

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Abteilung für Vegetative und Klinische Physiologie

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

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

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

vorgelegt von

Stockinger, Katja Jane

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Borrmann

3. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lipp

Tag der Disputation: 29.04.2019

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Apoptose	3
2.1.1 Morphologische Merkmale der Apoptose	4
2.1.2 Ablauf der Apoptose	6
2.1.2.1 Der extrinsische Signalweg	7
2.1.2.2 Der intrinsische Signalweg	8
2.1.2.3 Der alternativ intrinsische Signalweg	9
2.1.3 Regulationsmechanismen der Apoptose	10
2.1.3.1 Todesrezeptoren und DISC	10
2.1.3.2 Die Bcl-2 Proteinfamilie	11
2.1.3.3 Kaspasenregulation	12
2.1.3.4 Ceramide	13
2.2 Erythrozyten	14
2.2.1 Erythropoese	16
2.2.2 Aufbau der Erythrozytenmembran	17
2.3 Eryptose	18
2.3.1 Signalwege der Eryptose	19
2.3.2 Inhibitoren der Eryptose	21
2.3.3 Anämie	22
2.3.4 Eryptose in Krankheiten	23
2.4 Carnosolsäure	25
3 Ziel der Dissertation	28
4 Material	29
4.1 Erythrozyten	29
4.2. Verwendete Substanzen	30
4.2.1 Carnosolsäure	30
4.2.2 Annexin V	30
4.2.3 Fluo-3-Acetoxymethylester	31
4.2.4 DCFDA	31
4.2.5 Antikörper	32
4.3 Verwendete Lösungen	33
4.3.1 Ringerlösung	33
4.3.2 Kalziumfreie Ringerlösung	34
4.3.3 Waschpuffer	34
4.3.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung und BSA	35
5 Methoden	37
5.1 Durchflusszytometrie	37

5.2 Annexin-V-Bindung und Vorwärtsstreulicht	38
5.3 Eryptose im kalziumfreien Medium	38
5.4 Messung des intrazellulären Kalziums durch Fluo-3.....	39
5.5 Ceramide-Messung.....	39
5.6 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies	40
5.7 Messung der Hämolyse.....	41
5.7 Statistik.....	41
6 Ergebnisse.....	43
6.1 Annexin-V-Bindung	43
6.2 Messung des Vorwärtsstreulichts.....	45
6.3 Messung des intrazellulären Kalziums	47
6.4 Eryptose im kalziumfreien Medium.....	49
6.5 Ceramide-Messung.....	52
6.6 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies	53
6.7 Messung der Hämolyse.....	55
7 Diskussion	57
7.1 Diskussion der Methoden	57
7.2 Diskussion der Ergebnisse.....	58
8 Zusammenfassung.....	62
9 Literaturverzeichnis	64
10 Veröffentlichungen.....	80
11 Erklärung zum Eigenanteil	81
12 Danksagungen.....	82

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated Proteinkinase
ANOVA	Varianzanalyse
APAF1	Apoptotischer Proteaseaktivierender Faktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2-antagonist-killer
Bax	B-Zell-assoziiertes X-Protein
Bbc3	Bcl-2 binding component 3
Bcl2	B-Zell-Lymphoma 2
BH3	Bcl-2-homologe Domäne 3
Bid	BH3-interagierender Domänenantagonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
BSA	Rinderserum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD95	Cluster of Differentiation 95
cFLIP	Cellular FLICE-inhibitory Protein
CrmA	Cytokin Response Modifier A
DCFDA	2-7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR3	Todesrezeptor 3

