Form verwendet wurde.

2.2.6 p38-MAPKinase Inhibitoren

SB203580 [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole] (CAS No.: 152121-47-6) ist ein spezifischer Inhibitor der p38-MAP-Kinase (Young et al., 1997). Es wurden Substanzen der Firma ENZO life-science (Lörrach, Deutschland) und Tocris (Bristol, UK) verwendet und in DMSO gelöst.

2.2.7 Z-VAD-FMK Pan-Caspase-Inhibitor

Z-VAD-FMK (CAS No. 187389-52-2) ist ein zellwand-permeabler, unspezifischer Caspase-Inhibitor (Van Noorden, 2001). Es wurde Z-VAD-FMK der Firma Enzo (Lörrach, Germany) in DMSO gelöst verwendet.

2.2.8 DCFDA

Um zu bestimmen, ob unter den experimentellen Bedingungen ROS entstehen, wurde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCFDA) (CAS No.: 4091-99-0) der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, USA) verwendet. Das nicht-fluoreszierende DCFDA diffundiert in die Zellen und wird in Gegenwart von ROS zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert, welches bei einem maximalen Emissionsspektrum von 529 nm (entspricht dem FL-1-Kanal des Durchflusszytometers) fluoresziert. Somit kann es die Bildung von Hydroxyl-,

Peroxy- und andere ROS-Subtypen detektieren. DCFDA (in DMSO gelöst) wurde zur Messung mit Ringer-Lösung auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt.

2.2.9 CER Detection Kit

Zur Messung der CER-Expression wurde ein 1:10 in PBS + 1 % BSA-Lösung verdünnter CER-Antikörper (MID 15B4) der Firma Alexis (Grünberg, Deutschland) verwendet. Zur durchflusszytometrischen Detektion des CER-Antikörpers wurde ein FITC-konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG und -IgM spezifischer Sekundärantikörper der Firma BD Pharmingen (Hamburg, Deutschland) 1:50 in PBS + 1 % BSA-Lösung verwendet. Der CER-AK bindet spezifisch an CER, während der bei einem Emissionsmaximum von etwa 519 nm fluoreszierende Sekundärantikörper (entspricht dem FL-1-Kanal des Durchflusszytometers) gegen das Fc-Fragment des CER-Antikörpers gerichtet ist.

2.3 verwendete Lösungen

2.3.1 Ringer-Lösung

Um die Erythrozyten in einem ihrer physiologischen Umgebung möglichst nahekommenden Milieu zu untersuchen, wurde Ringer-Lösung als Basislösung verwendet. Diese verfügt über die gleiche Osmolarität, den selben pH-Wert und eine ähnliche Elektrolyt-Zusammensetzung wie das menschliche Blutplasma. Als Energielieferant für den zellulären Stoffwechsel wurden 5 mM Glukose beigefügt. Unter diesen Bedingungen zeigen die Erythrozyten auch nach > 48-stündiger Inkubation sehr wenig Eryptose bzw. Hämolyse. Die in Ringer-Lösung inkubierten Zellen wurden jeweils als Kontroll-Gruppen verwendet. Die Testsubstanzen wurden jeweils zu Beginn der Experimente den in Ringer-Lösung inkubierten Erythrozyten beigefügt. In der Tabelle 1 sind die genauen Bestandteile der Ringer-Lösung aufgeführt. Der pH-Wert von 7,4 wurde, anhand eines pH-Meters gemessen, durch Titration mit Natriumhydroxid-Lösung erreicht. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die Lösungen

mit Hilfe des Stericup-Filtersystems (Merck Millipore) gefiltert und bei +4 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung von 1 Liter Ringer-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g]
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1,2	0,296
HEPES	32,2	7,673
Glukose	5	0,901
CaCl ₂	1	0,11
NaOH	ca. 13,5 (titriert)	ca. 0,541 (titriert)
H ₂ O	-	980,82

2.3.2 Annexin-Wasch-Puffer

Zur Messung der PS-Expression auf der äußeren Erythrozyten-Membran wurde zur Verdünnung des verwendeten FITC-Annexin-V ein Annexin-Wasch-Puffer verwendet, der eine höhere Calciumkonzentration als die Ringer-Lösung aufweist, um die calciumabhängige Bildung von FITC-Annexin-V zu ermöglichen. Die Zusammensetzung ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung von 1 Liter Annexin-Wasch-Puffer

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g]
<i>NaCl</i>	125	7,305
<i>KCl</i>	5	0,373
<i>MgSO₄</i>	1,2	0,295
<i>HEPES</i>	32,2	7,673
<i>Glukose</i>	5	0,901
<i>CaCl₂</i>	5	0,55
<i>NaOH</i>	ca. 13,5 (titriert)	ca. 0,541 (titriert)
<i>H₂O</i>	-	980,82

2.3.3 Calciumfreie Lösung

Um die Erythrozyten frei von dem Einfluss extrazellulären Calciums zu untersuchen, wurde eine calciumfreie Ringer-Lösung mit der in Tabelle 3 aufgeführten Zusammensetzung verwendet. Wenn mit * gekennzeichnet, wurde zusätzlich 1 mM Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic-acid (EGTA) beigefügt, um freies Calcium zusätzlich zu komplexieren.

Tabelle 3: Zusammensetzung von 1 Liter calciumfreier Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g]
<i>NaCl</i>	125	7,305
<i>KCl</i>	5	0,373
<i>MgSO₄</i>	1,2	0,295
<i>HEPES</i>	32,2	7,673
<i>Glukose</i>	5	0,901
<i>EGTA*</i>	1*	0,380*
<i>NaOH</i>	ca. 13,5 (titriert)	ca. 0,541 (titriert)
<i>H₂O</i>	-	980,82

2.3.4 PBS-BSA-Lösung

In den CER-Experimenten wurde eine vorgefertigte phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline) der Firma Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA) verwendet. Die PBS-Lösung wurde mit 0,1 % Rinderserum-Albumin (BSA) der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, USA) (CAS:9048-46-8) versetzt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der PBS-BSA-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Konzentration [g/l]
<i>NaCl</i>	137,93	8
<i>KCl</i>	2,67	0,2
<i>Na₂HPO₄ - 7H₂O</i>	8,06	2,160
<i>KH₂PO₄</i>	1,47	0,2
<i>BSA</i>	0,015	1

2.3.5 Hyperosmolare Lösung und glukosefreie Lösung

Um den simultanen Effekt multipler Eryptose-Trigger auf die Zellen zu untersuchen wurden, wo angegeben, Experimente in hyperosmolarer bzw. glukosefreier Lösung durchgeführt (850 mosmol). Dazu wurden modifizierte Ringer-Lösungen angefertigt. Die genauen Zusammensetzungen sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung von 1 Liter hyperosmolarer Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g]
<i>NaCl</i>	125	7,305
<i>KCl</i>	5	0,373
<i>MgSO₄</i>	1,2	0,296
<i>HEPES</i>	32,2	7,673
<i>Glukose</i>	5	0,901
<i>CaCl₂</i>	1	0,11
<i>NaOH</i>	ca. 13,5 (titriert)	ca. 0,541 (titriert)
<i>Saccharose</i>	550	188,26
<i>H₂O</i>	-	794,8

Tabelle 6: Zusammensetzung von 1 Liter glukosefreier Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g]
<i>NaCl</i>	125	7,305
<i>KCl</i>	5	0,373
<i>MgSO₄</i>	1,2	0,296
<i>HEPES</i>	32,2	7,673
<i>CaCl₂</i>	1	0,11
<i>NaOH</i>	ca. 13,5 (titriert)	ca. 0,541 (titriert)
<i>H₂O</i>	-	983,7

2.4 Versuche

2.4.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Um die Wirkung der Testsubstanzen auf den suizidalen Erythrozytenzelltod (Eryptose) zu untersuchen, wurden verschiedene Messansätze *in vitro* hergestellt. Dazu wurden die aufbereiteten humanen Spendererythrozyten bei einem Hämatokrit von 0,4 % in Ringer-Lösung für 48 h bei 37 °C unter Lichtschutz inkubiert. Die Inkubation erfolgte jeweils in 1 ml Suspension in autoklavierten Eppendorf Cups. Die Hinzugabe der Testsubstanzen in den angegebenen Endkonzentrationen erfolgte jeweils beim Herstellen der Ansätze. Um die Zellen nach der Inkubation für die durchflusszytometrische Untersuchung vorzubereiten, wurden jeweils 50 µl der Erythrozytensuspension in 69-well-plates transferiert und bei 1200 rpm und 36 °C für 4 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen. Das so gewonnene Erythrozytensediment wurde unter den jeweils unten beschriebenen Bedingungen weiterbehandelt. Es wurden Kontroll-Gruppen mit analog behandelten Erythrozyten in Ringer-Lösung bzw. in Ringer-Lösung und 1 µM DMSO verwendet. Um eine verwertbare Messzahl [n] zu erreichen, wurden die Experimente an verschiedenen Tagen wiederholt. Eine Messreihe inklusive den Kontroll-Gruppen wurde jeweils mit Erythrozyten desselben Patienten durchgeführt, wobei für jede neue Messreihe jeweils das Blut eines anderen Patienten verwendet wurde. Alle Messreihen wurden mit den identischen Einstellungen des FACS-Gerätes gemessen. Die Eichung erfolgte an der jeweils ersten Kontrolle in Ringer-Lösung. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach den Angaben in 2.5.2. und die statistische Analyse nach Angaben in 2.7.

2.4.2 Messung der PS-Expression

Die nach 2.4.1 behandelten Erythrozyten wurden mit 150 µl FITC-Annexin-V in einer 1:200 Verdünnung in 5mM CaCl₂ beinhaltendem Annexin-Wasch-Puffer für 20 Minuten bei 36 °C unter Lichtschutz reinkubiert. Die Erythrozytensuspension wurde in FACS-Röhrchen transferiert und direkt der

FACS-Analyse zugeführt. Die FITC-Annexin-V-Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm mit einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL-1-Kanal bestimmt. Um eine Fehlmessung der FITC-Annexin-V-Fluoreszenz durch PS-Bindung an der inneren Membran der Erythrozyten bei stark hämolysierenden Zellen auszuschließen, erfolgte als Kontrolle die Messung der Hämolysenachdem in 2.6.2 dargestellten Protokoll. Die Auswertung und die statistische Analyse erfolgte nach den Angaben in 2.5.2. bzw. 2.7

2.4.3 Messung der Zellgröße

Als Parameter für die Zellgröße der Erythrozyten wurde durchflusszytometrisch das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward-scatter) im FSC-Kanal bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm bestimmt. Die Messung des FSC erfolgte an den analog zu 2.4.1 behandelten Zellen. Bei dieser Methode können keine absoluten Zahlen erhoben werden, weswegen Rückschlüsse auf die Zellgröße ausschließlich im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen möglich sind. Durch die Behandlung mit FITC-Annexin-V ist keine artifizielle Beeinflussung der Zellgröße zu erwarten, weswegen der FSC parallel zur Messung der FITC-Annexin-V-Fluoreszenz in einem Messdurchgang bestimmt wurde. Die Auswertung und die statistische Analyse erfolgte nach den Angaben in 2.5.2. bzw. 2.7

2.4.4 Messung des intrazellulären Calciums

Zur Bestimmung des intrazellulären Calciums wurden die selben Ansätze wie zur Messung der PS-Expression verwendet. Nach analoger Aufbereitung wurden die Zellen mit Fluo-3-AM beladen. 150 µl Fluo-3-AM-Lösung in einer Konzentration von 5 µM wurden hinzugegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 36 °C unter Lichtschutz reinkubiert. Die Zellen wurden mit 5 mM CaCl₂ beinhaltsendem Annexin-Wasch-Puffer gewaschen. Die Erythrozytensuspension wurde in FACS-Röhrchen transferiert und direkt der FACS-Analyse zugeführt. Hierzu wurde die Fluo-3-Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm mit einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL-1-Kanal bestimmt.

Die Auswertung und die statistische Analyse erfolgte nach den Angaben in 2.5.2. bzw. 2.7.

2.4.5 Messung der PS-Expression in calciumfreier Umgebung

Zur Messung der PS-Expression unter Entzug des extrazellulären Calciums wurden die Erythrozyten analog zu 2.4.1 in calciumfreier Lösung anstelle der Ringer-Lösung für 48 Stunden inkubiert. Danach wurde die FITC-Annexin-V-Fluoreszenz, wie an anderer Stelle beschrieben, bestimmt. Wenn mit * markiert wurde der calciumfreien Lösung zusätzlich EGTA zur Komplexbildung des noch vorhandenen freien Calciums beigefügt.

2.4.6 Messung der PS-Expression und der Zellgröße unter Einfluss zusätzlicher Stressoren

Zur Messung der PS-Expression und der Zellgröße unter zusätzlichem Einfluss anderer Stressoren bzw. dem Einfluss bekannter Trigger des suizidalen Erythrozytenzelltodes wurden die Erythrozyten analog zu 2.4.1 in hyperosmolarer Lösung bzw. glukosefreier Lösung anstelle der Ringer-Lösung für 6 Stunden (hyperosmolare Lösung) bzw. 48 Stunden (glukosefreie Lösung) inkubiert. Danach wurde die FITC-Annexin-V-Fluoreszenz bzw. der FSC wie an anderer Stelle beschrieben bestimmt.

2.4.7 CER-Bestimmung

Um die Bildung von CER in den Erythrozyten zu bestimmen, wurde ein Antikörper-basiertes Nachweisprotokoll benutzt. Die nach 2.4.1 behandelten Erythrozyten wurden nach 48-stündiger Inkubation mit 100 µl PBS-BSA-Lösung wieder resuspendiert. Der PBS-BSA-Lösung wurde ein CER-Antikörper (clone MID 15B4) im Verhältnis 1:10 beigesetzt und die Erythrozytensuspension für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, um die Antikörperbindung abzuwarten. Nach der Inkubation erfolgte das dreimalige Zentrifugieren und Waschen mit jeweils 150 µl PBS-BSA-Lösung, um den nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurden 50 µl PBS-BSA-Lösung mit dem FITC-konjugierten Ziege-Anti-Maus-IgG und -IgM spezifischen Sekundärantikörper im Verhältnis 1:50 versetzt. Die Erythrozytensuspension wurde erneut für 30 Minuten bei 37 °C

reinkubiert, um die Bindung des Sekundärantikörpers an das Fc-Fragment des bereits gebundenen CER- Antikörpers abzuwarten. Nach der Inkubation erfolgte ebenfalls das dreimalige Zentrifugieren und Waschen der Erythrozyten mit jeweils 150 µl PBS-BSA-Lösung, um den nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Die so vorbereiteten Erythrozyten wurden ebenfalls in FACS-Röhrchen transferiert und direkt der FACS-Analyse zugeführt. Die FITC-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm mit einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL-1-Kanal des FACSCalibur™ bestimmt. Die Auswertung und die statistische Analyse erfolgte nach den Angaben in 2.5.2. bzw. 2.7.

2.4.8 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die nach 2.4.1 behandelten Erythrozyten wurden nach 48-stündiger Inkubation mit 150 µl Ringer-Lösung, die DCFDA in einer Konzentration von 10 µM enthält, resuspendiert. Die Testerythrozyten wurden für 30 Minuten bei 37 °C unter Lichtschutz inkubiert, um die Diffusion des DCFDA in die Zellen und die nachfolgende Oxidation unter dem Einfluss neu entstandener ROS zu dem durchflusszytometrisch nachweisbaren DCF zu ermöglichen. Danach wurde die Erythrozytensuspension bei 1200 rpm und 36 °C für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben zweimalig mit physiologischer Ringer-Lösung gewaschen, in FACS-Röhrchen transferiert und direkt der durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die DCF-Fluoreszenz wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm mit einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL-1-Kanal des FACSCalibur™ bestimmt. Um eine Fehlmessung auszuschließen und um zu beurteilen, ob der durch ROS getriggerte Effekt auf den suizidalen Erythrozyten-Zelltod durch antioxidativen Schutz zumindest teilweise inhibiert werden kann, wurde bei positivem ROS-Nachweis zusätzlich eine erneute Messung der PS-Expression mit Hilfe der in 2.4.2 beschriebenen Methodik durchgeführt. Hierzu wurden Messungen unter dem Einfluss von NAC und ohne Zugabe von NAC durchgeführt. Dazu wurde zu Beginn der Experimente in den Testgruppen zusätzlich 1 mM des Antioxidans NAC hinzugefügt, um neu entstehende ROS zu eliminieren. Die

PS-Expression wurde dann mit den Kontroll-Gruppen und mit den nicht mit NAC behandelten Gruppen verglichen. Die Auswertung und die statistische Analyse erfolgte nach den Angaben in 2.5.2. bzw. 2.7

2.4.9 Messung der Aktivitäten von p38-MAPKinase und Caspasen

Um eine Stimulation der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38-MAPKinase) als möglichen Trigger der Eryptose zu untersuchen wurde, wo angegeben, vor der Inkubation zusätzlich der spezifische p38/SAPK-2-Inhibitor SB203580 in einer Konzentration von 2 μM hinzugegeben und danach die PS-Expression wie in 2.4.2 beschrieben gemessen. Gleiches gilt für den Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-FMK, der vor der Inkubation in einer Konzentration von 10 μM hinzugegeben wurde, um eine mögliche Stimulation der zellulären Caspasen zu untersuchen.

2.5 FACS-Analyse

2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein Messverfahren der Biologie und Medizin dar, welches die molekulare Charakterisierung und Vermessung von Zellen anhand deren Streu- und Fluoreszenzlicht ermöglicht. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf der Emission und Streuung optischer Signale durch die Zelle nachdem diese einen Laserstrahl passiert hat. Mit der Hilfe der Durchflusszytometrie können semiquantitative Aussagen über Form, Größe und Binnenstruktur der Zelle, sowie unter Hinzunahme von fluoreszierenden Molekülen und Antikörpern auch über Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine, zelluläre Peptide und DNA getroffen werden. Um einzelne Zellen untersuchen zu können wird eine Zellsuspension durch eine Kapillare gesaugt, deren Durchmesser nur das zeitgleiche Passieren einzelner Zellen ermöglicht. Die Zellen werden durch einen Hüllstrom innerhalb einer Zählkammer fokussiert. In der Durchflusszelle (flow cell) werden einzelne Zellen durch Laserlicht angeregt und deren Lichtsignale mit verschiedenen Detektoren ausgewertet. Dabei gibt es prinzipiell zwei verschiedene Detektionsprinzipien. Zum einen wird die Lichtstreuung bei Durchtritt der Zellen durch den Fokus des

Lasers in einem flachen Winkel zum Laserstrahl (Vorwärtsstreulicht; FSC) und in einem 90° Winkel zum Laserstrahl (Seitwärtsstreulicht; SSC) detektiert. Zum anderen werden im 90° Winkel Fluoreszenzsignale über weitere Detektoren aufgezeichnet, deren Emissionsspektren über Farbteilspiegel und Bandpassfilter aufgetrennt werden (nach aufsteigender Wellenlänge FL-1, FL-2, FL-3, FL-4). Die Signale werden grafisch dargestellt und können nach der Messung statistisch ausgewertet werden (Abb. 7).

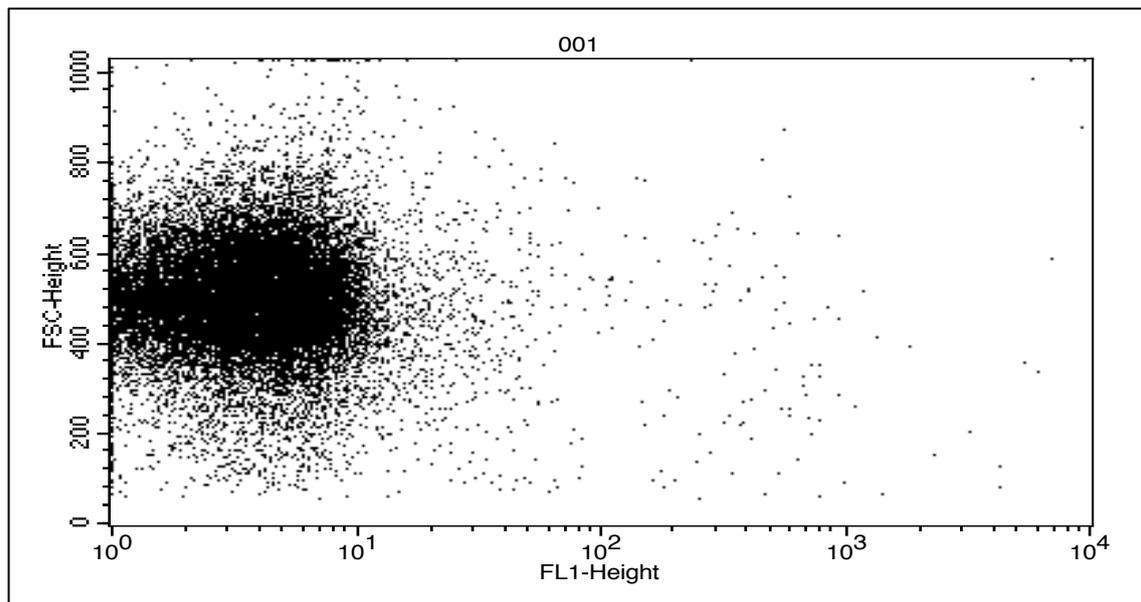


Abbildung 7 - BD CellQuest™ Dot-Plot. Die Abbildung zeigt die Signalintensität des FSC auf der y-Achse in linearer Darstellung und die Signalintensität des FL-1-Kanals auf der x-Achse in logarrhythmischer Darstellung.

Aus den so gewonnenen Daten lassen sich Rückschlüsse auf die einzelnen Zellen ableiten. Durch Messung großer Zellpopulationen in kurzer Zeit gelingt es, Aussagen über die gesamte Zellpopulation zu treffen. Durch den stabilen Messaufbau können durch Eichung und Kalibrierung von Fluoreszenz-Signalen auch quantitative Aussagen getroffen werden. Für alle Messungen wurde der Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson, New Jersey, USA benutzt. Dieser verfügt über einen Argon-488nm-Laser und einen Dioden-633nm-Laser sowie einen FSC-Detektor, einen SSC-Detektor und vier

Fluoreszenzdetektoren. Zur Auswertung der Rohdaten wurde die dazugehörige Analysesoftware BD-CellQuest™ verwendet.

2.5.2 Auswertung der Messungen

Um eine valide Aussage über die gesamte Zellpopulation ableiten zu können wurden pro Messung 50.000 Zellen bei einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von ca. 2000 Zellen/sec ausgewertet. Dabei wurde das Vorwärtsstreulicht im FSC-Kanal und die Fluoreszenzintensität im FL-1-Kanal mit einem 530/30 Bandpass-Filter ermittelt.

Die FSC-Signalintensität ist von der Größe der Zelle, die den Laserstrahl kreuzt abhängig und verhält sich daher in etwa proportional zum Zellvolumen. Im Gegensatz zum Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC), welches sich ebenfalls proportional zur Zellgröße verhält, ist der FSC weniger von der Granularität und der Binnenstruktur der Zelle abhängig, weswegen es sich besser zur reinen Zellvolumenbestimmung eignet. Zur statistischen Auswertung wurde das geometrische Mittel der Messwerte verwendet. Die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Färbungen wurde im FL-1-Kanal detektiert. Bei der Auswertung der FITC-Annexin-V-Fluoreszenzintensität wurden in den Histogrammen ein *cut-off* für PS-positive Zellen grafisch festgelegt. Hierzu wurde ein Bereich direkt oberhalb des Bereiches welcher die Intensitätslevel des Kontrollansatzes abbildet gewählt um danach der Anteil positiv markierter Zellen unter der Gesamtpopulation zu berechnen. In den restlichen Färbungen wurde das geometrische Mittel der Messwerte verwendet. Die Auswertung erfolgte mit BD CellQuest™ Pro (BD, Bioscience) und Flowing-Software (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Finnland).