DR6	Todesrezeptor 6
EDAR	Ectodysplasin A Rezeptor
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated death domain Protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
γ	Gamma
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hrk	Apoptoseaktivator Harakiri
HUS	Hämolytisch Uremisches Syndrom
H ₂ O	Wasser
IFN – γ	Interferon Gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
INNO-406	Bafetinib
KCl	Kaliumchlorid
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid
NGFR	Nervenwachstumsfaktor Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
P35	Protein 35
P53	Tumorsuppressorprotein 53
PAF	Platelet Activating Factor
PBF	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Rcf	Relative Centrifugal Force
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Revolutions per Minute
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler
SERP2	Serin Protease Inhibitor Protein 2
TNF – α	Tumornekrosefaktor Alpha
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TRAILR1	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1
TRAILR2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2
UPR	Unfolded Protein Response
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
V-FLIP	Viral FLICE-like inhibitory Protein
WHO	World Health Organization
YM155	Sepantronium Bromide

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Carnosolsäure (Oh et al., 2012).....	25
Abbildung 2: Effekt von Carnosolsäure auf die Phosphatidylserinexposition: Fluoreszenz-Histogramm (Stockinger et al., 2015).....	44
Abbildung 3: Konzentrationsabhängiger Effekt von Carnosolsäure auf die Phosphatidylserinexposition (Stockinger et al., 2015)	44
Abbildung 4: Effekt von Carnosolsäure auf Erythrozyten Forward Scatter: Histogramm (Stockinger et al., 2015)	45
Abbildung 5: Konzentrationsabhängiger Effekt von Carnosolsäure auf Erythrozyten Forward Scatter (Stockinger et al., 2015)	46
Abbildung 6: Effekt von Carnosolsäure auf intrazelluläre Kalziumaktivität: Histogramm (Stockinger et al., 2015)	47
Abbildung 7: Konzentrationsabhängiger Effekt von Carnosolsäure auf intrazelluläre Kalziumaktivität (Stockinger et al., 2015)	48
Abbildung 8: Kalziumsensitivität der von Carnosolsäure hervorgerufenen Phosphatidylserinexposition (Stockinger et al., 2015)	50
Abbildung 9: Kalziumsensitivität der von Carnosolsäure hervorgerufenen Zellschrumpfung (Stockinger et al., 2015)	51
Abbildung 10: Wirkung von Carnosolsäure auf Ceramide-Anreicherung (Stockinger et al., 2015)	52
Abbildung 11: Wirkung von Carnosolsäure auf Ceramide-Anreicherung: Histogramm (Stockinger et al., 2015)	53
Abbildung 12: Wirkung von Carnosolsäure auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Erythrozyten: Histogramm (Stockinger et al., 2015)	54
Abbildung 13: Wirkung von Carnosolsäure auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Erythrozyten (Stockinger et al., 2015).....	55
Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Wirkung von Carnosolsäure auf die Hämolyse (Stockinger et al., 2015)	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Ringerlösung	33
Tabelle 2: Zusammensetzung der kalziumfreien Ringerlösung	34
Tabelle 3: Zusammensetzung des Waschpuffers.....	35
Tabelle 4: Zusammensetzung gepufferten Kochsalzlösung	35

1 Einleitung

Im Laufe ihrer Reifung verlieren Erythrozyten Mitochondrien, Nucleus und andere Organellen (Gronowicz et al., 1984). Diese Bestandteile der Zelle sind für den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, unabdingbar. Aus diesem Grund glaubte man für viele Jahre, Erythrozyten seien nicht in der Lage, ein suizidales Programm auszuführen und könnten daher nur über Milz und Leber physiologisch abgebaut werden. 2001 wurde durch Versuche jedoch bewiesen, dass selbst ausgereifte Erythrozyten über ein suizidales Programm verfügen (Bratosin et al., 2001). Dieser Vorgang wird seitdem im physiologischen Institut unter der Aufsicht von Prof. Dr. Lang in Tübingen erforscht. Da das suizidale Programm der Erythrozyten Unterschiede zur Apoptose der zellkernhaltigen Zellen aufweist, wird das suizidale Programm der Erythrozyten seit dem Jahr 2005 Eryptose genannt (K. S. Lang et al., 2005a).

Blut erfüllt im Körper eine Vielzahl von überlebenswichtigen Aufgaben. Hierzu gehören der Transport von Sauerstoff zu den körpereigenen Zellen, der Abtransport von Stoffwechselprodukten, die Thermoregulation, der Transport von Nährstoffen, sowie die Immunabwehr und die pH-Regulation (Jelkmann, 2007).