2.6 Photometrische Hämolyse-Bestimmung

2.6.1 Erstellung einer Hämolyse-Eichkurve

Um den Grad der Hämolyse bestimmen zu können wurde jeweils eine Eichkurve erstellt. Es wurden die selben Erythrozyten wie in den Durchflusszytometrie-Experimenten verwendet. Die frischen Spendererythrozyten wurden bei einem Hämatokrit von 0,4 % in destilliertem

Wasser hämolysiert. Die durch den osmotischen Druck herbeigeführte Hämolyse wurde als Referenz für die vollständige Hämolyse verwendet. Nach 48 h Inkubation bei 36 °C unter Lichtschutz wurden die restlichen zellulären Bestandteile abzentrifugiert. Der die Blutfarbstoffe beinhaltende Überstand wurde benutzt, um eine definierte Verdünnungsreihe anzufertigen. Die Analyse der einzelnen Proben erfolgte mithilfe des Spektrophotometers PowerWave™ XS2 der Firma BioTek (Winooski, USA). Die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt und es wurde eine lineare Regression in Excel durchgeführt. Als Kriterium wurde ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 95% festgelegt. Mithilfe der so ermittelten Regressionsgeraden wurde die Hämolyse wie in 2.6.2 beschrieben gemessen.

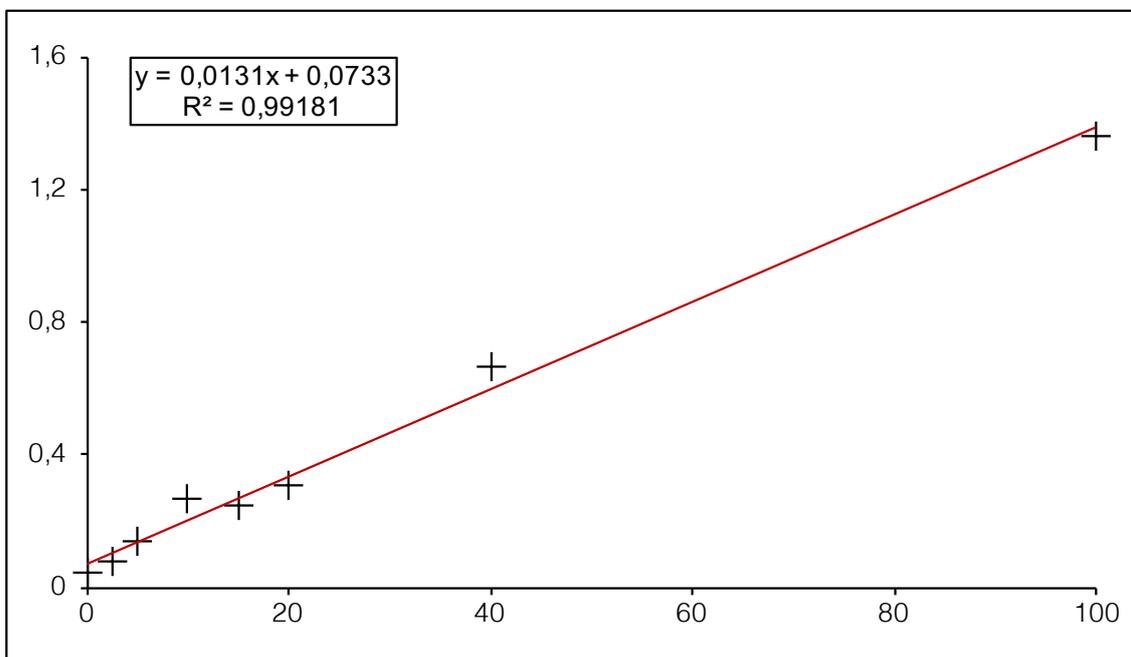


Abbildung 8 - Beispiel einer Eichkurve zur Bestimmung der Hämolyse

2.6.2 Messung der Hämolyse

Zur Messung der Hämolyse wurden die selben experimentellen Ansätze wie in 2.4.1. beschrieben verwendet. Als Kontrollgruppen wurden wieder Erythrozyten in Ringer-Lösung bzw. Ringer-Lösung mit 1 µl DMSO verwendet. Die zellulären Bestandteile wurden nach der 48-stündigen Inkubation bei 1600 rpm für 3 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig

abpipettiert und photometrisch bei 405 nm gemessen. Aus den Ergebnissen wurde mit Hilfe der aus der Eichkurve bestimmten Regressionsgeraden der Hämolysegrad bestimmt. Bei den Versuchen mit NZA wurde aufgrund der Verfälschung der Ergebnisse durch den Farbstoff der Substanz und deren Absorption die Differenz zwischen den Proben mit NZA allein nach 48 h und den Proben mit Erythrozyten und NZA gemessen und die Hämolyse anhand der Differenz bestimmt. Es wurden jeweils die selben Erythrozyten verwendet die zur Erstellung der Eichkurve verwendet wurden. Der Hämolysegrad wurde in [%] angegeben. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung wurden in Excel graphisch dargestellt. Die so gewonnenen Daten wurden mit den Ergebnissen der Zytometer-Daten verglichen.

2.7 Statistische Aufarbeitung

Zur statistischen Bewertung der erhobenen Daten wurden jeweils der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler in Excel berechnet und die Daten in Balkendiagrammen visualisiert. Es wurden jeweils die Daten der kompletten Messreihen zur statistischen Analyse herangezogen, ohne die Zuhilfenahme von Ein- oder Ausschlusskriterien. Als statistischer Test diente für die Analyse multipler Gruppen (> 2) der ANOVA (Analysis of variance) one way tukey. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als signifikant festgelegt. Als Signifikanztest zur Beurteilung von zwei Gruppen untereinander wurde der student two-tailed t-test verwendet. Jeder statistische Test wurde einmalig nach Abschluss der Messreihen durchgeführt. Als Statistiksoftware wurde GraphPad-Prism der Fima GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA) verwendet. Die Signifikanzlevels sind, wenn nicht anders angegeben, wie folgt in den Grafiken dargestellt: **** = ($p < 0,0001$), *** = ($p < 0,001$), ** = ($p < 0,01$), * = ($p < 0,05$) bzw. ##### = ($p < 0,0001$), ### = ($p < 0,001$), ## = ($p < 0,01$), # = ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Suizidaler Erythrozyten-Zelltod durch Nitazoxanid (NZA)

3.1.1 Effekt von NZA auf die PS-Expression

Um den Einfluss einer Exposition gegenüber NZA auf die PS-Expression auf der äußeren Erythrozytenmembran zu messen, wurden verschiedene Konzentrationen von NZA zu den Ansätzen gegeben. Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigt sich schon nach Zugabe von 1 µg/ml NZA und 48-stündiger Inkubation ein Anstieg der FITC-Annexin-V-bindenden und somit PS-positiven Zellen gegenüber der Kontroll-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied wird ab einer Konzentration von 10 µg/ml NZA und 48-stündiger Inkubation erreicht. Das Original-Histogramm zeigt den Unterschied der Kontroll-Gruppe gegenüber NZA exponierter Zellen (50 µg/ml NZA).

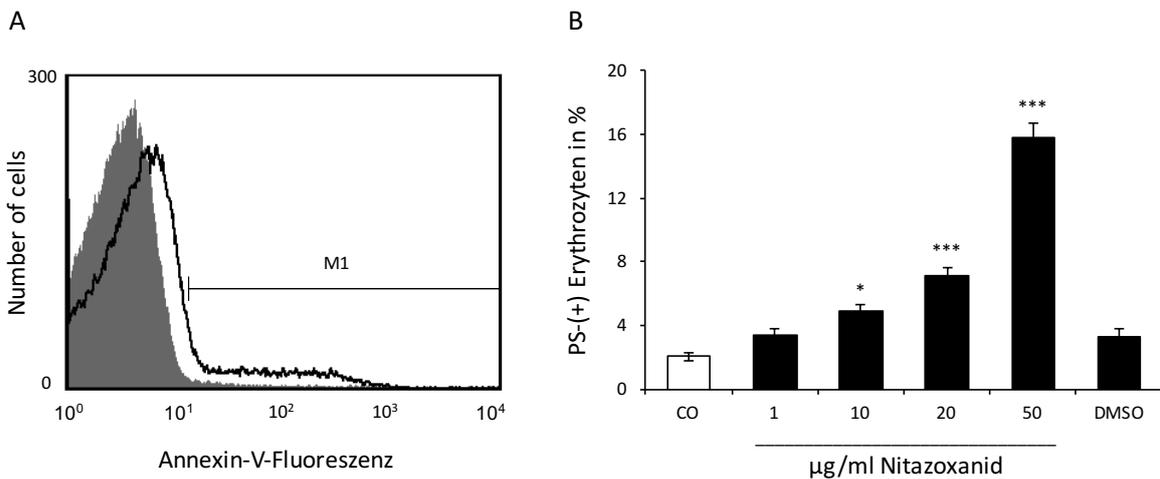


Abbildung 9 - Effekt von NZA auf die PS-Expression. [A] Original-Histogramm FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von NZA (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 µg/ml NZA (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n=9) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 – 50 µg/ml NZA bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken). *** = (p < 0,001), * = (p < 0,05) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014b)

Zellen, deren FITC-Annexin-V-Fluoreszenzintensität innerhalb des mit M1 angegebenen Bereiches fallen werden als PS-positiv gezählt und deren Anteil an der Gesamtpopulation der gemessenen Zellen (50.000) in % berechnet. Dabei ist zu beachten, dass ein geringer Anteil der Erythrozyten in der Kontrollgruppe nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ebenfalls PS-positiv ist. Um eine Expression von PS durch Verunreinigung oder andere Stressoren auszuschließen, wurden nur Messungen akzeptiert, bei denen die Kontroll-Gruppen einen vernachlässigbar kleinen Anteil PS-positiver Zellen (< 3 %) besitzen. Aus den in Abbildung 9 dargestellten Daten ist zudem eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der NZA-Konzentration und dem Anteil PS-positiver Zellen zu erkennen. Zum Ausschluss einer Beeinflussung durch das Lösungsmittel DMSO wurde jeweils eine Kontrolle mit 1 µg/ml DMSO alleine durchgeführt. Alle Messansätze mit Ausnahme der Ringer Kontrolle enthalten DMSO in einer Konzentration von 1 µg/ml. Die Mittelwerte +/- SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 9 in der Kontrollgruppe bei 2,03 +/- 0,29 %, nach Exposition von 1 µg/ml NZA bei 3,36 +/- 0,43 %, von 10 µg/ml NZA bei 4,87 +/- 0,47 %, von 20 µg/ml NZA bei 7,08 +/- 0,59 % und von 50 µg/ml NZA bei 15,76 +/- 0,98 % sowie bei 3,29 +/- 0,48 % nach Exposition gegenüber 1 µg/ml DMSO alleine.

3.1.2 Effekt von NZA auf die Zellgröße

Die Zellgröße der untersuchten Zellen wurde über die Intensität des Vorwärtsstreulichtes bestimmt. Nach 48-stündiger Exposition der Zellen gegenüber NZA bzw. DMSO, zeigt sich ab einer Konzentration von 10 µg/ml NZA ein signifikanter Abfall des FSC (Abbildung 10). Das Originalhistogramm zeigt die Verschiebung der FSC-Intensität hin zu geringeren Werten unter Einfluss von 50 µg/ml NZA in Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die Mittelwerte +/- SEM des geometrischen Mittels der Signalintensitäten lagen bei einer Gruppengröße von n = 9 in der Kontrollgruppe bei 473,55 +/- 2,24, nach Exposition gegenüber 1 µg/ml NZA bei 467,4 +/- 3,23, gegenüber 10 µg/ml bei 436,16 +/- 5,84 , gegenüber 20 µg/ml bei 417,71 +/- 4,61 und gegenüber 50 µg/ml bei 394,03 +/- 4,49 sowie bei 479,78 +/- 5,92 nach Exposition gegenüber

1 µg/ml DMSO alleine. Der FSC-Abfall zeigt ebenfalls eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die so gewonnenen Werte zeigen eine Veränderung des durchschnittlichen Zellvolumens an. Eine quantitative Bestimmung der Zellen, welche ihr Volumen ändern ist mit der durchgeführten Methode nicht möglich. Die Verringerung der Zellgröße ist ebenfalls ein charakteristisches Merkmal des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes. Die Messung der Zellgröße im FSC-Kanal erfolgt parallel zur Messung der PS-Externalisierung im FL-1-Kanal.

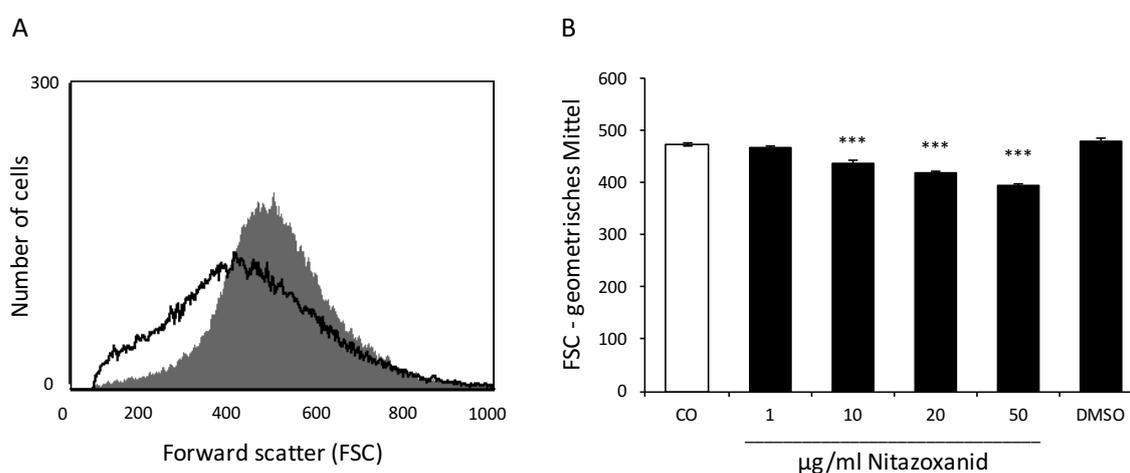


Abbildung 10 - Effekt von NZA auf das Vorwärtsstreulicht. [A] Original-Histogramm des FSC nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von NZA (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 µg/ml NZA (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n=9) des FSC (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 – 50 µg/ml NZA bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014b)

3.1.3 Effekt von NZA auf die intrazelluläre Calciumkonzentration

Um die Änderung der Konzentration des intrazellulären Calciums zu messen wurden Experimente mit Fluo-3-AM durchgeführt. Dabei zeigt sich nach 48-stündiger Inkubation kein signifikanter Unterschied zwischen den Experimental-Gruppen und der Kontroll-Gruppe. Das Original-Histogramm zeigt eine gleichbleibende Intensität der Fluoreszenz (Abbildung 11). Die Mittelwerte und SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 9 in der Kontroll-Gruppe bei 19,97 +/- 0,12, nach Exposition gegenüber 1 µg/ml NZA bei 20,07 +/- 0,32, gegenüber 10 µg/ml NZA bei 18,32 +/- 0,36, gegenüber 20 µg/ml NZA bei 18,26 +/- 0,36,

gegenüber 50 $\mu\text{g/ml}$ NZA bei $18,82 \pm 0,48$ sowie bei $20,76 \pm 0,31$ nach Exposition gegenüber 1 $\mu\text{g/ml}$ DMSO alleine.

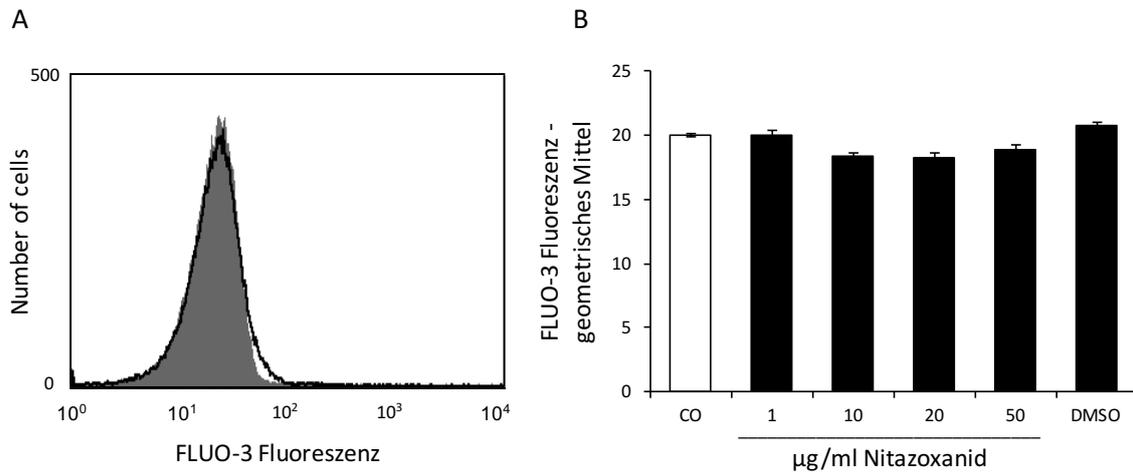


Abbildung 11 - Effekt von NZA auf die Fluo-3-Fluoreszenz. [A] Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von NZA (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 $\mu\text{g/ml}$ NZA (schwarze Linie) [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM ($n = 9$) der Fluo-3-Fluoreszenz (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 - 50 $\mu\text{g/ml}$ NZA bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ DMSO (schwarze Balken).

Die Experimente zeigen, dass die PS-Externalisierung und Zellschrumpfung nicht von einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration begleitet sind. Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Aktivität ist einer der bekannten Stimulatoren der Eryptose. Er führt letztendlich zum Zusammenbruch der PS-Asymmetrie und über die Öffnung calciumabhängiger Kaliumkanäle zum Kaliumaustritt aus der Zelle. Dies hat eine Hyperpolarisation der Erythrozytenmembran zur Folge, was zum weiteren Austritt von Kalium- und Chlorid-Ionen führt was einen osmotisch bedingten Wasseraustritt mit sich führt. Um die Rolle des intrazellulären Calciums bei den beobachteten Ergebnissen besser zu verstehen, wurden zusätzliche Experimente in calciumfreier Lösung durchgeführt.

Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der PS-positiven Zellen unter Calcium-Entzug gegenüber den Messungen in calciumhaltiger Umgebung. Zusätzlich wurden Experimente mit 1 mM EGTA durchgeführt mit dem Ziel, das

verbleibende Calcium zu komplexieren um somit feststellen zu können, ob sich der Effekt auf die PS-Externalisierung durch NZA vollständig aufheben lässt (Abbildung 12). Hierunter zeigte sich immer noch eine signifikante Erhöhung der PS-Expression von 6,32 +/- 0,684 % [Kontrolle 0,8 +/- 0,17 %] gegenüber 10,9 +/- 0,3 % [Kontrolle: 1,15 +/- 0,07 %] in 5 mM calciumhaltiger Ringer-Lösung (n = 5).

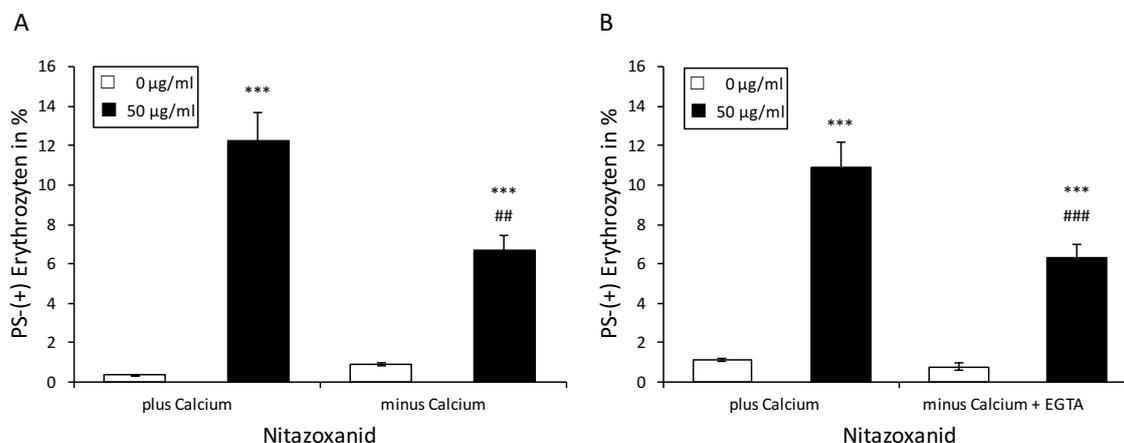


Abbildung 12 - Effekt von NZA auf die PS-Expression in calciumfreier Umgebung. [A] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n=5) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (linke Balken) und in calciumfreier Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (rechte Balken). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (linke Balken) und in calciumfreier Lösung mit 1 mM EGTA mit und ohne 50 µg/ml NZA (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an. ### = (p < 0,001), ## = (p < 0,01) zeigt einen signifikanten Unterschied zum Vorhandensein von Calcium an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014b)

Die Experimente zeigen eine Abhängigkeit der PS-Expression von der extrazellulären Calciumkonzentration, obwohl sich keine signifikante Veränderung des intrazellulären Calciums unter NZA nachweisen lässt. Die durch NZA ausgelöste PS-Externalisierung konnte durch Calciumentzug vermindert, nicht aber ganz aufgehoben werden. Abbildung 13 zeigt Originalhistogramme der Messungen der FITC-Annexin-V-Fluoreszenzintensität in calciumfreier Lösung mit 1 mM EGTA. Die Ergebnisse der Messungen mit calciumfreier Lösung legen eine Involvierung weiterer Signalwege des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes nahe.

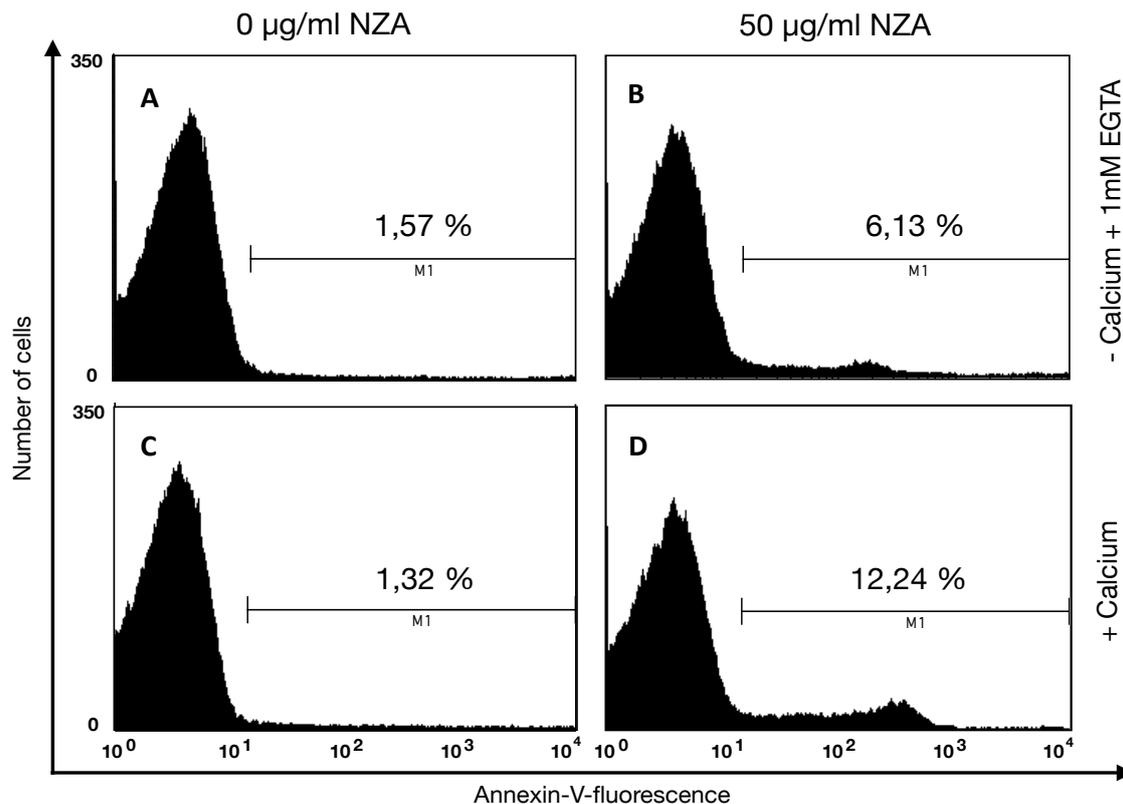


Abbildung 13 – Histogramme des Effekts von NZA auf die PS-Expression in calciumfreier Umgebung. Original-Histogramm der FITC-Annexin-V-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in calciumfreier Lösung mit 1 mM EGTA ohne Zugabe von NZA [A] und nach Zugabe von 50 µg/ml NZA [B] und nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von NZA [C] und nach Zugabe von 50 µg/ml NZA [D]

3.1.4 Effekt von NZA auf die Bildung von CER

Als einen weiteren Mechanismus für den beobachteten Effekt von NZA kommt die Bildung von endogenem CER in Betracht. Die Experimente zum Nachweis einer gesteigerten Bildung von endogenem CER beruhen auf einem Fluoreszenz-Antikörpernachweis. Hier zeigte sich nach der Exposition von 50 µg/ml NZA nach 48 Stunden ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals durch den Anti-CER-Antikörper, was auf eine Steigerung der intrazellulären CER-Konzentration schließen lässt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Das Original-Histogramm zeigt einen Anstieg der durchschnittlichen, konzentrationsabhängigen Fluoreszenz-Intensität nach Exposition gegenüber 50 µg/ml NZA.

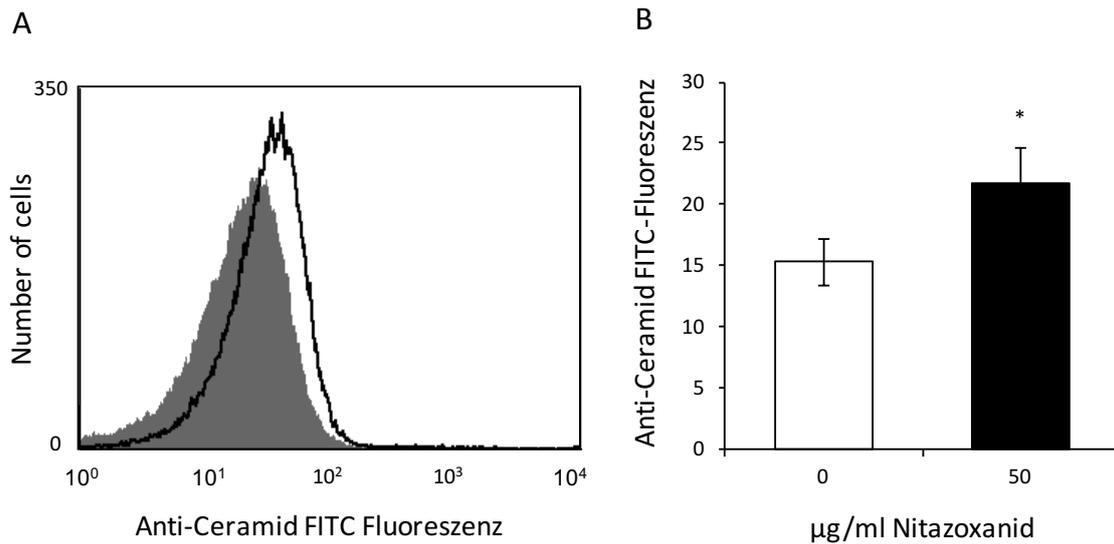


Abbildung 14 - Effekt von NZA auf die Bildung von CER. [A] Original-Histogramm der FITC-Anti-CER-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von NZA (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 µg/ml NZA (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 5) der FITC-Anti-CER-Fluoreszenz (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne NZA (weißer Balken) und in Anwesenheit von 50 µg/ml NZA (schwarzer Balken). * = (p < 0,1) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (two-tailed t-test). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014b)

Die Mittelwerte und SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 5 in der Kontroll-Gruppe bei 15,27 +/- 1,95, nach Exposition von 50 µg/ml NZA bei 21,78 +/- 2,9. Die Experimente legen nahe, dass der Effekt von NZA auf die Erythrozyten zumindest teilweise auf die Neubildung von CER zurückzuführen ist. CER gehört zu den bekannten Stimulatoren der Eryptose. Die Beeinflussung des CER-Metabolismus durch NZA stellt einen neuen, bisher weder in Erythrozyten noch in kernhaltigen Zellen beschriebenen Effekt der Substanz dar.

3.1.5 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Aktivierung von Caspasen durch NZA

Neben der Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentration und des CER-Metabolismus spielt auch oxidativer Stress eine Rolle in der Vermittlung des suizidalen Erythrozyten-Zelltods. Oxidativer Stress aktiviert nicht-selektive Kationenkanäle. Darüber hinaus aktiviert er wahrscheinlich auch Caspasen. Auch die Aktivierung von Caspasen könnte zur verstärkten PS-Externalisierung

durch NZA beitragen. Um das zu untersuchen wurden Experimente unter antioxidativem Schutz mit Hilfe von NAC (1 mM) und mit dem Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (10 μ M) durchgeführt. Hier zeigt sich keine signifikante Beeinflussung der PS-Externalisierung durch die zugegebenen Substanzen. Sowohl unter antioxidativem Schutz als auch unter Blockierung der Caspasen zeigt sich eine signifikante Erhöhung PS-positiver Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 50 μ g/ml NZA. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Untersuchungen legen nahe, dass der Effekt von NZA nicht über oxidativen Stress bzw. die Aktivierung von Caspasen vermittelt wird.

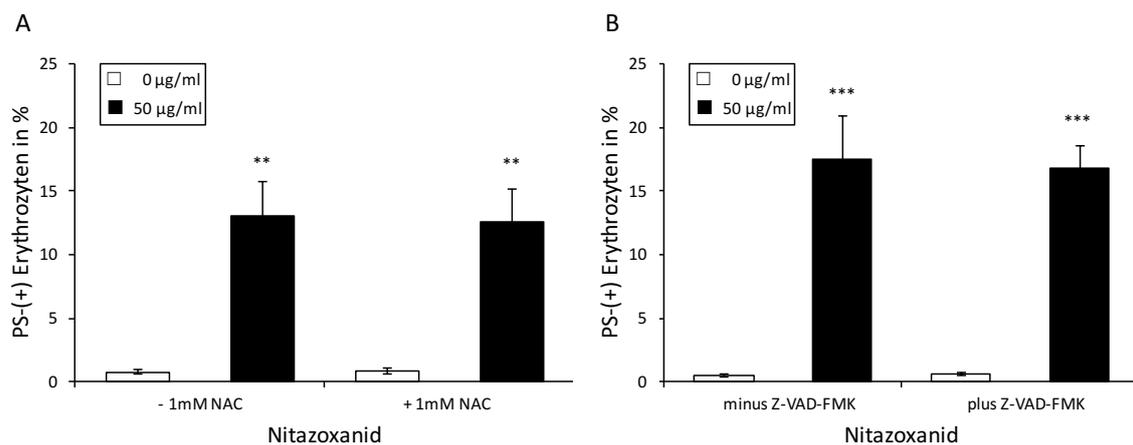


Abbildung 15 - Effekt von NZA auf die PS-Expression in Anwesenheit von NAC und des Pancaspase-Inhibitors Z-VAD-FMK. [A] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Zellen in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 μ g/ml NZA (linke Balken) und in Anwesenheit von 1 mM NAC mit und ohne 50 μ g/ml NZA (rechte Balken). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Zellen in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 μ g/ml NZA (linke Balken) und in Anwesenheit von 10 μ M Z-VAD-FMK mit und ohne 50 μ g/ml NZA (rechte Balken). ** = ($p < 0,01$), *** = ($p < 0,001$) zeigt einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Gruppe ohne NZA an (ANOVA).

3.1.6 Effekt von NZA in Zusammenhang mit zusätzlichen Stressoren

Um die Auswirkung von NZA auf die Zelle simultan zu anderen bekannten zellulären Stressoren zu untersuchen, wurden Experimente in hyperosmolarer Lösung und unter Entzug von Glukose durchgeführt.

3.1.6.1 Einfluss von osmotischem Stress auf den Effekt von NZA und Untersuchung der Aktivierung der p38-MAPKinase

Abbildung 16 zeigt den Effekt von NZA auf die PS-Externalisierung und Zellgröße in hyperosmolarer Lösung (880 mosmol) nach 6-stündiger Inkubation.

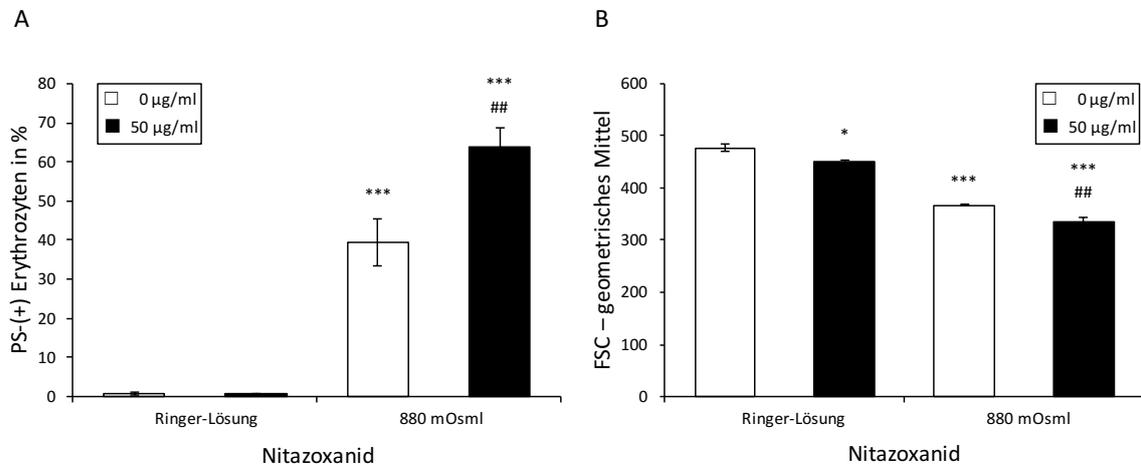


Abbildung 16 - Effekt von NZA auf die PS-Expression und das Vorwärtsstreuung in hyperosmolarer Lösung [A] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 6-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (linke Balken) und hyperosmolarer Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (rechte Balken) [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) des FSC (geometrisches Mittel) nach 6-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (linke Balken) und hyperosmolarer Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (rechte Balken). * = (p < 0,1), *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an. ## = (p < 0,01) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne 50 µg/ml NZA in hyperosmolarer Lösung an (ANOVA).

Die Mittelwerte und SEM der PS-Expression lagen bei einer Gruppengröße von n = 4 in der in Ringer-Lösung inkubierten Gruppe bei 0,84 +/- 0,26 %, nach Exposition von 50 µg/ml NZA bei 0,66 +/- 0,08 % und in der in hyperosmolarer Lösung inkubierten Gruppe bei 39,34 +/- 5,92 %, nach Exposition von 50 µg/ml NZA bei 63,64 +/- 5,21 %. Osmotischer Stress aktiviert nicht-selektive Kationenkanäle und führt zur Aktivierung der p38-MAPKinase, die bei der Vermittlung der Eryptose ebenfalls involviert ist. Osmotische Zellschrumpfung führt zur Bildung von PAF. PAF wiederum stimuliert die CER-Bildung. Die Untersuchungen zeigen, dass NZA nach 6-stündiger Inkubation noch keinen Einfluss auf die PS-Externalisierung in Erythrozyten hat. Dies deutet daraufhin, dass der Effekt abhängig von der Expositionszeit ist. Es zeigt sich allerdings

eine signifikante Steigerung der PS-Externalisierung unter osmotischem Stress durch zusätzliche Exposition gegenüber NZA auch schon nach 6-stündiger Inkubation. Dieser Unterschied könnte durch eine simultane Stimulation der CER-Bildung erklärt werden. Für den FSC lagen die Werte bei den in Ringer-Lösung inkubierten Zellen in der Kontroll-Gruppe bei 476,16 +/- 6,81, nach Exposition von 50 µg/ml NZA bei 450,16 +/- 4,17 und bei den in hyperosmolarer Lösung inkubierten Zellen in der Kontroll-Gruppe bei 367,05 +/- 1,50, nach Exposition von 50 µg/ml NZA bei 334,28 +/- 8,22. Hier zeigt sich nach 6-stündiger Inkubation bereits ein signifikanter Abfall der Zellgröße nach Exposition von 50 µg/ml NZA. Auch hier zeigt sich eine Effektverstärkung bei simultaner Exposition gegenüber osmotischem Stress und NZA. Um zu untersuchen, ob es sich bei der in hyperosmolarer Lösung beobachtbaren Effektverstärkung um die simultane Aktivierung der p38-MAPKinase durch NZA handelt, wurden zusätzliche Experimente mit dem p38-MAPKinase-Inhibitor SB203580 (2 µM) durchgeführt (Abbildung 17).

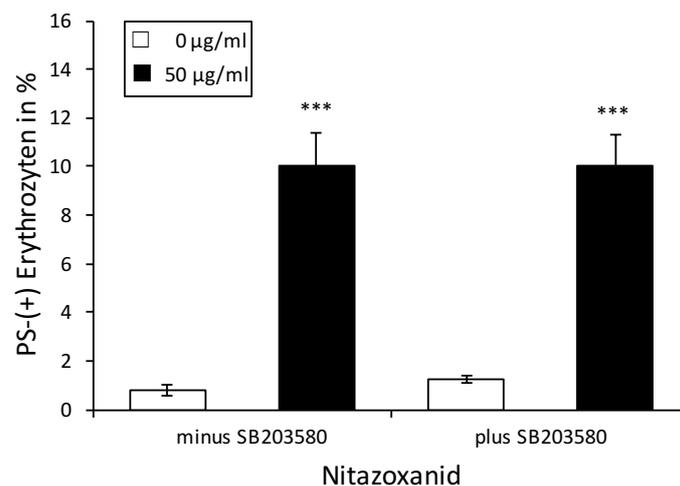


Abbildung 17 - Effekt von NZA auf die PS-Expression in Anwesenheit des p38-MAPKinase-Inhibitors SB203580. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 8) FITC-Annexin-V positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA ohne (linke Balken) und in Anwesenheit von 2 µM SB203580 mit und ohne 50 µg/ml NZA (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontroll-Gruppe ohne NZA an (ANOVA).

Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden, somit kann eine parallele Aktivierung der p38-MAPKinase ausgeschlossen werden.

3.1.6.2 Einfluss von Energieentzug auf den Effekt von NZA

In den Experimenten in glukosefreier Lösung zeigte sich eine signifikante Verstärkung der PS-Expression in Gegenwart von 50 µg/ml NZA unter dem zusätzlichen Stressfaktor des zellulären Energieentzugs (Abbildung 18).

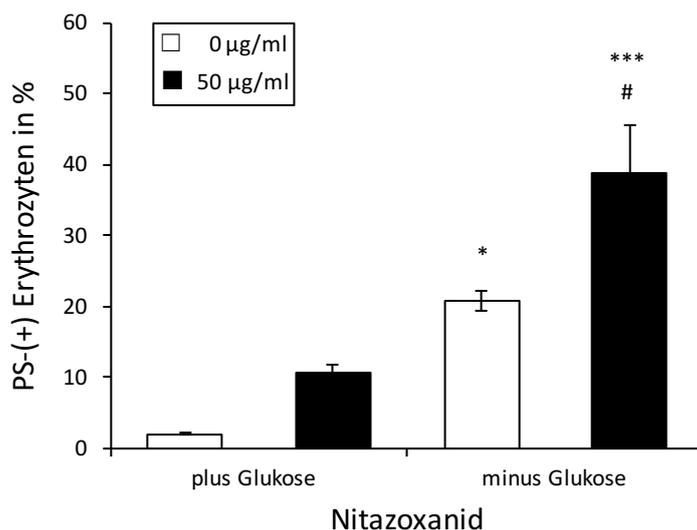


Abbildung 18 - Effekt von Energieentzug in glukosefreier Lösung. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n=4) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % in Ringer-Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (linke Balken) und in glukosefreier Lösung mit und ohne 50 µg/ml NZA (rechte Balken). * = (p < 0,5), *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an. # = (p < 0,5) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne 50 µg/ml NZA in glukosefreier Lösung an (ANOVA).

Die PS-positiven Zellen erreichten einen Anteil von 1,96 +/- 0,15 % ohne und 10,49 +/- 1,32 % mit 50 µg/ml NZA in der Kontrollgruppe, und einen Anteil von 20,71 +/- 1,49 % ohne und 38,84 +/- 6,76 % mit 50 µg/ml NZA in der Gruppe in glukosefreier Lösung.

3.1.7 Hämolyse durch NZA

Um den Hämolyse-Grad der Zellen in Gegenwart von NZA zu untersuchen wurde mit Hilfe einer Eichkurve der Hämoglobinkonzentrationen der Hämolyse-Grad photometrisch bestimmt. Abbildung 19 zeigt den Hämolyse-Grad anhand

der Hämoglobinkonzentrationen im Überstand nach 48 h Inkubation im Vergleich zum Anteil PS-positiver Zellen. Die Experimente zeigen, dass eine signifikant erhöhte Hämolyse der Zellen erst bei höheren NZA-Konzentrationen im Vergleich zu den PS-Experimenten entsteht (20 µg/ml NZA). Weiter ist der Anteil hämolysierter Zellen bei gleichen Konzentrationen von NZA geringer als der Anteil PS-positiver Zellen. Die Messung der Hämolyse zeigt ebenfalls eine positive Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Mittelwerte und SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 5 in der Kontrollgruppe bei 1,01 +/- 0,06 %, nach Exposition von 1 µg/ml NZA bei 1,41 +/- 0,14 %, von 10 µg/ml NZA bei 1,38 +/- 0,09 %, von 20 µg/ml NZA bei 1,97 +/- 0,12 % und von 50 µg/ml NZA bei 4,94 +/- 0,24 % sowie bei 1,26 +/- 0,1 % nach Exposition gegenüber 1 µg/ml DMSO alleine.

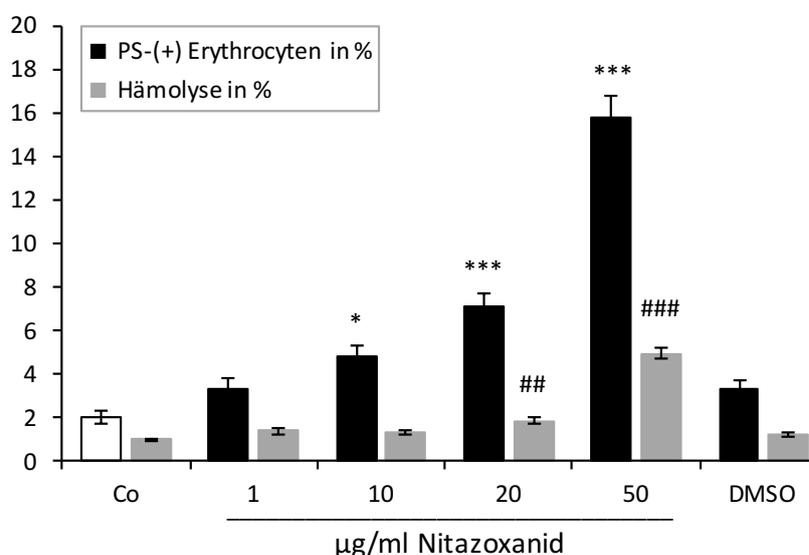


Abbildung 19 - Hämolyse durch NZA. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM des Hämoglobingehaltes (in % des Hämoglobingehaltes nach vollständiger Hämolyse) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung und nach Zugabe von 1 – 50 µg/ml NZA bzw. 1 µg/ml DMSO (graue Balken) (n = 5) und Prozentsatz FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 – 50 µg/ml NZA bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken) (n = 9). ### = (p < 0,001), ## = (p < 0,01), # = (p < 0,05), *** = (p < 0,001), * = (p < 0,05) zeigt einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrollgruppe an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014b)

3.1.8 Effekt von TIZ auf Erythrozyten

NZA wird *in vivo* schnell in den aktiven Metaboliten TIZ umgewandelt. Zur Untersuchung ob eine Exposition gegenüber dem Metaboliten TIZ zu den gleichen Veränderungen wie eine Exposition gegenüber NZA führt, wurden zusätzliche Experimente mit TIZ durchgeführt. Abbildung 20 zeigt, dass eine statistisch signifikante Erhöhung der FITC-Annexin-V-positiven Zellen ab einer Konzentration von 20 µg/ml TIZ erreicht wird. Das Original-Histogramm zeigt den Effekt von TIZ auf die Annexin-V-Fluoreszenz nach 48-stündiger Exposition in Ringer-Lösung. Auch bei TIZ zeigt sich eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung analog zu den Daten mit NZA.

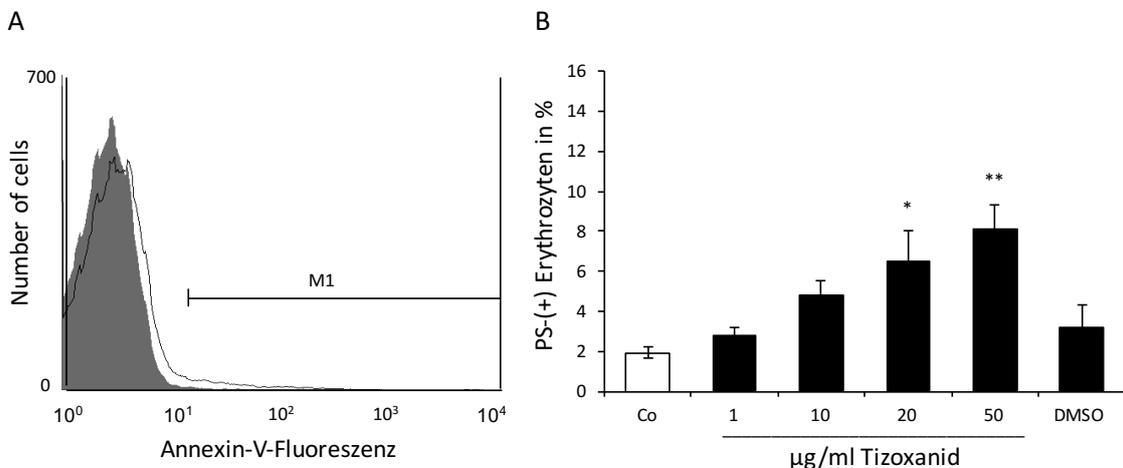


Abbildung 20 - Effekt von TIZ auf die PS-Expression. [A] Original-Histogramm der FITC-Annexin-V-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von TIZ (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 µg/ml TIZ (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 – 50 µg/ml TIZ bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarzer Balken). ** = (p < 0,01), * = (p < 0,05) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA).

Die Mittelwerte und SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 4 in der Kontrollgruppe bei 1,92 +/- 0,27 %, nach Exposition von 1 µg/ml TIZ bei 2,76 +/- 0,43 %, von 10 µg/ml TIZ bei 4,78 +/- 0,78 %, von 20 µg/ml TIZ bei 6,50 +/- 1,54 % und von 50 µg/ml TIZ bei 8,12 +/- 1,54 % sowie bei 3,20 +/- 1,40 % nach Exposition gegenüber 1 µg/ml DMSO alleine. Abbildung 21 zeigt die Veränderung des Vorwärtsstreuungswertes. Auch hier zeigt sich eine

dosisabhängige Abnahme des FSC im Sinne einer Zellschrumpfung nach Exposition gegenüber TIZ. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einer Gruppengröße von $n = 4$ nicht erreicht. Abbildung 22 zeigt die Veränderungen des intrazellulären Calciums nach Messungen mit Fluo-3-AM.