Blut ist zusammengesetzt aus festen, zellulären Bestandteilen, dem sogenannten Hämatokrit, und Blutplasma, welches hauptsächlich aus Wasser besteht und Proteine, Zucker, Elektrolyte, Kohlenstoffdioxid und Salze enthält (Cohn et al., 1946). Der Hämatokrit lässt sich in Erythrozyten, welche Sauerstoff binden, sodass dieser transportiert werden kann, Leukozyten, die für die Immunabwehr unabdingbar sind, und Thrombozyten, welche bei der Blutstillung eine wichtige Rolle einnehmen, einteilen (Jelkmann, 2007).

Jeder Bestandteil des Blutes erfüllt somit eine wichtige Aufgabe. Funktionseinschränkungen der Bestandteile oder Verschiebungen des Gleichgewichts sind somit mit dem Leben nur schwer oder gar nicht vereinbar. Sinkt die Anzahl der funktionsfähigen Erythrozyten, so führt dies zum

Krankheitsbild der Anämie. Der Körper wird unzureichend mit Sauerstoff versorgt.

Bereits in der Veröffentlichung über die Entdeckung des suizidalen Zelltodes der Erythrozyten im Jahr 2001 beschrieben Bratosin et al., dass man durch Eingreifen in dieses Suizidprogramm mittels Medikamenten auch in das Überleben von Erythrozyten eingreifen könne (Bratosin et al., 2001).

Mittlerweile sind viele Substanzen bekannt, welche die Eryptose hervorrufen oder verhindern können.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Auswirkung von Carnosolsäure auf den suizidalen Zelltod von Erythrozyten untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Apoptose

Der Begriff der Apoptose beschreibt den suizidalen Zelltod, welcher nach einem genetischen Programm abläuft.

Der Pathologe und Biologe Rudolf Virchow beschrieb erstmals diesen Vorgang. Virchow nannte den Vorgang damals Nekrobiose und stellte ihn der Nekrose gegenüber (Gerschenson & Geske, 2001). Im Jahr 1972 wurde von J.F.R. Kerr et al. der Begriff der Apoptose vorgeschlagen (Kerr et al., 1972). Der Begriff „Apoptose“ stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Worten „apo“ und „ptosis“ zusammen, was zu „weg“ und „Fall“ übersetzt werden kann. Der Name spielt darauf an, dass der physiologische Untergang der Zellen an das Wegfallen der Blätter im Herbst erinnert, einen funktionellen und gewünschten Vorgang.

Apoptose spielt eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im sich kontinuierlich erneuernden Gewebe (Gavrieli et al., 1992). Durch den programmierten Zelltod werden auch entartete Zellen entfernt. Tritt durch die genetischen Veränderungen dieser Zellen das Suizidprogramm außer Kraft, so wird die Gewebegröße des Zellverbandes nicht mehr selbstständig kontrolliert, was zur Entstehung von Krebserkrankungen beiträgt (Bodey et al., 1998).

Der programmierte Zelltod ist ebenfalls wichtig für die embryonale Zellproliferation und –differenzierung (Haanen & Vermes, 1996). Auch in der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen ist Apoptose durch Aussortieren autoreaktiver Zellen essentiell (Favaloro et al., 2012).

Geht eine geschädigte Zelle durch Nekrose statt Apoptose zu Grunde, so entleert sich ihr zellulärer Inhalt ins Interstitium. Dies führt zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes und zu Entzündungsreaktionen. Aus diesem Grund

ist es von Vorteil, dass geschädigte Zellen ebenfalls ihr Suizidprogramm aktivieren (Bodey et al., 1998).