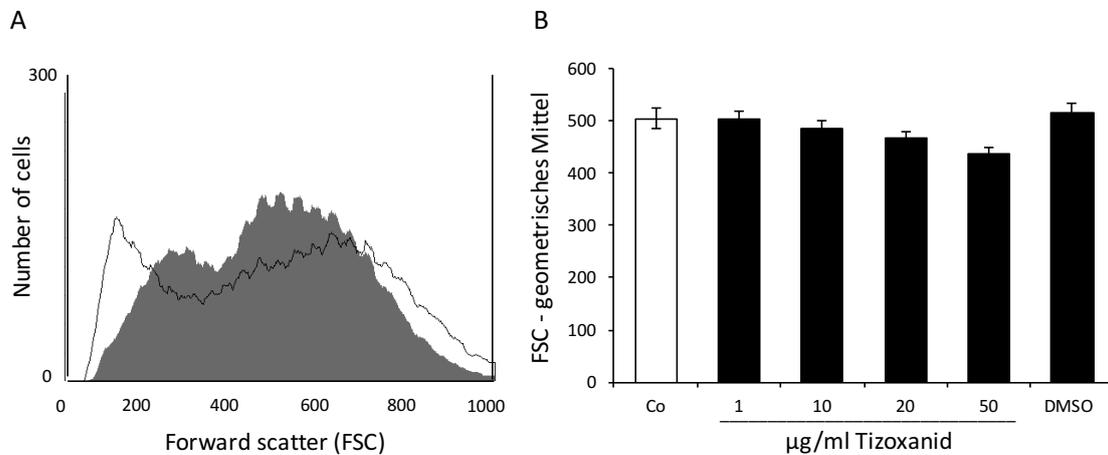


Abbildung 21 - Effekt von TIZ auf das Vorwärtsstreulicht. [A] Original-Histogramm des FSC nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von TIZ (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 µg/ml TIZ (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM ($n = 4$) des FSC (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 – 50 µg/ml TIZ bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken).

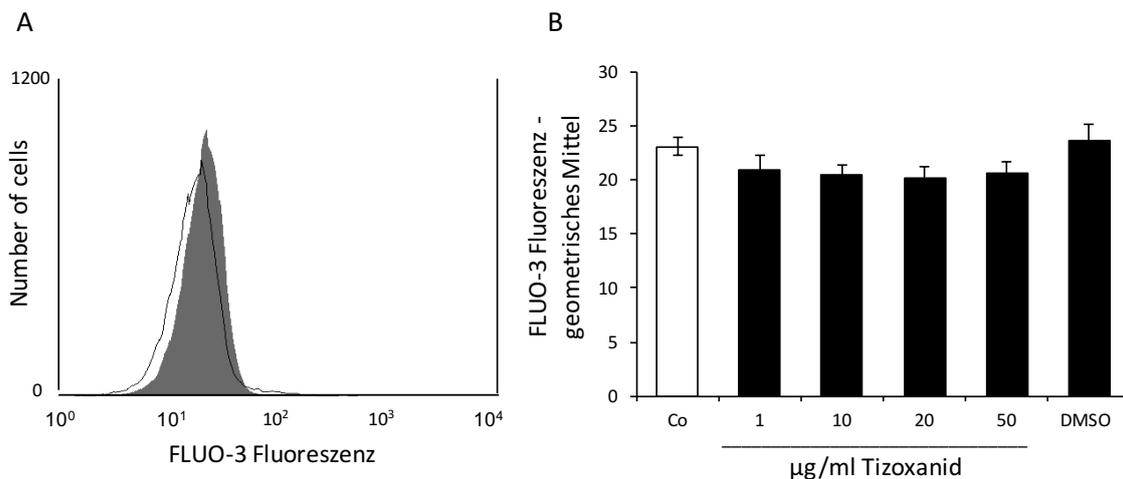


Abbildung 22 - Effekt von TIZ auf die Fluo-3-Fluoreszenz. [A] Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von TIZ (grauer Schatten) und nach Zugabe von 50 µg/ml TIZ (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM ($n = 4$) der Fluo-3-Fluoreszenz (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 - 50 µg/ml TIZ bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken).

Die Experimente zeigen, dass auch der aktive Metabolit fähig ist eine Verstärkung der PS-Externalisierung auszulösen. Es zeigt sich ebenfalls ein nicht signifikanter Trend zur Zellschrumpfung. TIZ hat wie auch NZA keinen signifikanten Einfluss auf die Calcium-Konzentration.

Wie bereits erwähnt wird NZA *in vivo* schnell zum aktiven Metaboliten TZA metabolisiert. Dieser erreicht nach etwa 4 Stunden seine maximale Plasmakonzentration. Eine Übertragung der *in vitro* Daten von NZA, mit einer Exposition für 48 Stunden, auf eine theoretische Wirkung *in vivo* wäre aufgrund der schnellen Umwandlung in den Metaboliten TIZ nicht ohne weiteres möglich. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit TIZ unterstützen die Theorie, dass die Auslösung des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes durch NZA / TIZ auch bei klinischem Gebrauch von NZA *in vivo* möglich wäre und somit zumindest teilweise die durch NZA ausgelöste Anämie erklären könnte.

3.2 Suizidaler Erythrozyten-Zelltod durch MX

3.2.1 Effekt von MX auf die PS-Expression

Um den Effekt von MX auf die PS-Expression zu messen, wurden ebenfalls verschiedene Konzentrationen von MX zu den Ansätzen gegeben. Abbildung 23 zeigt, dass sich bereits nach Zugabe von 10 µg/ml MX und 48-stündiger Inkubation ein signifikanter Anstieg der FITC-Annexin-V-bindenden Zellen gegenüber der Kontroll-Gruppe in Ringer-Lösung messen lässt. Das Original-Histogramm zeigt den Unterschied der FITC-Annexin-V-Fluoreszenz nach Zugabe von 25 µg/ml MX gegenüber der Kontroll-Gruppe an. Auch hier wurde der Anteil der Zellen, deren Fluoreszenzintensität innerhalb des mit M1 angegebenen Bereiches fallen, als PS-positiv gezählt und anschließend deren Anteil an der Gesamtpopulation der gemessenen Zellen (50.000) in % berechnet.

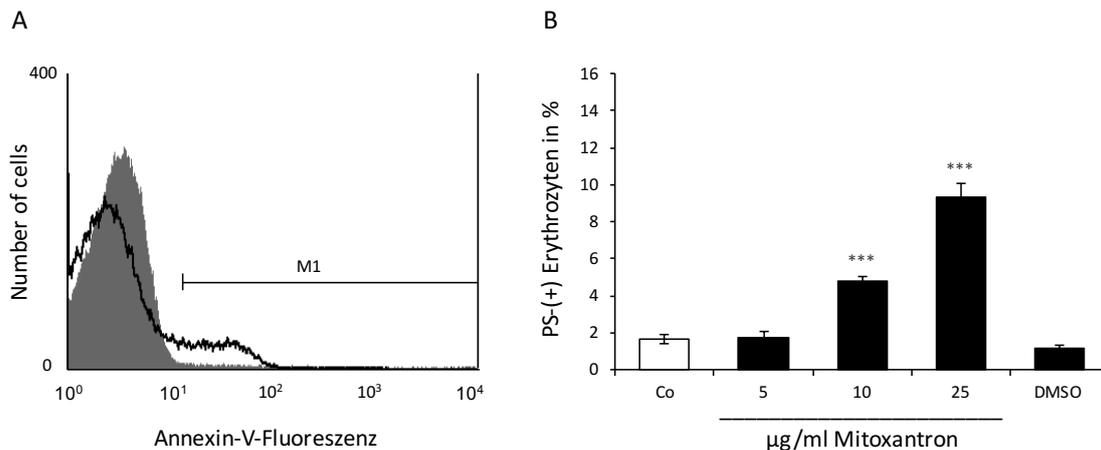


Abbildung 23 - Effekt von MX auf die PS-Expression. [A] Original-Histogramm FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von MX (grauer Schatten) und nach Zugabe von 25 µg/ml MX (schwarze Linie) [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 8) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 5 – 25 µg/ml MX bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014a).

Wie schon bei NZA beobachtet, ist auch hier eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der MX-Konzentration und der PS-Expression zu

erkennen. Alle Messansätze mit Ausnahme der Ringer Kontrolle enthalten DMSO in einer Konzentration von 1 µg/ml. Die Mittelwerte und SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 8 in der Kontrollgruppe bei 1,66 +/- 0,25 %, nach Exposition von 5 µg/ml MX bei 1,75 +/- 0,29 %, von 10 µg/ml MX bei 4,77 +/- 0,23 %, und von 25 µg/ml MX bei 9,29 +/- 0,81 % sowie bei 1,16 +/- 0,17 % nach Exposition gegenüber 1 µg/ml DMSO alleine. Interessanterweise zeigt MX gegenüber NZA bei ähnlichen Plasma-Konzentrationen einen Effekt auf die PS-Externalisierung. Bei beiden Substanzen wird ein signifikanter Effekt ab 10 µg/ml erreicht. Auch bei MX ist somit durch Externalisierung von PS eine wesentliche Charakteristik des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes gegeben.

3.2.2 Effekt von MX auf die Zellgröße

Auch die Zellgröße verändert sich unter MX im Sinne einer Zellschrumpfung. Ab einer Konzentration von 10 µg/ml MX lässt sich ein signifikanter Abfall des FSC beobachten (Abbildung 24). Das Originalhistogramm zeigt die Verschiebung der FSC-Intensität unter Einfluss von 25 µg/ml MX in Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

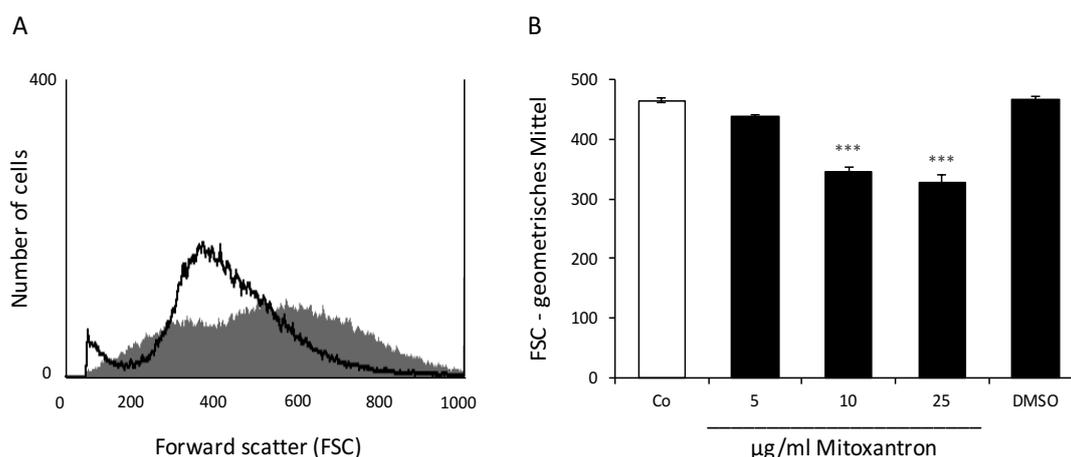


Abbildung 24 - Effekt von MX auf das Vorwärtsstreuungslicht. [A] Original-Histogramm des FSC nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von MX (grauer Schatten) und nach Zugabe von 25 µg/ml MX (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 8) des FSC (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 5 - 25 µg/ml MX bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014a).

Die Mittelwerte und SEM des geometrischen Mittels der Signalintensitäten lagen bei einer Gruppengröße von $n = 8$ in der Kontrollgruppe bei $465,52 \pm 3,94$, nach Exposition von $5 \mu\text{g/ml}$ MX bei $438,33 \pm 2,24$, von $10 \mu\text{g/ml}$ bei $346,42 \pm 7,11$, und von $25 \mu\text{g/ml}$ bei $328,79 \pm 11,79$ sowie bei $467,32 \pm 3,96$ nach Exposition gegenüber $1 \mu\text{g/ml}$ DMSO alleine. Auch der FSC-Abfall zeigt eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung. Somit ist auch ein zweites charakteristisches Merkmal des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes erfüllt.

3.2.3 Effekt von MX auf die intrazelluläre Calciumkonzentration

Die PS-Externalisierung und Zellschrumpfung durch MX könnte das Resultat eines intrazellulären Calciums Anstiegs sein. Der Versuch, das intrazelluläre Calcium zu messen, zeigt einen drastischen Abfall der FLUO-3-Fluoreszenz wie in Abbildung 25 dargestellt. Dies kann zum einen auf einen echten Abfall des intrazellulären Calciums oder aber einen Verlust des Fluoreszenz-Farbstoffes zurückzuführen sein.

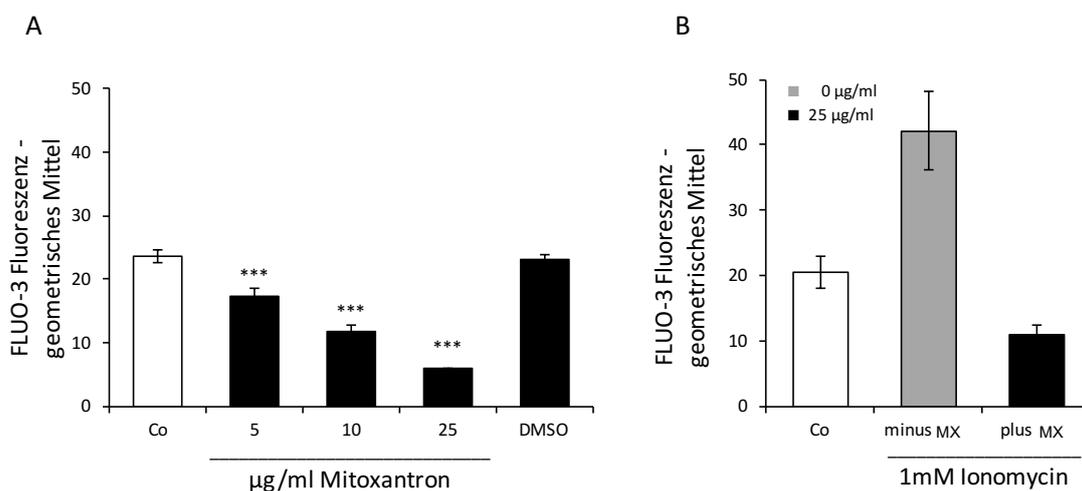


Abbildung 25 - Effekt von MX auf die Fluo-3-Fluoreszenz. [A] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM ($n = 8$) der Fluo-3-Fluoreszenz (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von $5 - 25 \mu\text{g/ml}$ MX bzw. $1 \mu\text{g/ml}$ DMSO (schwarze Balken). *** = ($p < 0,001$) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM ($n = 3$) der Fluo-3-Fluoreszenz nach einstündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 1 mM Ionomycin alleine (grauer Balken) und in Kombination mit $25 \mu\text{g/ml}$ MX (schwarzer Balken). (Signifikanzen nicht berechnet).

Es wurden Kontrollmessungen mit Ionomycin, einem Calcium-Ionophor, als Positiv-Kontrolle durchgeführt. Ionomycin verursacht einen deutlichen artifiziellen Calciumanstieg. Es zeigt sich nach Inkubation mit Ionomycin in Anwesenheit von 25 µg/ml MX ebenfalls ein Fluoreszenz-Abfall, sowohl gegenüber der Kontroll-Gruppe, als auch gegenüber der Ionomycin-Kontrolle. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass die Zellen unter MX den Fluoreszenzfarbstoff verlieren, da in Anwesenheit von Ionomycin von einem deutlichen Anstieg der Fluo-3 Fluoreszenz ausgegangen werden muss. Weitere Erklärungsansätze sind eine Komplexierung von Fluo-3 durch MX und die Möglichkeit einer MX-abhängigen Inhibition der Esterasen welche Fluo3-AM intrazellulär spalten. Die Calcium-Messungen mit Fluo-3 sind somit nicht aussagekräftig. Um zu untersuchen, ob ein Calcium-Einstrom von extrazellulär für die durch MX ausgelöste Membranveränderungen eine Voraussetzung darstellt, wurden zusätzliche Experimente in calciumfreier Umgebung und zusätzlicher Komplexierung des verbleibenden Calciums mittels EGTA durchgeführt.

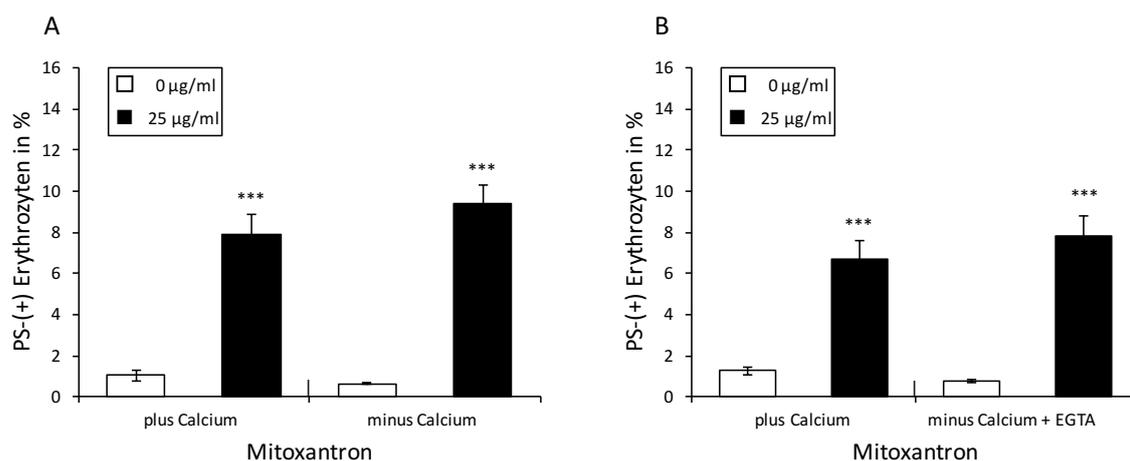


Abbildung 26 - Effekt von MX auf die PS-Expression in calciumfreier Umgebung. [A] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 25 µg/ml MX (linke Balken) und in calciumfreier Lösung mit und ohne 25 µg/ml MX (rechte Balken). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 5) der FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung mit und ohne 25 µg/ml MX (linke Balken) und in calciumfreier Lösung mit 1 mM EGTA mit und ohne 25 µg/ml MX (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014a).

Abbildung 26 zeigt die Messungen der Annexin-V-Fluoreszenz in calciumfreier Umgebung. Die Ergebnisse zeigen, dass die PS-Externalisierung unabhängig vom Calciumstrom erfolgt. Bezüglich der Annexin-V-Fluoreszenz zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in calciumfreier Umgebung gegenüber der Kontrollgruppe in Ringer-Lösung. Auch nach Komplexierung des verbleibenden Calciums mittels EGTA zeigen sich keine Veränderungen. Die PS-Externalisierung und Zellschrumpfung müssen daher über einen Calcium-unabhängigen Weg erfolgen.

3.2.4 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Aktivierung von Caspasen durch MX

Ein weiterer Auslöser des suizidalen Erythrozyten-Zelltodes ist die Vermittlung von oxidativem Stress über die Bildung freier Sauerstoffspezies. Um deren Bildung durch MX zu messen, wurden Experimente mithilfe eines Fluoreszenz-Antikörper-Tests durchgeführt.

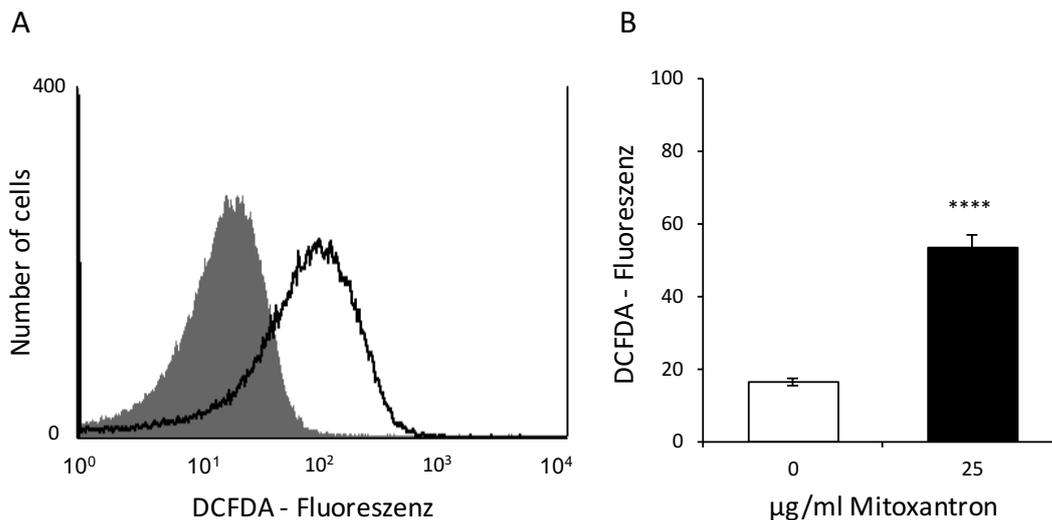


Abbildung 27 - Effekt von MX auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. [A] Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von MX (grauer Schatten) und nach Zugabe von 25 µg/ml MX (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) der DCFDA-Fluoreszenz (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne MX (weißer Balken) und in Anwesenheit von 25 µg/ml MX (schwarzer Balken). **** = (p < 0,0001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (two-tailed t-test). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014a).

Abbildung 27 zeigt, dass eine 48-stündige Exposition gegenüber 25 µg/ml MX zu einer signifikanten Zunahme der DCFDA-Fluoreszenz führt, was auf eine vermehrte Bildung von ROS durch MX schließen lässt. Die Mittelwerte und SEM lagen bei einer Gruppengröße von n = 4 bei 16,5 +/- 1,03 in der Kontrollgruppe und nach Exposition gegenüber 25 µg/ml MX bei 53,39 +/- 3,35. Oxidativer Stress zählt zu den gut untersuchten Auslösern der Eryptose. Durch Öffnung nicht-selektiver Kationenkanäle (calciumabhängig) und durch Aktivierung von Caspasen (calciumunabhängig) kann es die PS-Externalisierung stimulieren. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich der Effekt durch Zugabe von N-Acetylcystein als Antioxidans aufheben lässt. Dazu wurde die PS-Externalisierung nach 48-stündiger Inkubation mit 25 µg/ml MX unter zusätzlicher Beigabe von 1 mM NAC untersucht. Abbildung 28 zeigt, dass sich die Annexin-V-Fluoreszenz in Anwesenheit von NAC (9,53 +/- 1,04) signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe ohne NAC (4,58 +/- 0,65) vermindert. Trotzdem zeigen die Daten auch unter antioxidativen Schutz noch eine signifikante Erhöhung der Annexin-V-Fluoreszenz gegenüber der Kontroll-Gruppe in Ringer-Lösung (1,15 +/- 0,06).

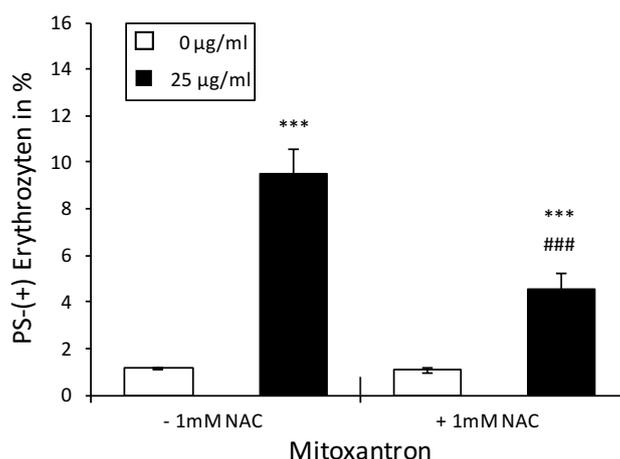


Abbildung 28 - Effekt von MX auf die PS-Expression in Anwesenheit von NAC Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 9) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von NAC mit und ohne 25 µg/ml MX (linke Balken) und nach Zugabe von 1 mM NAC mit und ohne 25µg/ml MX (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA). ### = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zum Vorhandensein von 1 mM NAC an (ANOVA). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014a).

Die Ergebnisse legen nahe, dass der Effekt von MX auf Erythrozyten zumindest teilweise auf die Bildung von ROS zurückzuführen ist und somit durch Ausübung von oxidativem Stress auf die Zellen vermittelt wird.

Eine durch oxidativen Stress vermittelte Aktivierung von Caspasen könnte calciumunabhängig zur PS-Externalisierung führen. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Experimente mit dem Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (10 μ M) durchgeführt. Abbildung 29 zeigt keinen signifikanten Unterschied nach 48-stündiger Inkubation mit 25 μ g/ml MX in Anwesenheit des Pancaspase-Inhibitors gegenüber der Kontrollgruppe (n = 4).

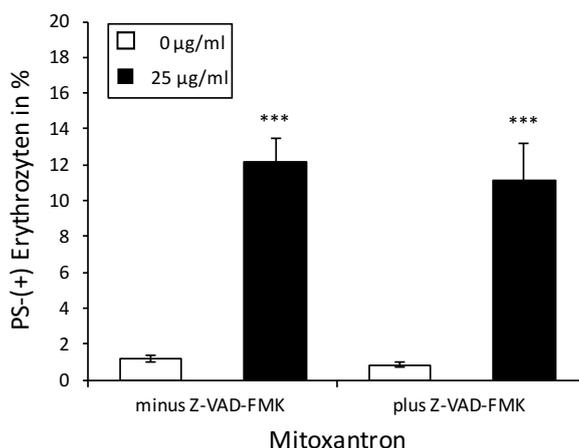


Abbildung 29 - Effekt von MX auf die PS-Expression in Anwesenheit des Pancaspase-Inhibitors Z-VAD-FMK. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 4) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von Z-VAD-FMK mit und ohne 25 μ g/ml MX (linke Balken) und nach Zugabe von Z-VAD-FMK (10 μ M) mit und ohne 25 μ g/ml MX (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA).

Zusammenfassend lässt sich anhand der Daten die Bildung von ROS unter MX nachweisen. Deren Effekt auf die Eryptose lässt sich durch NAC abschwächen, jedoch nicht vollständig aufheben. Es kann keine Aktivierung von Caspasen als calciumunabhängiger Signalweg zur PS-Externalisierung nachweisen werden.

3.2.5 Effekt von MX auf die Bildung von CER

Um den Effekt von MX auf die Bildung von CER zu untersuchen, wurde ebenfalls ein Fluoreszenz-Antikörper-Test durchgeführt. Nach einer Exposition

von 25 µg/ml MX zeigt sich nach 48-stündiger Inkubation ein signifikanter Anstieg der CER-Konzentration (n = 12). Das Original-Histogramm zeigt den Anstieg der Fluoreszenz-Intensität unter Einfluss von 25 µg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Mittelwerte und SEM lagen in der Kontroll-Gruppe bei 16,8 +/- 1,07, nach Exposition gegenüber 25 µg/ml MX bei 21,42 +/- 1,22.

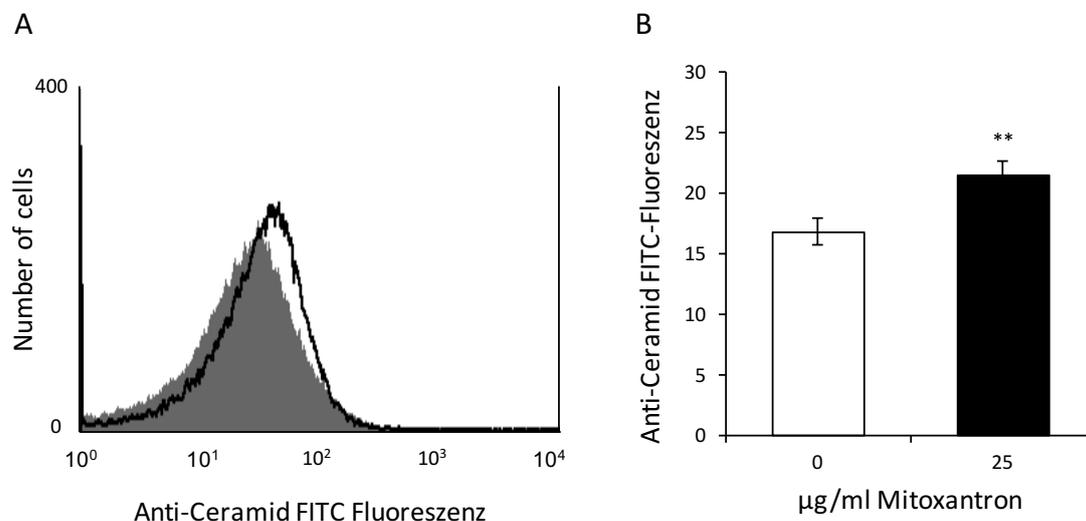


Abbildung 30 - Effekt von MX auf die Bildung von CER. [A] Original-Histogramm der FITC-Anti-CER-Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von MX (grauer Schatten) und nach Zugabe von 25 µg/ml MX (schwarze Linie). [B] Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 12) der FITC-Anti-CER-Fluoreszenz (geometrisches Mittel) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne MX (weißer Balken) und in Anwesenheit von 25 µg/ml MX (schwarzer Balken). ** = (p < 0,01) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (two-tailed t-test). Abbildung modifiziert nach (Arnold et al., 2014a).

Die Fähigkeit von MX, den CER-Metabolismus zu beeinflussen wurde bereits in kernhaltigen Zellen gezeigt. Bisher existieren keine Daten die zeigen, dass MX auch in Erythrozyten befähigt ist die CER-Bildung zu stimulieren.

3.2.6 Effekt von MX auf die Aktivierung der p38-MAPKinase

Um eine zusätzliche Aktivierung der p38-MAPKinase durch MX zu untersuchen wurden weitere Experimente mit dem p38-MAPKinase Inhibitor SB203580 (2 µM) durchgeführt. Wie in Abbildung 31 dargestellt konnte eine Erhöhung der FITC-Annexin-V Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation mit 25 µg/ml MX sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in Anwesenheit des p38-MAPKinase-Inhibitors gemessen werden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen. Daraus lässt sich schließen, dass eine

Aktivierung der p38-MAPKinase keine Voraussetzung für die MX vermittelte Eryptose darstellt.

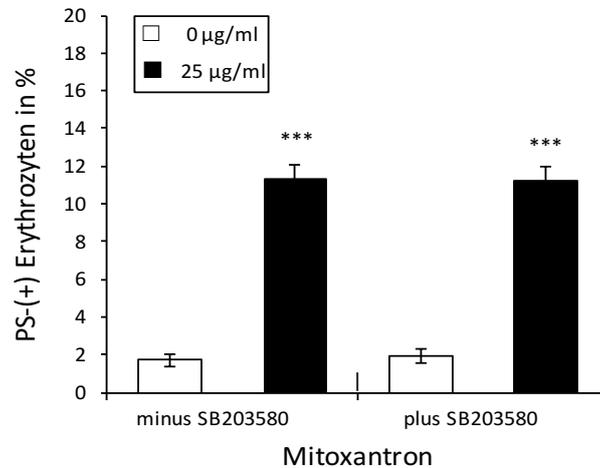


Abbildung 31 - Effekt von MX auf die PS-Expression in Anwesenheit des p38-MAPKinase-Inhibitors SB203580. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 5) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung ohne Zugabe von SB203580 mit und ohne 25 µg/ml MX (linke Balken) und nach Zugabe von SB203580 (2 µM) mit und ohne 25 µg/ml MX (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA).

3.2.7 Effekt von MX in Zusammenhang mit zusätzlichen Stressoren

Um die Auswirkung von MX simultan zu anderen zellulären Stressoren zu untersuchen, wurden Experimente unter Entzug von Glukose durchgeführt.

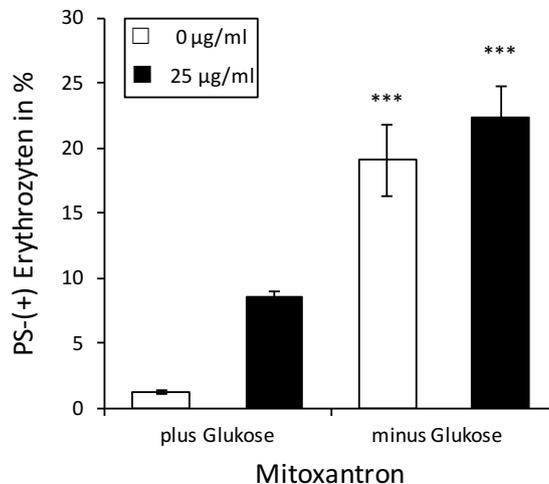


Abbildung 32 - Effekt von MX auf die PS-Expression unter zusätzlichem Energieentzug in glukosefreier Lösung. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM (n = 5) FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten in % nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung mit und ohne 25 µg/ml MX (linke Balken) und in glukosefreier Lösung mit und ohne 25 µg/ml MX. (rechte Balken). *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe an (ANOVA).

Abbildung 32 zeigt eine Verstärkung der PS-Expression in Gegenwart von 25 µg/ml MX und zusätzlichem Glukoseentzug gegenüber 25 µg/ml MX alleine. Gegenüber der Kontrolle unter Glukoseentzug alleine zeigt sich bei einer Gruppengröße von n = 5 keine signifikante Verstärkung des Effektes.

3.2.8 Hämolyse durch MX

Um den Hämolysegrad der Zellen in Gegenwart von MX zu untersuchen wurde mit Hilfe einer Eichkurve der Hämoglobinkonzentrationen der Hämolysegrad photometrisch bestimmt. Abbildung 33 zeigt den Hämolysegrad anhand der Hämoglobinkonzentrationen im Überstand nach 48 h Inkubation im Vergleich zum Anteil FITC-Annexin-V-positiver Zellen in %. Die Experimente zeigen eine signifikante Erhöhung des Hämoglobingehalts bei gleichen MX-Konzentrationen. Bei diesen Konzentrationen wird auch einen Anstieg der PS-Externalisierung gemessen.

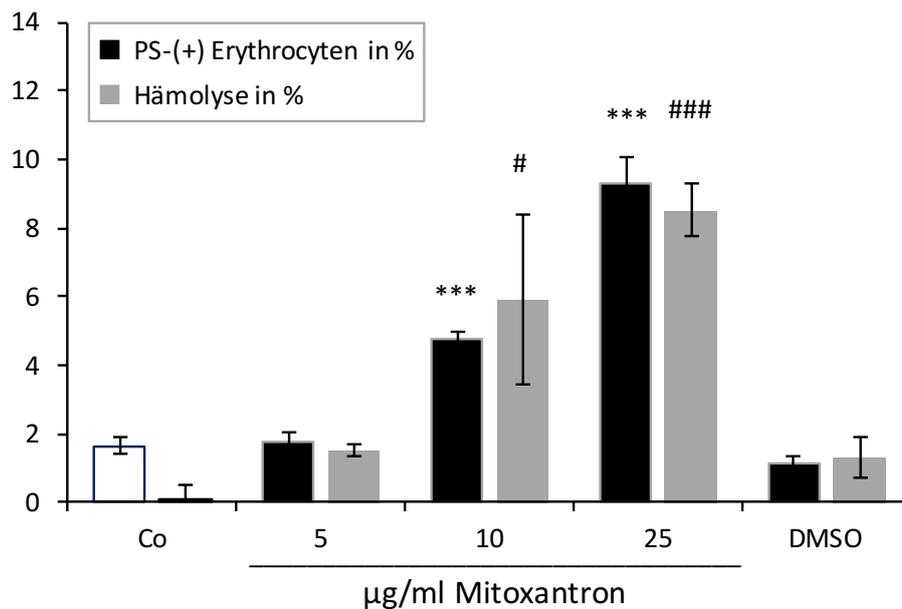


Abbildung 33 - Hämolyse durch MX. Balkendiagramm der Mittelwerte und SEM des Hämoglobingehaltes (in % des Hämoglobingehaltes nach vollständiger Hämolyse) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung und nach Zugabe von 5 – 25 µg/ml MX bzw. 1 µg/ml DMSO (graue Balken) (n = 5) und Prozentsatz FITC-Annexin-V-positiver Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringer-Lösung (weißer Balken) und nach Zugabe von 5 – 25 µg/ml MX bzw. 1 µg/ml DMSO (schwarze Balken) (n = 8). ### = (p < 0,001), # = (p < 0,05), *** = (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontroll-Gruppe an (ANOVA).

Der Anteil hämolysierter Zellen ist dabei ähnlich dem Anteil PS-exponierender Zellen. Die Messung der Hämolyse zeigt ebenfalls eine positive Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Hämolyse stellt eine alternative Reaktion der Zellen auf Stresssignale dar. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass entweder nicht alle Zellen auf MX mit Eryptose reagieren oder bereits lysieren bevor die Zellen den Zelltod mittels Eryptose einleiten können. Die durch MX ausgelösten Veränderungen im Sinne eines suizidalen Erythrozyten-Zelltodes könnten daher eine physiologische Reaktion darstellen, um eine exzessive Hämolyse zu verhindern.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zielsetzung dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob Nitazoxanid, dessen aktiver Metabolit Tizoxanid und Mitoxantron befähigt sind, den als Eryptose bezeichneten suizidalen Zelltod von Erythrozyten auszulösen. Beide Substanzen haben einen nachgewiesenen pro-apoptotischen Effekt in kernhaltigen Zellen und können bei klinischem Gebrauch zu einem relevanten Erythrozytenabfall im peripheren Blut führen. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass beide Substanzen befähigt sind, die PS-Externalisierung auf der äußeren Erythrozytenmembran zu stimulieren und eine Zellschrumpfung auszulösen. Beides sind charakteristische Merkmale der Eryptose. Darüber hinaus wurde versucht die zugrundeliegenden Signalwege aufzuklären und die Ergebnisse mit zusätzlichen Experimenten zu untermauern. Im Falle von Nitazoxanid konnte eine Stimulation der endogenen CER-Produktion gezeigt werden. Dies stellt einen neuen, bislang nicht beschriebenen Effekt der Substanz dar. Im Falle von Mitoxantron konnte die Bildung von ROS sowie die Stimulation der CER-Produktion nachgewiesen werden. Es existieren Daten über die Fähigkeit von MX, die CER-Produktion in kernhaltigen Zellen zu stimulieren, eine Stimulation der CER-Produktion in Erythrozyten war bislang ebenfalls nicht beschrieben. Interessanterweise scheint der Effekt beider Substanzen calciumunabhängig zu sein. Beide Substanzen vermitteln ihren Effekt dosisabhängig und bei *in vivo* erzielbaren Plasmakonzentrationen. Diese entsprechen jeweils den therapeutischen Konzentrationen, unter welchen die Substanzen klinisch eingesetzt werden.

4.2 Limitationen und methodische Einschränkungen

Die Durchführung sämtlicher Experimente erfolgte *in vitro*. *In vivo*-Studien oder Tierexperimente wurden nicht durchgeführt. Die theoretische Übertragung der *in vitro* erhobenen Daten auf den klinischen Gebrauch ist somit nur eingeschränkt möglich. Um eine möglichst physiologische Umgebung für die

Testerythrozyten zu schaffen, wurden pH-Wert, Temperatur, Osmolarität und Glukosekonzentrationen gemäß den Angaben in 2.3 den physiologischen Bedingungen angepasst. Die Testerythrozyten wurden vor Sonneneinstrahlung und mechanischer Schädigung geschützt. Trotzdem ist davon auszugehen, dass eine physiologische Umgebung durch die Komplexität der Regulation der physiologischen Prozesse im Blutplasma nur bedingt nachzuahmen ist. Alle Messungen wurden bei einem Hämatokrit von 0,4 % durchgeführt, welcher deutlich unter dem physiologischen Hämatokrit von 37 – 45 % bei Frauen und 42 – 50 % bei Männer liegt. Diese Anpassung der rheologischen Eigenschaften war notwendig um eine optimale Flussrate für die Messungen erzielen und falsche Messwerte durch Verstopfen der Kapillare des Durchflusszytometers verhindern zu können. Die in den Experimenten vollzogene 48-stündige Inkubation in Anwesenheit der Testsubstanzen stellt nur ein unzureichendes Modell der *in vivo* deutlich komplexeren Pharmakodynamik und -kinetik der jeweiligen Testsubstanzen dar. So können den Konzentrationsschwankungen im Plasma, der komplexen Aufnahme-, Verteilungs- und Eliminationskinetik, einer möglichen intrazellulären Akkumulation von Substanzen bei wiederholter Exposition und der Effekt einer gleichzeitigen temporären Exposition gegen andere zelluläre Stressoren nur unzureichend Rechnung getragen werden. Es kann keine Aussage über den Einfluss der Pharmaka auf Erythrozyten, welche innerhalb ihrer Lebensspanne von ca. 120 Tagen mehrfach den Substanzen ausgesetzt werden, getroffen werden. Eine mögliche Übertragung von *in vitro* gewonnenen Daten zur medikamenten-induzierten Eryptose auf die Exposition in Patienten unter Behandlung konnte am Beispiel von Sorafenib und Patienten mit hepatozellulärem Karzinom gezeigt werden (Lupescu et al., 2012).

Die in dieser Arbeit angewandte Methodik der durchflusszytometrischen Bestimmung mittels verschiedener Fluoreszenzfärbungen und Antikörpernachweismethoden (FITC-Annexin-V, Fluo-3-AM, DCFDA, Anti-CER-Antikörper) sowie die Auswertung des Vorwärtsstreulichtes sind anerkannte und gut etablierte Methoden (Coward et al., 2002; Dive et al., 1992; Eruslanov et al., 2010; Vandenbergh et al., 1990; Vermes et al., 1995). Die

Durchflusszytometrie zur Bestimmung der PS-Externalisierung mittels FITC-Annexin-V kann als Standardmethode der klinischen Forschung im Bereich des PCD angesehen werden (Koopman et al., 1994; Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995). Alle Messungen erfolgten nach modifizierten, gut etablierten Protokollen der Hersteller. Üblicherweise erfolgt in diesen Protokollen während der Annexin-V-Messung auch die Messung der Zellviabilität. Dazu werden die Zellen parallel zur Färbung mit Annexin-V mit Propidiumiodid gefärbt. Propidiumiodid kann eine intakte Zellmembran nicht passieren. Bei spät apoptotischen Zellen und bei der Nekrose, gelangt es aber durch die beschädigte Zellmembran in die Zelle und interkaliert dort mit der DNA. Durch die Interaktion mit der DNA verschiebt sich sein Absorptions- und Emissionsmaximum. Somit kann zwischen früh-apoptotischen und spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen unterschieden werden (Vermes et al., 1995). Aufgrund des Fehlens von DNA kann diese Methodik bei der Untersuchung der Eryptose nicht angewandt werden. Somit ergibt sich das Risiko von Verfälschung der Ergebnisse der Annexin-V-Messungen durch exzessive Hämolyse und dadurch bedingte Bindung von FITC-V-Annexin an die innere Erythrozytenmembran. Im Rahmen der zytometrischen Untersuchung könnten diejenige Erythrozyten, welche sich zum Zeitpunkt der Messung gerade im Prozess der Hämolyse befinden, fälschlicherweise als intakte Zellen gemessen werden. Somit ergibt sich die Notwendigkeit der gleichzeitigen Bestimmung des Hämolysegrads um Fehlergebnisse durch eine exzessive Hämolyse auszuschließen. Der alleinige Nachweis mittels Durchflusszytometrie stellt ebenfalls eine Limitation der Arbeit dar. Um die Ergebnisse bezüglich Ihrer Validität zu prüfen, existieren weitere etablierte Methoden, beispielsweise der direkte Fluoreszenznachweis durch konfokale Mikroskopie. Bezüglich der PS-Externalisierung konnten in anderen Arbeiten mit den durchflusszytometrischen Daten übereinstimmende, direkte Nachweise einer erhöhten Annexin-V-Fluoreszenz auf der Erythrozytenmembran erbracht werden (Abed et al., 2014; Alzoubi et al., 2014; Bissinger et al., 2014; Lupescu et al., 2012). So kann davon ausgegangen werden, dass die erhobenen Daten trotz der Limitationen der Methodik valide und reproduzierbar sind. Alle Proben wurden gemäß den in

Kapitel 2 beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen behandelt. Trotz dieser Maßnahmen können Fehlergebnisse durch Kontamination der Proben nicht völlig ausgeschlossen werden. Um das Risiko dadurch verursachter Fehler zu minimieren, wurden mehrfache Messung mit verschiedenen Erythrozyten an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

4.3 Eryptose durch NZA

Die Ergebnisse zeigen, dass NZA befähigt ist, die durch PS-Externalisierung und Zellschrumpfung charakterisierte Eryptose in Erythrozyten auszulösen. Die Mehrheit der bisher bekannten Xenobiotika, welche Eryptose auslösen, vermitteln ihren Effekt über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Lang et al., 2012a). Durch Messungen des intrazellulären Calciums konnte gezeigt werden, dass die PS-Externalisierung durch NZA nicht auf einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beruht. Trotzdem konnte durch die Versuche in calciumfreier Umgebung eine Abhängigkeit von der Existenz extrazellulären Calciums nachgewiesen werden. Neben der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration stellt die Bildung von CER einen alternativen Weg zur Initiation der Eryptose dar. CER kann die Zellen für Calcium sensibilisieren und somit auch bei normalen Calciumkonzentrationen Eryptose auslösen. Dies konnte unter anderem bei Untersuchungen der durch osmotischen Stress ausgelösten Eryptose nachgewiesen werden (Lang et al., 2004a). Die durch osmotischen Stress ausgelösten Membranveränderungen sind zwar ebenso calciumabhängig, aber durch Calciumentzug nicht völlig auszuschalten. Calcium stellt somit keine Voraussetzung für die durch CER initiierte PS-Externalisierung dar (Lang et al., 2004a). Eine Exposition gegenüber C6-Ceramid und bakterieller Sphingomyelinase führt in Erythrozyten zu einer PS-Externalisierung und Zellschrumpfung ohne signifikante Calciumerhöhung (Lang et al., 2004a). Unter den bisher bekannten Auslösern der Eryptose konnte die Stimulation der CER-Synthese durch eine Vielzahl von Xenobiotika nachgewiesen werden. Cyclosporin und Geldanamycin führen beispielsweise, ebenso wie NZA, zu einer Stimulation der CER-Synthese ohne gleichzeitige Erhöhung des

intrazellulären Calciums (Jilani et al., 2013; Niemoeller et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte bei Paclitaxel und Rifampicin sowohl eine Stimulation der CER-Synthese als auch eine Calciumerhöhung nachgewiesen werden (Abed et al., 2012b; Lang et al., 2006c). Die genauen Mechanismen während der Eryptose durch CER sind dabei nicht vollständig verstanden. Gezeigt werden konnten eine Reorganisation von Mikrodomänen innerhalb der Erythrozytenmembran, Veränderungen der Interaktion zwischen Membran und Zytoskelett-Bestandteilen wie Bande-3-Protein und Aktin, ein Verlust der typisch bikonkaven Zellform, eine erhöhte Membranfragilität und die Ausbildung von Membranvesikeln (Dinkla et al., 2012). All dies könnte zu einer erhöhten Membranpermeabilität führen. Darüber hinaus könnten die Veränderungen auch zu einer verlängerten Passagezeit der Erythrozyten durch die Milz führen (Dinkla et al., 2012). Auch das im CER-Metabolismus beteiligte Enzym ist nicht genau charakterisiert. In kernhaltigen Zellen wird CER unter anderem durch Unterformen der Sphingomyelinase gebildet (Kolesnick et al., 1998). Vieles deutet darauf hin, dass es sich in Erythrozyten um die Unterform der sauren Sphingomyelinase handelt. Diese konnte in Sichelzell-Erythrozyten nachgewiesen werden (Awojoodu et al., 2014). Bei der Eryptose im Rahmen eines M. Wilson, welche ebenfalls mit einer CER-Erhöhung einhergeht, gelang der Nachweis einer erhöhten Plasmaaktivität der sauren Sphingomyelinase (Lang et al., 2007). Untersuchungen mit Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase wie Amitriptylin und Fluoxetin deuten auf eine Involvierung des Enzyms im Rahmen der Eryptose bei gelagerten Erythrozytenkonzentraten hin (Hoehn et al., 2016a; Hoehn et al., 2016b). Im Gegensatz dazu zeigen andere Untersuchungen eine Beteiligung der neutralen Sphingomyelinase in Erythrozyten unter osmotischem Stress (Lopez et al., 2012).

Da CER ebenfalls bei osmotischem Stress gebildet wird, decken sich die Ergebnisse der Messungen in hyperosmolarer Lösung mit der Theorie, dass CER zumindest teilweise für die Stimulation der Eryptose unter NZA verantwortlich ist. Eine zusätzliche Aktivierung der p38-MAPKinase konnte dabei ausgeschlossen werden. Ebenso konnte eine Aktivierung von Caspasen

ausgeschlossen werden. Diese werden unter anderem durch oxidativen Stress aktiviert. Versuche unter antioxidativem Schutz mit NAC zeigen keine Veränderung der PS-Externalisierung. Bei der Bildung von ROS durch NZA wäre eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erwarten. Der *in vivo* aktive Metabolit TIZ kann gleiche Veränderungen wie NZA in Erythrozyten auslösen, sodass Eryptose die unter NZA auftretenden Anämien erklären könnte.

Eine Aktivierung der Sphingomyelinase bzw. die Bildung von CER durch NZA in kernhaltigen Zellen ist bisher nicht beschrieben worden. Ein pro-apoptotischer Effekt in verschiedenen Zellreihen kann dagegen als gesichert gelten. NZA beeinflusst dabei in kernhaltigen Zellen verschiedene Signalwege. In Kolonkarzinom-Zellen könnte der pro-apoptotische Effekt teilweise auf einer verstärkten Expression der zur Bcl-2-Familie gehörenden pro-apoptotischen Proteine Bim und Puma beruhen (Brockmann et al., 2015; Sidler et al., 2012). Interessanterweise aktiviert das dem NZA ähnliche Thiazolid-Derivat RM4819 in Kolonkarzinom-Zellen die p38-MAPKinase und lässt sich durch pharmakologische Inhibition der p38-MAPKinase in seiner pro-apoptotischen Wirkung hemmen (Brockmann et al., 2015). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den hier erhobenen Daten, welche keine Aktivierung der p38-MAPKinase durch NZA zeigen. Andere Daten zeigen eine mögliche Inhibierung von c-Myc durch NZA (Fan-Minogue et al., 2013). NZA besitzt zudem die Fähigkeit zur Inhibierung der Proteindisulfid-Isomerase und könnte damit eine Rolle in der Aktivierung des UPR (unfolded protein Response) in bestimmten Tumorzellen spielen (Di Santo et al., 2013). Auch eine Inhibierung von mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) durch NZA wird diskutiert (Lam et al., 2012). NZA ist durch seine vielfältigen Interaktionen daher Gegenstand aktueller Forschung bezüglich einer möglichen antineoplastischen Nutzung (Di Santo et al., 2014). Möglicherweise kann NZA auch in kernhaltigen Zellen den CER-Metabolismus beeinflussen. Da dies bisher nur schlecht untersucht ist sollten zusätzliche Studien die Wirkung von NZA auf den CER-Metabolismus in kernhaltigen Zellen untersuchen.

4.4 Eryptose durch MX

Die Ergebnisse der Studien zeigen, dass MX ebenfalls befähigt ist, die durch PS-Externalisierung und Zellschrumpfung charakterisierte Eryptose in Erythrozyten auszulösen. Die Untersuchungen mit Fluo-3-AM zeigen einen deutlichen Abfall der Fluo-3 Fluoreszenz. Dabei konnte mit Hilfe des Calcium-Ionophors Ionomycin als Positivkontrolle gezeigt werden, dass sich selbst unter der artifiziellen Calciumerhöhung ein Abfall der Fluo-3-Fluoreszenz zeigt. Ionomycin erhöht sehr deutlich die intrazelluläre Calciumkonzentration in Erythrozyten und eignet sich daher besonders als Positiv-Kontrolle zur Identifikation möglicher Fehlmessungen (Berg et al., 2001; Lang et al., 2003a). Eine Erklärung könnte der Verlust des Fluo-3-Farbstoffs über die Erythrozytenmembran während der Exposition gegenüber MX sein. Dieser könnte einerseits durch Hämolyse, andererseits durch eine Erhöhung der Membranpermeabilität ausgelöst werden. Weitere Erklärungsansätze können in einer möglichen Komplexierung des Fluo-3-Farbstoffes mit MX oder einer Hemmung des zur Spaltung von Fluo-3/AM nötigen Esterasen liegen. Die Ergebnisse lassen sich daher nicht sicher interpretieren. Um trotzdem eine Aussage über die Rolle des Calciums treffen zu können, wurden Experimente in calciumfreier Umgebung durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass die PS-Externalisierung durch MX ebenfalls calciumunabhängig stattfindet. Durch den Calciumentzug zeigte sich keine Veränderung des Anteils PS-positiver Zellen. Der genaue Einfluss von MX auf das intrazelluläre Calcium konnte dabei nicht aufgeklärt werden.

Mittels Fluoreszenz-Antikörper-Tests gelang der Nachweis einer vermehrten Bildung von ROS. Ihr Effekt auf die Eryptose konnte durch antioxidativen Schutz mittels NAC teilweise aufgehoben werden, dennoch zeigte sich unter NAC eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Eryptoserate. Die Ausübung von oxidativem Stress und die Möglichkeit zur Bildung freier Radikale durch MX konnte bereits in kernhaltigen Zellen gezeigt werden (Kolodziejczyk et al., 1988; Reszka et al., 1986; Rossato et al., 2013). Ebenso konnte eine Hemmung der antioxidativen Systeme in Leberzellen nachgewiesen werden (Llesuy et al.,

1990). Im Gegensatz dazu zeigen Studien zur Kardiotoxizität von Chemotherapeutika keine Vermittlung von oxidativem Stress durch MX im Gegensatz zu den besser untersuchten Anthracyclinen wie Doxorubicin (Lores Arnaiz et al., 1993).

Oxidativer Stress führt während der Eryptose unter anderem zur Öffnung von Calciumkanälen. Dies müsste zum einen mit einer verstärkten Fluo-3-Fluoreszenz einhergehen, zum anderen wäre der Effekt abhängig vom extrazellulären Calciumangebot. Es ist außerdem bekannt, dass oxidativer Stress Caspasen in Erythrozyten aktivieren kann. Beide Effekte scheinen nicht hauptsächlich für die PS-Externalisierung von MX verantwortlich zu sein. Der genaue Zusammenhang zwischen der hier gezeigten Bildung von ROS und der PS-Externalisierung durch MX erfordert deswegen weitere Experimente.

Darüberhinaus zeigen die Experimente eine Stimulation der CER-Bildung in Erythrozyten durch MX. Dieser wurde bisher in Erythrozyten nicht beschrieben. In kernhaltigen Zellen (U937 Zellen) konnte die Hydrolyse von Sphingomyelin und Bildung von CER ab 1 μ M MX nachgewiesen werden (Bettaieb et al., 1999). Die Beeinflussung des CER-Metabolismus in kernhaltigen Zellen spielt dabei eine besondere Rolle als mögliches Target zur Beeinflussung der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika (Senchenkov et al., 2001). Auch eine Aktivierung von Caspase-3 durch MX konnte in NIH 3T3 und B14 Zellen nachgewiesen werden (Koceva-Chyla et al., 2005). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den hier gezeigten Ergebnissen, welche keine signifikante Beeinflussung der PS-Externalisierung durch Inhibierung der Caspasen in Erythrozyten zeigen. Dabei muss beachtet werden, dass die Datenlage zur genauen Charakterisierung der durch MX ausgelösten Apoptose in kernhaltigen Zellen lückenhaft ist. Neben den beschriebenen Effekten vermittelt MX die Apoptose in kernhaltigen Zellen hauptsächlich durch seine Fähigkeit zur Bildung von Quervernetzungen und Strangbrüchen der DNA und Hemmung der Topoisomerase II (Fisher et al.,

1991; Tewey et al., 1984). Eine Aktivierung der p38-MAPKinase durch MX konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend legen die Experimente nahe, dass MX Eryptose über calciumunabhängige Wege stimuliert. Die Bildung von ROS und die Beeinflussung des CER-Metabolismus scheinen zumindest teilweise zu dem durch MX vermittelten Effekt beizutragen. Die genauen molekularen Mechanismen beider Signalwege sind dabei nicht vollständig aufgeklärt. Es sind weitere Experimente nötig um den Zusammenhang der beobachteten Effekte mit der PS-Externalisierung und Zellschrumpfung aufzuklären.

4.5 Relevanz der Ergebnisse

4.5.1 Klinische Bedeutung der Eryptose

Die aktuellen Erkenntnisse über die Mechanismen der Eryptose legen nahe, dass diese eine physiologische Rolle in der Aussortierung geschädigter Zellen spielen (Lang et al., 2012b). PS-exponierende Zellen werden rasch aus dem zirkulierenden Blut eliminiert (Schroit et al., 1985; Tanaka et al., 1983). Der Abbau findet durch PS-Rezeptor-tragende Phagozytose-Zellen statt (de Back et al., 2014). Auch bei alternden Zellen wurde eine gesteigerte Phagozytose durch PS-Expression nachgewiesen (Boas et al., 1998). Dabei könnte die Zunahme des intrazellulären Calciums in alternden Zellen zu einer schnelleren Aussortierung beitragen (Romero et al., 1999). Die PS-Externalisierung begünstigt zudem die Adhärenz von Erythrozyten an den Membranen von Endothelzellen und Makrophagen und könnte damit auch den Abbau durch Phagozytose begünstigen (Eda et al., 2002; Manodori et al., 2000; Schwartz et al., 1985). Ohne diesen Mechanismus könnten die Zellen hämolysieren und die freigesetzten Zellinhalte sekundär zu einer weiteren Schädigungen des Organismus führen. Große Mengen freigesetztes Hämoglobin können beispielsweise in der Niere zu Schäden führen (Harrison et al., 1947; Paller, 1988). Die durch die Eryptose ausgelösten Veränderungen ionenleitender Transmembranproteine und eine daraus folgende Zellschrumpfung, wirkt der

bei der Hämolyse vorrausgehenden Zellschwellung entgegen und könnte somit theoretisch die Zeit zum gezielten Abbau vor Eintritt der Hämolyse verlängern.

Eryptose erfüllt darüber hinaus möglicherweise eine physiologische Funktion in der Beseitigung infizierter Erythrozyten, so zum Beispiel bei Infektion mit dem Malariaparasiten Plasmodium (Foller et al., 2009a). Infizierte Zellen zeigen eine erhöhte PS-Externalisierung (Maguire et al., 1991). Der durch die Infektion generierte oxidative Stress öffnet nichtselektive Kationenkanäle, was die Eryptose stimulieren kann. Zumindest theoretisch könnten die infizierten Zellen so aus dem peripheren Blut beseitigt werden (Foller et al., 2009a). Dafür spricht auch, dass Erkrankungen mit erhöhter Sensibilität für Eryptose, wie die Sichelzellanämie oder der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel einen Schutz gegen Malaria darstellen (Ayi et al., 2004; Cappadoro et al., 1998). Auch zeigen Untersuchungen, dass eryptotische Zellen seltener von Plasmodium infiziert werden können (Totino et al., 2011). Fetale Erythrozyten sind weniger sensibel gegenüber osmotischem Stress, gleichzeitig reagieren sie auf oxidativen Stress sensibler. Dies könnte theoretisch zu einem intrauterinen Schutz der Erythrozyten beitragen und einen schnelleren postnatalen Austausch der fetalen Erythrozyten ermöglichen (Hermle et al., 2006).

Auf der anderen Seite kann exzessive Eryptose verschiedene Pathologien begünstigen. Das Resultat einer gesteigerten Eryptose mit nachfolgender Phagozytose PS-exponierender Erythrozyten führt zu einem Abfall der Erythrozytenzahl und kann somit in einer relevanten Anämie resultieren, sobald die Kompensationskapazität zur Neubildung überschritten ist. Die Anämie stellt eine häufige Nebenwirkung vieler Arzneimittel dar. Bei Patienten, die eine zytotoxische Therapie erhalten, entwickeln bis zu 38 % eine Anämie unter fortlaufender Therapie (Barrett-Lee et al., 2000). Die Ausprägung der Symptome ist je nach Stärke der Anämie sehr variabel. Unbehandelt stellt sie eine Belastung für das Herz-Kreislauf-System dar (Metivier et al., 2000). Eine begleitende Anämie verschlechtert den Krankheitsverlauf bei Patienten mit

Grunderkrankungen wie einer chronischen Nierenerkrankung, einer Aortenstenose und der Herzinsuffizienz (Anand et al., 2004; Ezekowitz et al., 2003; Ng et al., 2015; Thorp et al., 2009). Kann eine schwere Anämie nicht kausal behandelt werden, muss sie mit Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten oder der Gabe von rekombinantem Erythropoetin therapiert werden. Beide Behandlungsoptionen gehen mit einem Risiko für weitere Nebenwirkungen und therapieassoziierten Komplikationen einher. Das genaue Verständnis der Pathogenese der medikamenteninduzierten Anämie ist daher von besonderer Bedeutung. Sowohl bei NZA als auch bei MX ist eine Anämie als Nebenwirkung beschrieben (Bobak, 2006; Kingwell et al., 2010).

PS-exponierende Erythrozyten lagern sich durch Bindung des PS an den endothelialen CXC-Chemokin-16/Scavenger-Rezeptor (CXCL16/SR-PSOX) an die Gefäßwand an und können so zu Störungen der Mikrozirkulation führen (Borst et al., 2012). Die Bindung kann durch Hemmung des CXCL16/SR-PSOX-Rezeptors durch small interfering RNA, neutralisierende Antikörper oder PS-Bildung an Annexin-V aufgehoben werden (Abed et al., 2012a; Borst et al., 2012). PS-exponierende Zellen können überdies an Thrombozyten binden. Dies führt zu einer Verstärkung der Mikrozirkulationsstörung und könnte die Bildung von Thromben unterstützen (Walker et al., 2014).

Die Tatsache, dass eine Vielzahl von häufigen Pathologien beispielsweise Sepsis, Fieber, Diabetes mellitus Typ 1 und 2, Niereninsuffizienz und Dehydratation ebenfalls begünstigend auf die Eryptose wirken und sich die Effekte theoretisch gegenseitig verstärken könnten, spielt eine Rolle in der klinischen Bewertung des Risikos bei Behandlung mit einem Eryptose-auslösenden Arzneimittel. Die Möglichkeit zur Effektverstärkung durch Kombination mehrerer Eryptose-auslösender Faktoren konnte durch die zusätzlichen Experimente unter Energieentzug und osmotischem Stress hier ebenfalls gezeigt werden.

4.5.2 Erythrozyten als Modellzelle für Apoptose

Erythrozyten haben einen sehr einfachen Aufbau. Ihnen fehlen sämtliche Organellen, insbesondere Mitochondrien. Zudem besitzen sie keinen Zellkern. Daher stellen reife humane Erythrozyten die einzigen Zellen dar, welche nicht auf klassische Apoptosesignale wie die Kultur unter Serumentzug und die Behandlung mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin reagieren (Weil et al., 1996). Trotzdem können sie durch die Eryptose einen Apoptose-ähnlichen Zelltod durchlaufen und besitzen damit die Fähigkeit, wie alle anderen humanen Zellen, ihr Überleben auf molekularer Ebene zu regulieren. Damit stellen sie ein sehr einfaches Modell zur Untersuchung Mitochondrien- und Caspasen-unabhängiger Apoptose-Mechanismen dar. Dabei zeigen auch andere Zellen Caspase-unabhängige Signalwege des programmierten Zelltodes (Lockshin et al., 2004). Die Identifikation dabei involvierter Mechanismen bilden die Grundlage zur Untersuchung ihrer Relevanz im Rahmen anderer PCD-Formen (Bratosin et al., 2001). Untersuchungen mit Erythrozyten verschiedener Spezies legen nahe, dass es sich beim programmierten Zelltod von Erythrozyten um einen konservierten Apoptose-ähnlichen Zelltod handelt. Bei dem Verlust von Zellkern und Mitochondrien in humanen Erythrozyten könnte es sich daher um eine evolutionäre Anpassung handeln (Bratosin et al., 2004). Hypothetisch stellt die Eryptose die einfachste Form des PCD dar, die potentiell auch in anderen Zellen existieren könnte. Das genaue Verständnis der zugrundeliegenden Signalwege, die Mechanismen der physiologischen Regulation und pathologischen Dysregulation und die Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung können sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der klinischen Forschung von erheblichem Nutzen sein.

4.6 Ausblick

Die Physiologie und Pathophysiologie der Eryptose wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Es konnten dabei einige Signalwege, Stimulatoren und Inhibitoren sowie die Rolle der Eryptose in der Pathogenese vergesellschafteter Krankheitsbilder aufgeklärt werden. Trotzdem sind die genauen Mechanismen insbesondere bei der hier untersuchten, durch CER ausgelösten Eryptose, nicht vollständig verstanden. Unter anderem bedarf es einer besseren Charakterisierung der in Erythrozyten für den CER-Metabolismus verantwortlichen Enzyme, der genaueren Aufklärung der involvierten Signalwege, sowie der Aufklärung der physiologischen Rolle der CER-Homöostase in gesunden Zellen. Aus dem genaueren Verständnis könnten sich sowohl neue Erkenntnisse über die Regulation des Zelltodes in Erythrozyten als auch in kernhaltigen Zellen ergeben. Diese wären sowohl für das bessere Verständnis der vergesellschafteten Krankheitsbilder, als auch für die Entwicklung spezifischer Therapieansätze von weitreichendem Nutzen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Substanzen NZA und MX Eryptose auslösen können. Aus den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen kann die Hypothese formuliert werden, dass die Substanzen auch bei klinischem Gebrauch Eryptose auslösen und die als unerwünschte Arzneimittelwirkung beobachtete Anämie bedingen. Um dies zu untersuchen sollten prospektive, klinische Studien geplante werden. Auch die Fähigkeit zur Stimulation der CER-Synthese durch NZA und MX sollte durch weitere Untersuchungen an kernhaltigen Zellen erforscht werden, da sich daraus neue Erkenntnisse über die pro-apoptischen Effekte dieser Substanzen ergeben können.

5 Zusammenfassung

Reife, humane Erythrozyten besitzen weder einen Zellkern noch Organellen, trotzdem sind sie befähigt einen zellulären Prozess, ähnlich der Apoptose kernhaltiger Zellen zu durchlaufen, an dessen Ende der suizidale Zelltod steht. Dieser Prozess wird in Anlehnung an die Apoptose auch als Eryptose bezeichnet. Charakteristische Merkmale der Eryptose sind der Zusammenbruch der Phosphatidylserin (PS) -Asymmetrie mit Exposition von PS auf der äußeren Erythrozytenmembran, die Zellschrumpfung durch Öffnung von Membrankanälen sowie die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Im Gegensatz zur Zellyse können alte bzw. geschädigte Zellen über diesen Mechanismus ohne Freisetzung der intrazellulären Substanzen abgebaut werden. Somit liegt nahe, dass es sich bei der Eryptose um einen physiologischen Prozess handelt. Bei einer Vielzahl von Erkrankungen und klinischen Pathologien konnte eine gesteigerte Eryptose nachgewiesen werden. Eine Überschreitung der Kompensationskapazität führt zur Anämie. Darüber hinaus konnte eine Simulation der Eryptose auch durch eine Vielzahl von Xenobiotika gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden die Substanzen Nitazoxanid (NZA) / Tizoxanid (TIZ) und Mitoxantron (MX) bezüglich ihrer Fähigkeit zur Stimulation der Eryptose *in vitro* untersucht. NZA und dessen aktiver Metabolit TIZ sind Antiparasitika aus der Gruppe der 5-Nitrothiazolyl-Salicylamid-Derivate. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte ein signifikanter Anstieg der PS-Externalisierung und eine Verminderung der Zellgröße in Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation mit NZA ab einer Konzentration von 10 µg / ml nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anstieg der PS-Externalisierung durch TIZ konnte nach 48-stündiger Inkubation ab einer Konzentration von 20 µg / ml gezeigt werden. Bei der PS-Externalisierung und der Zellschrumpfung handelt es sich um charakteristische Merkmale der Eryptose. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums wurde nicht beobachtet. Als zugrundeliegender Signalweg konnte die Stimulation der Ceramide (CER) - Bildung, einem bekannter Stimulator der Eryptose, durch NZA nachgewiesen werden.

MX ist ein Chemotherapeutikum der Gruppe der Anthracendione. Es konnte ein Anstieg der PS-Externalisierung und eine Zellschrumpfung nach 48-stündiger Inkubation mit MX ab einer Konzentration von 10 µg / ml gezeigt werden. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums durch MX konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Als zugrundeliegender Signalweg legen die Experimente eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Stimulation der CER-Bildung durch MX nahe.

Beide Substanzen sind demnach befähigt Eryptose über calciumunabhängige Wege, unter anderem durch die Stimulation der endogenen CER-Bildung, auszulösen. Es handelt sich um bislang nicht bekannte Effekte der Substanzen. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit besitzen somit weitreichende Relevanz für das Verständnis therapierassoziierter Nebenwirkung der Medikamente und die pathophysiologischen Grundlagen der Eryptose.

6 Literaturverzeichnis

- Abed, M., Artunc, F., Alzoubi, K., Honisch, S., Baumann, D., Foller, M., *et al.* (2014). Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med (Berl)*, 92(8), 871-879. doi:10.1007/s00109-014-1151-4
- Abed, M., Feger, M., Alzoubi, K., Pakladok, T., Frauenfeld, L., Geiger, C., *et al.* (2013). Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation. *Kidney Blood Press Res*, 37(6), 567-578. doi:10.1159/000355737
- Abed, M., Towhid, S. T., Mia, S., Pakladok, T., Alesutan, I., Borst, O., *et al.* (2012a). Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(9), C991-999. doi:10.1152/ajpcell.00239.2012
- Abed, M., Towhid, S. T., Shaik, N., & Lang, F. (2012b). Stimulation of suicidal death of erythrocytes by rifampicin. *Toxicology*, 302(2-3), 123-128. doi:10.1016/j.tox.2012.10.006
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., *et al.* (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Alzoubi, K., Honisch, S., Abed, M., & Lang, F. (2014). Triggering of suicidal erythrocyte death by penta-O-galloyl-beta-D-glucose. *Toxins (Basel)*, 6(1), 54-65. doi:10.3390/toxins6010054
- Anand, I., McMurray, J. J., Whitmore, J., Warren, M., Pham, A., McCamish, M. A., *et al.* (2004). Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation*, 110(2), 149-154. doi:10.1161/01.CIR.0000134279.79571.73
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., & Martinou, J. C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*, 345 Pt 2, 271-278.
- Arnold, M., Bissinger, R., & Lang, F. (2014a). Mitoxantrone-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*, 34(5), 1756-1767. doi:10.1159/000366376
- Arnold, M., Lang, E., Modicano, P., Bissinger, R., Faggio, C., Abed, M., *et al.* (2014b). Effect of nitazoxanide on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114(5), 421-426. doi:10.1111/bcpt.12171
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
- Atkinson, E. A., Barry, M., Darmon, A. J., Shostak, I., Turner, P. C., Moyer, R. W., *et al.* (1998). Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem*, 273(33), 21261-21266.
- Awojoodu, A. O., Keegan, P. M., Lane, A. R., Zhang, Y., Lynch, K. R., Platt, M. O., *et al.* (2014). Acid sphingomyelinase is activated in sickle cell erythrocytes and contributes to inflammatory microparticle generation in SCD. *Blood*, 124(12), 1941-1950. doi:10.1182/blood-2014-01-543652

- 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. doi:10.1182/blood-2003-11-3820
- Bar-Dayan, Y., Afek, A., Bar-Dayan, Y., Goldberg, I., & Kopolovic, J. (1999). Proliferation, apoptosis and thymic involution. *Tissue Cell*, *31*(4), 391-396. doi:10.1054/tice.1999.0001
- Barenholz, Y., & Thompson, T. E. (1980). Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, *604*(2), 129-158.
- Barrett-Lee, P. J., Bailey, N. P., O'Brien, M. E., & Wager, E. (2000). Large-scale UK audit of blood transfusion requirements and anaemia in patients receiving cytotoxic chemotherapy. *Br J Cancer*, *82*(1), 93-97. doi:10.1054/bjoc.1999.0883
- Basu, S., Banerjee, D., Chandra, S., & Chakrabarti, A. (2010a). Eryptosis in hereditary spherocytosis and thalassemia: role of glycoconjugates. *Glycoconj J*, *27*(7-9), 717-722. doi:10.1007/s10719-009-9257-6
- Basu, S., Banerjee, D., Ghosh, M., & Chakrabarti, A. (2010b). Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology*, *15*(4), 236-239. doi:10.1179/102453309X12583347114095
- Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., & Gil, J. (1998). Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*, *100*(1), 142-146.
- Berg, C. P., Engels, I. H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S. F., 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. doi:10.1038/sj.cdd.4400905
- Bettaieb, A., Plo, I., Mansat-De Mas, V., Quillet-Mary, A., Levade, T., Laurent, G., et al. (1999). Daunorubicin- and mitoxantrone-triggered phosphatidylcholine hydrolysis: implication in drug-induced ceramide generation and apoptosis. *Mol Pharmacol*, *55*(1), 118-125.
- Bevers, E. M., & Williamson, P. L. (2010). Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett*, *584*(13), 2724-2730. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.020
- Bhavsar, S. K., Gu, S., Bobbala, D., & Lang, F. (2011). Janus kinase 3 is expressed in erythrocytes, phosphorylated upon energy depletion and involved in the regulation of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, *27*(5), 547-556. doi:10.1159/000329956
- Birka, C., Lang, P. A., Kempe, D. S., Hoefling, L., Tanneur, V., Durantou, C., et al. (2004). Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch*, *448*(5), 471-477. doi:10.1007/s00424-004-1289-y
- Bissinger, R., Modicano, P., Alzoubi, K., Honisch, S., Faggio, C., Abed, M., et al. (2014). Effect of saponin on erythrocytes. *Int J Hematol*, *100*(1), 51-59. doi:10.1007/s12185-014-1605-z
- Boas, F. E., 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.

- Bobak, D. A. (2006). Use of nitazoxanide for gastrointestinal tract infections: treatment of protozoan parasitic infection and beyond. *Curr Infect Dis Rep*, 8(2), 91-95.
- Bookchin, R. M., Ortiz, O. E., & Lew, V. L. (1987). Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res*, 240, 193-200.
- Borst, O., Abed, M., Alesutan, I., Towhid, S. T., Qadri, S. M., Foller, M., *et al.* (2012). Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(4), C644-651. doi:10.1152/ajpcell.00340.2011
- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., & Kolesnick, R. (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 82(3), 405-414.
- Bosman, G. J., Willekens, F. L., & Werre, J. M. (2005). Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem*, 16(1-3), 1-8. doi:10.1159/000087725
- Bourbon, N. A., Yun, J., & Kester, M. (2000). Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem*, 275(45), 35617-35623. doi:10.1074/jbc.M007346200
- Brand, V., Koka, S., Lang, C., Jendrossek, V., Huber, S. M., Gulbins, E., *et al.* (2008). Influence of amitriptyline on eryptosis, parasitemia and survival of Plasmodium berghei-infected mice. *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6), 405-412. doi:10.1159/000185482
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J. P., *et al.* (2001). Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ*, 8(12), 1143-1156. doi:10.1038/sj.cdd.4400946
- Bratosin, D., Estaquier, J., Slomianny, C., Tissier, J. P., Quatannens, B., Bulai, T., *et al.* (2004). On the evolution of erythrocyte programmed cell death: apoptosis of Rana esculenta nucleated red blood cells involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Biochimie*, 86(3), 183-192. doi:10.1016/j.biochi.2004.03.003
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., *et al.* (1998). Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*, 80(2), 173-195.
- Brockmann, A., Bluwstein, A., Kogel, A., May, S., Marx, A., Tschan, M. P., *et al.* (2015). Thiazolides promote apoptosis in colorectal tumor cells via MAP kinase-induced Bim and Puma activation. *Cell Death Dis*, 6, e1778. doi:10.1038/cddis.2015.137
- Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., & Corazza, N. (2003). Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol*, 15(3), 167-176.
- Bundesärztekammer (2010). Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten

- http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/RiIiHaemotherapie2010.pdf. Zugriff: 23.08.2016
- Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T. K., & van Bruggen, R. (2012). CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*, *119*(23), 5512-5521. doi:10.1182/blood-2011-10-386805
- Cabot, M. C., Giuliano, A. E., Han, T. Y., & Liu, Y. Y. (1999). SDZ PSC 833, the cyclosporine A analogue and multidrug resistance modulator, activates ceramide synthesis and increases vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Cancer Res*, *59*(4), 880-885.
- Cabot, M. C., Giuliano, A. E., Volner, A., & Han, T. Y. (1996). Tamoxifen retards glycosphingolipid metabolism in human cancer cells. *FEBS Lett*, *394*(2), 129-131.
- Calderon-Salinas, J. V., Munoz-Reyes, E. G., Guerrero-Romero, J. F., Rodriguez-Moran, M., Bracho-Riquelme, R. L., Carrera-Gracia, M. A., *et al.* (2011). Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem*, *357*(1-2), 171-179. doi:10.1007/s11010-011-0887-1
- Canal, P., Attal, M., Chatelut, E., Guichard, S., Huguet, F., Muller, C., *et al.* (1993). Plasma and cellular pharmacokinetics of mitoxantrone in high-dose chemotherapeutic regimen for refractory lymphomas. *Cancer Res*, *53*(20), 4850-4854.
- Cappadoro, M., Giribaldi, G., O'Brien, E., Turrini, F., Mannu, F., Ulliers, D., *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.
- Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A., & Hannun, Y. A. (1999). Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem*, *274*(29), 20313-20317.
- Chan, A., & Lo-Coco, F. (2013). Mitoxantrone-related acute leukemia in MS: an open or closed book? *Neurology*, *80*(16), 1529-1533. doi:10.1212/WNL.0b013e31828cf891
- Chapman, R., Sidrauski, C., & Walter, P. (1998). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *14*, 459-485. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.459
- Charles, A. G., Han, T. Y., Liu, Y. Y., Hansen, N., Giuliano, A. E., & Cabot, M. C. (2001). Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, *47*(5), 444-450.
- Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol*, *82*(10), 1291-1303. doi:10.1016/j.bcp.2011.06.045
- Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, *1*(1), 5-15.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, *81*(4), 505-512.

- Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., *et al.* (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, *374*(6524), 733-736. doi:10.1038/374733a0
- Christian, J. A., Rebar, A. H., Boon, G. D., & Low, P. S. (1993). Senescence of canine biotinylated erythrocytes: increased autologous immunoglobulin binding occurs on erythrocytes aged in vivo for 104 to 110 days. *Blood*, *82*(11), 3469-3473.
- Clark, D. A., Butler, S. A., Braren, V., Hartmann, R. C., & Jenkins, D. E., Jr. (1981). The kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, *57*(1), 83-89.
- Clark, M. R. (1988). Senescence of red blood cells: progress and problems. *Physiol Rev*, *68*(2), 503-554.
- Clemens, M. J., van Venrooij, W. J., & van de Putte, L. B. (2000). Apoptosis and autoimmunity. *Cell Death Differ*, *7*(1), 131-133. doi:10.1038/sj.cdd.4400633
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, *326* (Pt 1), 1-16.
- Colombini, M. (2016). Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability. *J Bioenerg Biomembr*. doi:10.1007/s10863-016-9646-z
- Connor, J., Pak, C. C., & Schroit, A. J. (1994). Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem*, *269*(4), 2399-2404.
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, *2*(9), 647-656. doi:10.1038/nrc883
- Cowan, K. J., & Storey, K. B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol*, *206*(Pt 7), 1107-1115.
- Cowart, L. A., Szulc, Z., Bielawska, A., & Hannun, Y. A. (2002). Structural determinants of sphingolipid recognition by commercially available anti-ceramide antibodies. *J Lipid Res*, *43*(12), 2042-2048.
- Daleke, D. L. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*, *15*(3), 191-195. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97af7
- Damonte, G., Guida, L., Sdraffa, A., Benatti, U., Melloni, E., Forteleoni, G., *et al.* (1992). Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell Calcium*, *13*(10), 649-658.
- de Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K., & van Bruggen, R. (2014). Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol*, *5*, 9. doi:10.3389/fphys.2014.00009
- Debnath, J., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, *1*(2), 66-74.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, *388*(6639), 300-304. doi:10.1038/40901
- Dhaliwal, G., Cornett, P. A., & Tierney, L. M., Jr. (2004). Hemolytic anemia. *Am Fam Physician*, *69*(11), 2599-2606.

- Di Santo, N., & Ehrisman, J. (2013). Research perspective: potential role of nitazoxanide in ovarian cancer treatment. Old drug, new purpose? *Cancers (Basel)*, 5(3), 1163-1176. doi:10.3390/cancers5031163
- Di Santo, N., & Ehrisman, J. (2014). A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug. *Mutat Res*, 768, 16-21. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.05.005
- Dinkla, S., Wessels, K., Verdurmen, W. P., Tomelleri, C., Cluitmans, J. C., Fransen, J., *et al.* (2012). Functional consequences of sphingomyelinase-induced changes in erythrocyte membrane structure. *Cell Death Dis*, 3, e410. doi:10.1038/cddis.2012.143
- Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., & Wyllie, A. H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*, 1133(3), 275-285.
- Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., & Hannun, Y. A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 268(21), 15523-15530.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.
- Dumaswala, U. J., Wilson, M. J., Wu, Y. L., Wykle, J., Zhuo, L., Douglass, L. M., *et al.* (2000). Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radic Res*, 33(5), 517-529.
- Durantón, C., Huber, S. M., & Lang, F. (2002). Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*, 539(Pt 3), 847-855.
- Durocher, J. R., Payne, R. C., & Conrad, M. E. (1975). Role of sialic acid in erythrocyte survival. *Blood*, 45(1), 11-20.
- Durr, F. E., Wallace, R. E., & Citarella, R. V. (1983). Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treat Rev*, 10 Suppl B, 3-11.
- Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., *et al.* (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol*, 115(6), 1148-1151. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00205.x
- Eda, S., & Sherman, I. W. (2002). Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem*, 12(5-6), 373-384.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*, 594, 57-72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Ezekowitz, J. A., McAlister, F. A., & Armstrong, P. W. (2003). Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: insights from a cohort of 12 065 patients with new-onset heart failure. *Circulation*, 107(2), 223-225.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by

- phagocytes. *Cell Death Differ*, 5(7), 551-562. doi:10.1038/sj.cdd.4400404
- Fan-Minogue, H., Bodapati, S., Solow-Cordero, D., Fan, A., Paulmurugan, R., Massoud, T. F., *et al.* (2013). A c-Myc activation sensor-based high-throughput drug screening identifies an antineoplastic effect of nitazoxanide. *Mol Cancer Ther*, 12(9), 1896-1905. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1243
- Fidler, J. M., DeJoy, S. Q., & Gibbons, J. J., Jr. (1986). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol*, 137(2), 727-732.
- Finzer, P., Aguilar-Lemarroy, A., & Rosl, F. (2002). The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett*, 188(1-2), 15-24.
- Fisher, G. R., & Patterson, L. H. (1991). DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J Pharm Pharmacol*, 43(1), 65-68.
- Foller, M., Bobbala, D., Koka, S., Huber, S. M., Gulbins, E., & Lang, F. (2009a). Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem*, 24(3-4), 133-140. doi:10.1159/000233238
- Foller, M., Braun, M., Qadri, S. M., Lang, E., Mahmud, H., & Lang, F. (2010). Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. *Eur J Clin Invest*, 40(6), 534-540. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02296.x
- Foller, M., Feil, S., Ghoreschi, K., Koka, S., Gerling, A., Thunemann, M., *et al.* (2008a). Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(18), 6771-6776. doi:10.1073/pnas.0708940105
- Foller, M., Kasinathan, R. S., Koka, S., Lang, C., Shumilina, E., Birnbaumer, L., *et al.* (2008b). TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 21(1-3), 183-192. doi:10.1159/000113760
- Foller, M., Mahmud, H., Gu, S., Wang, K., Floride, E., Kucherenko, Y., *et al.* (2009b). Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death. *J Physiol Pharmacol*, 60(3), 135-143.
- Foller, M., Sopjani, M., Koka, S., Gu, S., Mahmud, H., Wang, K., *et al.* (2009c). Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *FASEB J*, 23(4), 1072-1080. doi:10.1096/fj.08-121772
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., *et al.* (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 182(1), 41-49. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200001)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7
- Fox, E. J. (2004). Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology*, 63(12 Suppl 6), S15-18.
- Fox, L. M., & Saravolatz, L. D. (2005). Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis*, 40(8), 1173-1180. doi:10.1086/428839
- Franco, R. S. (2009). The measurement and importance of red cell survival. *Am J Hematol*, 84(2), 109-114. doi:10.1002/ajh.21298

- Fries, L. F., Siwik, S. A., Malbran, A., & Frank, M. M. (1987). Phagocytosis of target particles bearing C3b-IgG covalent complexes by human monocytes and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, 62(1), 45-51.
- Garay, R., & Braquet, P. (1986). Involvement of K⁺ movements in the membrane signal induced by PAF-acether. *Biochem Pharmacol*, 35(16), 2811-2815.
- Gardos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 30(3), 653-654.
- Gatidis, S., Zelenak, C., Fajol, A., Lang, E., Jilani, K., Michael, D., *et al.* (2011). p38 MAPK activation and function following osmotic shock of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 28(6), 1279-1286. doi:10.1159/000335859
- Gatt, S. (1963). Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramides. *J Biol Chem*, 238, 3131-3133.
- Gatt, S. (1976). Magnesium-dependent sphingomyelinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 68(1), 235-241.
- Ghashghaeinia, M., Cluitmans, J. C., Akel, A., Dreischer, P., Toulany, M., Koberle, M., *et al.* (2012). The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br J Haematol*, 157(5), 606-614. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09100.x
- Greenhalgh, D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(9), 1019-1030.
- Gregory, C. D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C. A., Williams, G. T., Gordon, J., *et al.* (1991). Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature*, 349(6310), 612-614. doi:10.1038/349612a0
- Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., *et al.* (1995). FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity*, 2(4), 341-351.
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301(1), 5-17.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C. C., Ehleiter, D., Persaud, R. S., McLoughlin, M., Fuks, Z., *et al.* (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med*, 180(2), 525-535.
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2011). Many ceramides. *J Biol Chem*, 286(32), 27855-27862. doi:10.1074/jbc.R111.254359
- Harrison, H. E., Bunting, H., Ordway, N. K., & Albrink, W. S. (1947). The Pathogenesis of the Renal Injury Produced in the Dog by Hemoglobin or Methemoglobin. *J Exp Med*, 86(4), 339-356.
- Hartung, H. P., Gonsette, R., Konig, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S. P., *et al.* (2002). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet*, 360(9350), 2018-2025. doi:10.1016/S0140-6736(02)12023-X
- Heibein, J. A., Barry, M., Motyka, B., & Bleackley, R. C. (1999). Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cytochrome c release are caspase independent. *J Immunol*, 163(9), 4683-4693.

- Heinrich, M., Wickel, M., Winoto-Morbach, S., Schneider-Brachert, W., Weber, T., Brunner, J., *et al.* (2000). Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv Exp Med Biol*, 477, 305-315. doi:10.1007/0-306-46826-3_33
- Hemann, M. T., & Lowe, S. W. (2006). The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ*, 13(8), 1256-1259. doi:10.1038/sj.cdd.4401962
- Hemphill, A., Mueller, J., & Esposito, M. (2006). Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opin Pharmacother*, 7(7), 953-964. doi:10.1517/14656566.7.7.953
- Henderson, I. C., Allegra, J. C., Woodcock, T., Wolff, S., Bryan, S., Cartwright, K., *et al.* (1989). Randomized clinical trial comparing mitoxantrone with doxorubicin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 7(5), 560-571.
- Henseleit, U., Plasa, G., & Haest, C. (1990). Effects of divalent cations on lipid flip-flop in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1029(1), 127-135.
- Hermle, T., Shumilina, E., Attanasio, P., Akel, A., Kempe, D. S., Lang, P. A., *et al.* (2006). Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(4), C710-717. doi:10.1152/ajpcell.00631.2005
- Hoehn, R. S., Jernigan, P. L., Chang, A. L., Edwards, M. J., Caldwell, C. C., Gulbins, E., *et al.* (2016a). Acid Sphingomyelinase Inhibition Prevents Hemolysis During Erythrocyte Storage. *Cell Physiol Biochem*, 39(1), 331-340. doi:10.1159/000445627
- Hoehn, R. S., Jernigan, P. L., Japtok, L., Chang, A. L., Midura, E. F., Caldwell, C. C., *et al.* (2016b). Acid Sphingomyelinase Inhibition in Stored Erythrocytes Reduces Transfusion-Associated Lung Inflammation. *Ann Surg*. doi:10.1097/SLA.0000000000001648
- Hoffman, P. S., Sisson, G., Croxen, M. A., Welch, K., Harman, W. D., Cremades, N., *et al.* (2007). Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(3), 868-876. doi:10.1128/AAC.01159-06
- Hofmann, F., Ammendola, A., & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10), 1671-1676.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., & Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84(2), 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81(4), 495-504.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., & Hsueh, A. J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23), 12401-12406.
- Hu, S., Snipas, S. J., Vincenz, C., Salvesen, G., & Dixit, V. M. (1998). Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem*, 273(45), 29648-29653.

- Huber, S. M., Gamper, N., & Lang, F. (2001). Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch*, 441(4), 551-558.
- Huber, S. M., Uhlemann, A. C., Gamper, N. L., Durantou, C., Kremsner, P. G., & Lang, F. (2002). Plasmodium falciparum activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J*, 21(1-2), 22-30. doi:10.1093/emboj/21.1.22
- Hultquist, D. E., & Passon, P. G. (1971). Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome B5 and cytochrome B5 reductase. *Nat New Biol*, 229(8), 252-254.
- Jacobson, M. D., Burne, J. F., & Raff, M. C. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J*, 13(8), 1899-1910.
- Jacobson, M. D., Weil, M., & Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88(3), 347-354.
- Jaffrezou, J. P., Levade, T., Bettaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., et al. (1996). Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J*, 15(10), 2417-2424.
- Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A. E., Lee, J. Y., Nazaire, F., Pushkareva, M., et al. (1995). Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem*, 270(5), 2047-2052.
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*, 589(Pt 6), 1251-1258. doi:10.1113/jphysiol.2010.195057
- Jilani, K., Qadri, S. M., & Lang, F. (2013). Geldanamycin-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane. *Cell Physiol Biochem*, 32(6), 1600-1609. doi:10.1159/000356596
- Kaestner, L., & Bernhardt, I. (2002). Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry*, 55(1-2), 71-74.
- Kang, S. J., Wang, S., Kuida, K., & Yuan, J. (2002). Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ*, 9(10), 1115-1125. doi:10.1038/sj.cdd.4401087
- Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., & Melamed, M. R. (1981). Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids. *Biochem Pharmacol*, 30(3), 231-240.
- Kawase, M., Watanabe, M., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., Umehara, H., et al. (2002). Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody. *Biochim Biophys Acta*, 1584(2-3), 104-114.
- Kay, M. M. (1975). Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9), 3521-3525.
- Kay, M. M. (1984). Localization of senescent cell antigen on band 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18), 5753-5757.
- Kay, M. M. (1990). Senescent cell antigen, band 3, and band 3 mutations in cellular aging. *Biomed Biochim Acta*, 49(2-3), S212-217.

- Kay, M. M., Goodman, S. R., Sorensen, K., Whitfield, C. F., Wong, P., Zaki, L., *et al.* (1983). Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(6), 1631-1635.
- Kempe, D. S., Akel, A., Lang, P. A., Hermle, T., Biswas, R., Muresanu, J., *et al.* (2007). Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)*, *85*(3), 273-281. doi:10.1007/s00109-006-0123-8
- Kempe, D. S., Lang, P. A., Durantou, C., Akel, A., Lang, K. S., Huber, S. M., *et al.* (2006). Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J*, *20*(2), 368-370. doi:10.1096/fj.05-4872fje
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, *26*(4), 239-257.
- Kingwell, E., Koch, M., Leung, B., Isserow, S., Geddes, J., Rieckmann, P., *et al.* (2010). Cardiotoxicity and other adverse events associated with mitoxantrone treatment for MS. *Neurology*, *74*(22), 1822-1826. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e0f7e6
- Kitatani, K., Ildkowiak-Baldys, J., & Hannun, Y. A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal*, *20*(6), 1010-1018. doi:10.1016/j.cellsig.2007.12.006
- Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S., Niemoeller, O. M., Akel, A., Sobiesiak, M., *et al.* (2006). Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*, *290*(1), C244-253. doi:10.1152/ajpcell.00283.2005
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, *275*(5303), 1132-1136.
- Koceva-Chyla, A., Jedrzejczak, M., Skierski, J., Kania, K., & Jozwiak, Z. (2005). Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis*, *10*(6), 1497-1514. doi:10.1007/s10495-005-1540-9
- Koenig, U., Eckhart, L., & Tschachler, E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*, *285*(5), 1150-1154. doi:10.1006/bbrc.2001.5315
- Kolesnick, R., & Golde, D. W. (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell*, *77*(3), 325-328.
- Kolesnick, R. N. (1991). Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog Lipid Res*, *30*(1), 1-38.
- Kolesnick, R. N., & Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, *60*, 643-665. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.643
- Kolodziejczyk, P., Reszka, K., & Lown, J. W. (1988). Enzymatic oxidative activation and transformation of the antitumor agent mitoxantrone. *Free Radic Biol Med*, *5*(1), 13-25.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, *84*(5), 1415-1420.

- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332(6163), 462-464. doi:10.1038/332462a0
- Kucherenko, Y. V., & Lang, F. (2012). Inhibitory effect of furosemide on non-selective voltage-independent cation channels in human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 30(4), 863-875. doi:10.1159/000341464
- Lam, K. K., Zheng, X., Forestieri, R., Balgi, A. D., Nodwell, M., Vollett, S., *et al.* (2012). Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*, 8(5), e1002691. doi:10.1371/journal.ppat.1002691
- Lang, E., Bissinger, R., Gulbins, E., & Lang, F. (2015a). Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Apoptosis*, 20(5), 758-767. doi:10.1007/s10495-015-1094-4
- Lang, E., Gatidis, S., Freise, N. F., Bock, H., Kubitz, R., Lauermann, C., *et al.* (2015b). Conjugated bilirubin triggers anemia by inducing erythrocyte death. *Hepatology*, 61(1), 275-284. doi:10.1002/hep.27338
- Lang, E., & Lang, F. (2015c). Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol*, 39, 35-42. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.009
- Lang, E., & Lang, F. (2015d). Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int*, 2015, 513518. doi:10.1155/2015/513518
- Lang, E., Qadri, S. M., & Lang, F. (2012a). Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(8), 1236-1243. doi:10.1016/j.biocel.2012.04.019
- Lang, F., Abed, M., Lang, E., & Foller, M. (2014). Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal*, 21(1), 138-153. doi:10.1089/ars.2013.5747
- Lang, F., Gulbins, E., Lang, P. A., Zappulla, D., & Foller, M. (2010). Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 26(1), 21-28. doi:10.1159/000315102
- Lang, F., Lang, E., & Foller, M. (2012b). Physiology and pathophysiology of eryptosis. *Transfus Med Hemother*, 39(5), 308-314. doi:10.1159/000342534
- Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., & Wieder, T. (2006a). Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal*, 8(7-8), 1183-1192. doi:10.1089/ars.2006.8.1183
- Lang, F., & Qadri, S. M. (2012c). Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif*, 33(1-3), 125-130. doi:10.1159/000334163
- Lang, K. S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., *et al.* (2003a). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 10(2), 249-256. doi:10.1038/sj.cdd.4401144
- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M., *et al.* (2005a). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 15(5), 195-202. doi:10.1159/000086406

- Lang, K. S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P. A., Berchtold, S., *et al.* (2004a). Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, *11*(2), 231-243. doi:10.1038/sj.cdd.4401311
- Lang, K. S., Myssina, S., Lang, P. A., Tanneur, V., Kempe, D. S., Mack, A. F., *et al.* (2004b). Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl. *Am J Physiol Renal Physiol*, *286*(6), F1046-1053. doi:10.1152/ajprenal.00263.2003
- Lang, K. S., Roll, B., Myssina, S., Schittenhelm, M., Scheel-Walter, H. G., Kanz, L., *et al.* (2002). Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem*, *12*(5-6), 365-372.
- Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., Hermle, T., *et al.* (2006b). Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)*, *84*(5), 378-388. doi:10.1007/s00109-006-0058-0
- Lang, P. A., Huober, J., Bachmann, C., Kempe, D. S., Sobiesiak, M., Akel, A., *et al.* (2006c). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem*, *18*(1-3), 151-164. doi:10.1159/000095190
- Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., & Huber, S. M. (2003b). Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, *285*(6), C1553-1560. doi:10.1152/ajpcell.00186.2003
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Akel, A., Klarl, B. A., Eisele, K., Podolski, M., *et al.* (2005b). Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *372*(3), 228-235. doi:10.1007/s00210-005-0009-2
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., *et al.* (2005c). PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*, *12*(5), 415-428. doi:10.1038/sj.cdd.4401561
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Tanneur, V., Eisele, K., Klarl, B. A., Myssina, S., *et al.* (2005d). Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*, *118*(Pt 6), 1233-1243. doi:10.1242/jcs.01730
- Lang, P. A., Schenck, M., Nicolay, J. P., Becker, J. U., Kempe, D. S., Lupescu, A., *et al.* (2007). Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med*, *13*(2), 164-170. doi:10.1038/nm1539
- Liu, J., Beckman, B. S., & Foroozesh, M. (2013). A review of ceramide analogs as potential anticancer agents. *Future Med Chem*, *5*(12), 1405-1421. doi:10.4155/fmc.13.107
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, *86*(1), 147-157.
- Llesuy, S. F., & Arnaiz, S. L. (1990). Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology*, *63*(2), 187-198.
- Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Caspase-independent cell death? *Oncogene*, *23*(16), 2766-2773. doi:10.1038/sj.onc.1207514

- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, *104*(4), 487-501.
- Lopez, D. J., Egido-Gabas, M., Lopez-Montero, I., Busto, J. V., Casas, J., Garnier, M., *et al.* (2012). Accumulated bending energy elicits neutral sphingomyelinase activity in human red blood cells. *Biophys J*, *102*(9), 2077-2085. doi:10.1016/j.bpj.2012.03.020
- Lores Arnaiz, S., & Llesuy, S. (1993). Oxidative stress in mouse heart by antitumoral drugs: a comparative study of doxorubicin and mitoxantrone. *Toxicology*, *77*(1-2), 31-38.
- Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K., & Drenckhahn, D. (1985). The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science*, *227*(4686), 531-533.
- Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, *21*(3), 485-495.
- Lupescu, A., Shaik, N., Jilani, K., Zelenak, C., Lang, E., Pasham, V., *et al.* (2012). Enhanced erythrocyte membrane exposure of phosphatidylserine following sorafenib treatment: an in vivo and in vitro study. *Cell Physiol Biochem*, *30*(4), 876-888. doi:10.1159/000341465
- Lutz, H. U., Bussolino, F., Flepp, R., Fasler, S., Stammler, P., Kazatchkine, M. D., *et al.* (1987). Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(21), 7368-7372.
- Lutz, H. U., Nater, M., & Stammler, P. (1993a). Naturally occurring anti-band 3 antibodies have a unique affinity for C3. *Immunology*, *80*(2), 191-196.
- Lutz, H. U., Stammler, P., & Fasler, S. (1993b). Preferential formation of C3b-IgG complexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies. *J Biol Chem*, *268*(23), 17418-17426.
- MacDonald, G., Shi, L., Vande Velde, C., Lieberman, J., & Greenberg, A. H. (1999). Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J Exp Med*, *189*(1), 131-144.
- Maellaro, E., Leoncini, S., Moretti, D., Del Bello, B., Tanganelli, I., De Felice, C., *et al.* (2013). Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*, *50*(4), 489-495. doi:10.1007/s00592-011-0274-0
- Maguire, P. A., Prudhomme, J., & Sherman, I. W. (1991). Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, *102 Pt 2*, 179-186.
- Mahmud, H., Foller, M., & Lang, F. (2008). Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by methyl dopa. *Kidney Blood Press Res*, *31*(5), 299-306. doi:10.1159/000153250
- Mandal, D., Baudin-Creuzat, V., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Delaunay, J., Kundu, M., *et al.* (2003). Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem*, *278*(52), 52551-52558. doi:10.1074/jbc.M306914200

- 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. doi:10.1074/jbc.M506928200
- Mandal, D., Moitra, P. K., Saha, S., & Basu, J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett*, 513(2-3), 184-188.
- Mandon, E. C., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., & Sandhoff, K. (1992). Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem*, 267(16), 11144-11148.
- Manodori, A. B., Barabino, G. A., Lubin, B. H., & Kuypers, F. A. (2000). Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood*, 95(4), 1293-1300.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., *et al.* (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*, 184(3), 1155-1160.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., *et al.* (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182(5), 1545-1556.
- Martinelli Boneschi, F., Vacchi, L., Rovaris, M., Capra, R., & Comi, G. (2013). Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 5, CD002127. doi:10.1002/14651858.CD002127.pub3
- Matarrese, P., Straface, E., Pietraforte, D., Gambardella, L., Vona, R., Maccaglia, A., *et al.* (2005). Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J*, 19(3), 416-418. doi:10.1096/fj.04-2450fje
- Mathias, S., Dressler, K. A., & Kolesnick, R. N. (1991). Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(22), 10009-10013.
- McEvoy, L., Williamson, P., & Schlegel, R. A. (1986). Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(10), 3311-3315.
- McLaughlin, P., Hagemester, F. B., Romaguera, J. E., Sarris, A. H., Pate, O., Younes, A., *et al.* (1996). Fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone: an effective new regimen for indolent lymphoma. *J Clin Oncol*, 14(4), 1262-1268.
- Medema, J. P., Toes, R. E., Scaffidi, C., Zheng, T. S., Flavell, R. A., Melief, C. J., *et al.* (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol*, 27(12), 3492-3498. doi:10.1002/eji.1830271250
- Mengubas, K., Riordan, F. A., Bravery, C. A., Lewin, J., Owens, D. L., Mehta, A. B., *et al.* (1999). Ceramide-induced killing of normal and malignant human lymphocytes is by a non-apoptotic mechanism. *Oncogene*, 18(15), 2499-2506. doi:10.1038/sj.onc.1202622

- Merrill, A. H., Jr., & Jones, D. D. (1990). An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1044(1), 1-12.
- Metivier, F., Marchais, S. J., Guerin, A. P., Pannier, B., & London, G. M. (2000). Pathophysiology of anaemia: focus on the heart and blood vessels. *Nephrol Dial Transplant*, 15 Suppl 3, 14-18.
- Meyaard, L., Otto, S. A., Jonker, R. R., Mijnster, M. J., Keet, R. P., & Miedema, F. (1992). Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science*, 257(5067), 217-219.
- Michetti, M., Salamino, F., Minafra, R., Melloni, E., & Pontremoli, S. (1997). Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochem J*, 325 (Pt 3), 721-726.
- Minta, A., Kao, J. P., & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*, 264(14), 8171-8178.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi:10.1182/blood-2008-07-161166
- Morad, S. A., & Cabot, M. C. (2013). Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 13(1), 51-65. doi:10.1038/nrc3398
- Muller, J., Sidler, D., Nachbur, U., Wastling, J., Brunner, T., & Hemphill, A. (2008). Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi (GSTP1)-dependent cell death in human colon cancer cells. *Int J Cancer*, 123(8), 1797-1806. doi:10.1002/ijc.23755
- Murdock, K. C., Child, R. G., Fabio, P. F., Angier, R. B., Wallace, R. E., Durr, F. E., et al. (1979). Antitumor agents. 1. 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]-9,10-anthracenediones. *J Med Chem*, 22(9), 1024-1030.
- Myssina, S., Huber, S. M., Birka, C., Lang, P. A., Lang, K. S., Friedrich, B., et al. (2003). Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol*, 14(11), 2750-2757.
- Myssina, S., Lang, P. A., Kempe, D. S., Kaiser, S., Huber, S. M., Wieder, T., et al. (2004). Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca²⁺-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem*, 14(4-6), 241-248. doi:10.1159/000080333
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., et al. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765), 98-103. doi:10.1038/47513
- Nash, G. B., & Wyard, S. J. (1981). Erythrocyte membrane elasticity during in vivo ageing. *Biochim Biophys Acta*, 643(2), 269-275.
- Newmeyer, D. D., & Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112(4), 481-490.
- Ng, A. C., Kong, W. K., Kamperidis, V., Bertini, M., Antoni, M. L., Leung, D. Y., et al. (2015). Anaemia in patients with aortic stenosis: influence on long-term prognosis. *Eur J Heart Fail*, 17(10), 1042-1049. doi:10.1002/ejhf.297

- Nicolay, J. P., Liebig, G., Niemoeller, O. M., Koka, S., Ghashghaeinia, M., Wieder, T., *et al.* (2008). Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch*, 456(2), 293-305. doi:10.1007/s00424-007-0393-1
- Niemoeller, O. M., Akel, A., Lang, P. A., Attanasio, P., Kempe, D. S., Hermle, T., *et al.* (2006). Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 374(1), 41-49. doi:10.1007/s00210-006-0099-5
- Niemoeller, O. M., Bentzen, P. J., Lang, E., & Lang, F. (2007). Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. *Pflugers Arch*, 454(3), 427-439. doi:10.1007/s00424-007-0218-2
- Nikolova, K., Gluud, C., Grevstad, B., & Jakobsen, J. C. (2014). Nitazoxanide for chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, CD009182. doi:10.1002/14651858.CD009182.pub2
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., & Hannun, Y. A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259(5102), 1769-1771.
- Okazaki, T., Bell, R. M., & Hannun, Y. A. (1989). Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem*, 264(32), 19076-19080.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M., & Hannun, Y. A. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem*, 265(26), 15823-15831.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609-619.
- Opferman, J. T., & Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 4(5), 410-415. doi:10.1038/ni0503-410
- Paciucci, P. A., Ohnuma, T., Cuttner, J., Silver, R. T., & Holland, J. F. (1983). Mitoxantrone in patients with acute leukemia in relapse. *Cancer Res*, 43(8), 3919-3922.
- Paller, M. S. (1988). Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol*, 255(3 Pt 2), F539-544.
- Pantaleo, A., Giribaldi, G., Mannu, F., Arese, P., & Turrini, F. (2008). Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev*, 7(6), 457-462. doi:10.1016/j.autrev.2008.03.017
- Peter, M. E., & Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 10(5), 545-551.
- Peter, M. E., & Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, 10(1), 26-35. doi:10.1038/sj.cdd.4401186
- Pretorius, E., Swanepoel, A. C., Buys, A. V., Vermeulen, N., Duim, W., & Kell, D. B. (2014). Eryptosis as a marker of Parkinson's disease. *Aging (Albany NY)*, 6(10), 788-819.
- Qadri, S. M., Mahmud, H., Lang, E., Gu, S., Bobbala, D., Zelenak, C., *et al.* (2012). Enhanced suicidal erythrocyte death in mice carrying a loss-of-function mutation of the adenomatous polyposis coli gene. *J Cell Mol Med*, 16(5), 1085-1093. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01387.x

- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., & Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262(5134), 695-700.
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., & Jacobson, M. D. (1994). Programmed cell death and the control of cell survival. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 345(1313), 265-268. doi:10.1098/rstb.1994.0104
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157(5), 1415-1430. doi:10.1016/S0002-9440(10)64779-7
- Renehan, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, 322(7301), 1536-1538.
- Reszka, K., Kolodziejczyk, P., & Lown, J. W. (1986). Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of mitoxantrone: spectrophotometric and electron paramagnetic resonance studies. *J Free Radic Biol Med*, 2(1), 25-32.
- Rettig, M. P., Low, P. S., Gimm, J. A., Mohandas, N., Wang, J., & Christian, J. A. (1999). Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog. *Blood*, 93(1), 376-384.
- Reutelingsperger, C. P., & van Heerde, W. L. (1997). Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 53(6), 527-532.
- Romark Pharmaceuticals (2007). Prescribing Information Alinia®. <http://www.alinia.com/images/Alinia-Prescribing-Information.pdf>. Zugriff: 23.08.2016
- Romero, P. J., & Romero, E. A. (1999). Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells. *Cell Calcium*, 26(3-4), 131-137. doi:10.1054/ceca.1999.0063
- Rossato, L. G., Costa, V. M., Vilas-Boas, V., de Lourdes Bastos, M., Rolo, A., Palmeira, C., et al. (2013). Therapeutic concentrations of mitoxantrone elicit energetic imbalance in H9c2 cells as an earlier event. *Cardiovasc Toxicol*, 13(4), 413-425. doi:10.1007/s12012-013-9224-0
- Rossignol, J. F. (2014). Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res*, 110, 94-103. doi:10.1016/j.antiviral.2014.07.014
- Rossignol, J. F., & Cavier, R. (1976). New derivatives of 2-benzamido-5-nitro thiazoles: Google Patents.
- Rother, J., van Echten, G., Schwarzmann, G., & Sandhoff, K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 189(1), 14-20.
- Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., & Gladwin, M. T. (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*, 293(13), 1653-1662. doi:10.1001/jama.293.13.1653
- Safeukui, I., Buffet, P. A., Deplaine, G., Perrot, S., Brousse, V., Ndour, A., et al. (2012). Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood*, 120(2), 424-430. doi:10.1182/blood-2012-01-404103

- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, *391*(6662), 96-99. doi:10.1038/34214
- Santana, P., Pena, L. A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., *et al.* (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, *86*(2), 189-199.
- Sathyanarayana, P., Barthwal, M. K., Kundu, C. N., Lane, M. E., Bergmann, A., Tzivion, G., *et al.* (2002). Activation of the Drosophila MLK by ceramide reveals TNF-alpha and ceramide as agonists of mammalian MLK3. *Mol Cell*, *10*(6), 1527-1533.
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, *407*(6805), 784-788. doi:10.1038/35037722
- Schroit, A. J., Madsen, J. W., & 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.
- Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W., & Krammer, P. H. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol*, *127*(1), 15-20.
- Schwartz, R. S., Tanaka, Y., Fidler, I. J., Chiu, D. T., Lubin, B., & Schroit, A. J. (1985). Increased adherence of sickled and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to cultured human peripheral blood monocytes. *J Clin Invest*, *75*(6), 1965-1972. doi:10.1172/JCI111913
- Sekizawa, A., Samura, O., Zhen, D. K., Falco, V., Farina, A., & Bianchi, D. W. (2000). Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn*, *20*(11), 886-889.
- Senchenkov, A., Litvak, D. A., & Cabot, M. C. (2001). Targeting ceramide metabolism--a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst*, *93*(5), 347-357.
- Shaik, N., Lupescu, A., & Lang, F. (2012). Sunitinib-sensitive suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, *30*(3), 512-522. doi:10.1159/000341434
- Shimohama, S. (2000). Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. *Apoptosis*, *5*(1), 9-16.
- Sidler, D., Brockmann, A., Mueller, J., Nachbur, U., Corazza, N., Renzulli, P., *et al.* (2012). Thiazolide-induced apoptosis in colorectal cancer cells is mediated via the Jun kinase-Bim axis and reveals glutathione-S-transferase P1 as Achilles' heel. *Oncogene*, *31*(37), 4095-4106. doi:10.1038/onc.2011.575
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, *144*(2), 281-292.
- Sperandio, S., de Belle, I., & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(26), 14376-14381. doi:10.1073/pnas.97.26.14376
- Stockis, A., Deroubaix, X., Lins, R., Jeanbaptiste, B., Calderon, P., & Rossignol, J. F. (1996). Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose

- administration in 6 healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 34(8), 349-351.
- Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69, 217-245. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.217
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446. doi:10.1038/17135
- Tanaka, Y., & Schroit, A. J. (1983). Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages. *J Biol Chem*, 258(18), 11335-11343.
- Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., *et al.* (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*, 351(15), 1502-1512. doi:10.1056/NEJMoa040720
- Tepper, A. D., de Vries, E., van Blitterswijk, W. J., & Borst, J. (1999). Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *J Clin Invest*, 103(7), 971-978. doi:10.1172/JCI5457
- Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 226(4673), 466-468.
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.
- Thorp, M. L., Johnson, E. S., Yang, X., Petrik, A. F., Platt, R., & Smith, D. H. (2009). Effect of anaemia on mortality, cardiovascular hospitalizations and end-stage renal disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 14(2), 240-246. doi:10.1111/j.1440-1797.2008.01065.x
- Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., & Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5), 2799-2801. doi:10.1210/endo-129-5-2799
- Totino, P. R., Daniel-Ribeiro, C. T., & Ferreira-da-Cruz Mde, F. (2011). Refractoriness of eryptotic red blood cells to Plasmodium falciparum infection: a putative host defense mechanism limiting parasitaemia. *PLoS One*, 6(10), e26575. doi:10.1371/journal.pone.0026575
- Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 735-747. doi:10.1038/nri911
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228(4706), 1440-1443.
- Turrini, F., Arese, P., Yuan, J., & Low, P. S. (1991). Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *J Biol Chem*, 266(35), 23611-23617.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., *et al.* (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor

- XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, 9(1), 20-26. doi:10.1038/sj.cdd.4400970
- Van Noorden, C. J. (2001). The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem*, 103(3), 241-251. doi:10.1078/0065-1281-00601
- Vandenbergh, P. A., & Ceuppens, J. L. (1990). Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3, a new fluorescent calcium indicator. *J Immunol Methods*, 127(2), 197-205.
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), 440-442. doi:10.1038/335440a0
- Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A., & Obeid, L. M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem*, 270(51), 30701-30708.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., *et al.* (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43-53.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., *et al.* (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 380(6569), 75-79. doi:10.1038/380075a0
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1), 39-51.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, 15(6), 388-400. doi:10.1038/nri3839
- Vota, D. M., Crisp, R. L., Nesse, A. B., & Vittori, D. C. (2012). Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. *J Cell Biochem*, 113(5), 1581-1589. doi:10.1002/jcb.24026
- Walker, B., Towhid, S. T., Schmid, E., Hoffmann, S. M., Abed, M., Munzer, P., *et al.* (2014). Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to immobilized platelets via platelet phosphatidylserine receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(3), C291-297. doi:10.1152/ajpcell.00318.2013
- Wallace-Brodeur, R. R., & Lowe, S. W. (1999). Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci*, 55(1), 64-75.
- Weber, Y. G., Storch, A., Wuttke, T. V., Brockmann, K., Kempfle, J., Maljevic, S., *et al.* (2008). GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest*, 118(6), 2157-2168. doi:10.1172/JCI34438
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., *et al.* (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517), 727-730. doi:10.1126/science.1059108

- Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D., *et al.* (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol*, 133(5), 1053-1059.
- Weil, M., Jacobson, M. D., & Raff, M. C. (1998). Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci*, 111 (Pt 18), 2707-2715.
- Weiss, E., Cytlak, U. M., Rees, D. C., Osei, A., & Gibson, J. S. (2012). Deoxygenation-induced and Ca(2+) dependent phosphatidylserine externalisation in red blood cells from normal individuals and sickle cell patients. *Cell Calcium*, 51(1), 51-56. doi:10.1016/j.ceca.2011.10.005
- White, C. A., Jr. (2004). Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2(1), 43-49.
- Willekens, F. L., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., Bos, H. J., Bosman, G. J., van den Bos, A. G., *et al.* (2003). Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood*, 101(2), 747-751. doi:10.1182/blood-2002-02-0500
- Willekens, F. L., Werre, J. M., Kruijt, J. K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., van den Bos, A. G., *et al.* (2005). Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*, 105(5), 2141-2145. doi:10.1182/blood-2004-04-1578
- Worthington, D. J., & Rosemeyer, M. A. (1976). Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *Eur J Biochem*, 67(1), 231-238.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756), 555-556.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Yamaguchi, S., & Suzuki, K. (1978). A novel magnesium-independent neutral sphingomyelinase associated with rat central nervous system myelin. *J Biol Chem*, 253(12), 4090-4092.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., *et al.* (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275(5303), 1129-1132.
- Young, P. R., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M. L., McNulty, D., *et al.* (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*, 272(18), 12116-12121.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652.
- Yuan, J., & Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407(6805), 802-809. doi:10.1038/35037739
- Zelenak, C., Eberhard, M., Jilani, K., Qadri, S. M., Macek, B., & Lang, F. (2012). Protein kinase CK1alpha regulates erythrocyte survival. *Cell Physiol Biochem*, 29(1-2), 171-180. doi:10.1159/000337598
- Zelenak, C., Foller, M., Velic, A., Krug, K., Qadri, S. M., Viollet, B., *et al.* (2011). Proteome analysis of erythrocytes lacking AMP-activated protein kinase

- reveals a role of PAK2 kinase in eryptosis. *J Proteome Res*, 10(4), 1690-1697. doi:10.1021/pr101004j
- Zhang, J., Alter, N., Reed, J. C., Borner, C., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (1996). Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11), 5325-5328.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., *et al.* (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell*, 89(1), 63-72.
- Zhao, Z., Xue, F., Zhang, L., Zhang, K., Fei, C., Zheng, W., *et al.* (2010). The pharmacokinetics of nitazoxanide active metabolite (tizoxanide) in goats and its protein binding ability in vitro. *J Vet Pharmacol Ther*, 33(2), 147-153. doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01119.x
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-413.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274(17), 11549-11556.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Physiologischen Institut der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Florian Lang durchgeführt. Die gesamte Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. F. Lang und Herrn Dr. Majed Abed.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. Majed Abed und Rosi Bissinger von mir eigenständig durchgeführt. Lediglich die Messungen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Mitoxantron und die Messungen der Fluo3-Fluoreszenz mit Ionomycin wurden in Zusammenarbeit mit Frau Rosi Bissinger durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 30.08.2016

Markus Arnold

[Unterschrift]

8 Veröffentlichungen

Arnold, M., Bissinger, R., & Lang, F. (2014a). Mitoxantrone-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*, 34(5), 1756-1767. doi:10.1159/000366376

Arnold, M., Lang, E., Modicano, P., Bissinger, R., Faggio, C., Abed, M., *et al.* (2014b). Effect of nitazoxanide on erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114(5), 421-426. doi:10.1111/bcpt.12171

Lang, E., Modicano, P., Arnold, M., Bissinger, R., Faggio, C., Abed, M., *et al.* (2013). Effect of thioridazine on erythrocytes. *Toxins (Basel)*, 5(10), 1918-1931. doi: 10.3390/toxins5101918

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn Prof. Dr. Florian Lang für die hervorragende Betreuung und Bereitstellung des interessanten Themas.

Herrn Dr. Majed Abed für die engagierte Betreuung der experimentellen Laborarbeit und die fortlaufende Unterstützung bei Problemen jeglicher Art und Frau Rosi Bissinger für die kollegiale Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der experimentellen Tätigkeit.

Meiner Laborpartnerin Paola Modicano insbesondere für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Labortätigkeit.

Allen Mitgliedern des physiologischen Institutes für Ihre Hilfsbereitschaft und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Laura Eichler und meinem Bruder Frederic Arnold für die persönliche Unterstützung und ihren professionellen Rat bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen Eltern und Freunden für den besonderen Rückhalt während der gesamten Zeit meines Studiums.