Tritt Apoptose jedoch verstärkt auf, so können Krankheitsbilder entstehen: Bei der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung, Alzheimer, ist eine vermehrte Apoptose zu beobachten (Rohn, 2010). Auch in der zweithäufigsten neurodegenerativen Erkrankung, Parkinson, konnte im Tierversuch eine erhöhte Aktivität der Kaspase 3, ein für die Apoptose wichtiges Enzym, nachgewiesen werden (Samantaray et al., 2007). Diese zwei Krankheiten sind nur beispielhaft für die vielen, durch Apoptose gekennzeichneten Krankheitsbilder zu nennen.

Apoptose stellt somit einen lebenswichtigen Vorgang dar, welcher vom Körper jedoch strikt reguliert werden muss, da sowohl eine vermehrte, als auch eine verminderte Apoptoserate zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass der suizidale Zelltod in der Forschung großes Interesse geweckt hat. Man möchte ihn besser verstehen um durch dieses Wissen in Krankheitsverläufe eingreifen können.

2.1. 1 Morphologische Merkmale der Apoptose

Morphologisch müssen zwei Hauptarten von Zelltod unterschieden werden: Apoptose und Nekrose. Während Nekrose wie in 2.1 beschrieben unerwünscht zu Entzündungsreaktionen führt, ist der programmierte Zelltod reguliert und es kommt durch Phagozytose der Zellbestandteile nicht zur Schädigung des umliegenden Gewebes (Kerr et al., 1994; Ziegler & Groscurth, 2004).

Die morphologischen Veränderungen lassen sich in zwei Stadien einteilen: Im ersten Stadium trennt sich die Zelle aus dem Gewebeverband und kondensiert bis sie fragmentiert. Im zweiten Stadium werden diese Vesikel phagozytiert und durch Lysozyme abgebaut (Kerr et al., 1972).

Im Nucleus findet eine Verdichtung und Fragmentierung des Chromatins statt (Ziegler & Groscurth, 2004). Der Nucleus fragmentiert ebenfalls, wobei die einzelnen Fragmente des Chromatins in den Nucleusfragmenten eine charakteristische Halbmondform annehmen (Majno & Joris, 1995).

Die Zelle schnürt nun durch Membranausstülpung einzelne Vesikel, sogenannte apoptotische Körper, ab (Kerr et al., 1994). Dieser Vorgang wird als „Membran-Blebbing“ bezeichnet (Mills et al., 1998). Wichtig für die Schonung des umliegenden Gewebes ist, dass beim Blebbing die Integrität der Zellmembran im Gegensatz zum nekrotischen Zelluntergang erhalten bleibt, weshalb der Inhalt der Vesikel nicht ins Interstitium gelangt (van Engeland et al., 1998).

Damit Blebbing stattfinden kann, werden die Proteine des Zytoskeletts, vor allem Aktin, von Kaspasen gespalten (Kayalar et al., 1996). Die Größe der beim Blebbing gebildeten apoptotischen Körperchen ist abhängig von der Konzentration filamentären Aktins (=F-Aktin) in der Zelle (Cunningham, 1995).

Der Inhalt der apoptotischen Körper ist sehr unterschiedlich: Manche Vesikel enthalten fast ausschließlich kondensiertes Chromatin, während andere nur Zytoplasma enthalten (Kerr et al., 1972).

Phagozyten erkennen die apoptotischen Körper durch die Phosphatidylserinexposition an ihrer Membranaußenseite, welches sich bei gesunden Zellen lediglich auf der Innenseite der Zellmembran befindet (Grimsley & Ravichandran, 2003; Savill et al., 1993). Rezeptoren der Makrophagen binden an das exponierte Phosphatidylserin, woraufhin die Phagozytose eingeleitet wird (Henson et al., 2001; Rubartelli et al., 1997).

Durch das Binden von Phosphatidylserin an den Rezeptor wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN – γ und TNF – α inhibiert (Fadok et al., 2001).

Stattdessen setzen die Phagozyten Interleukin-10 frei, welches als anti-inflammatorisches Zytokin eine Entzündung unterbindet (Voll et al., 1997).

2.1.2 Ablauf der Apoptose

Der programmierte Zelltod kann über viele verschiedene Stimuli initiiert werden: Hierzu gehören das Binden von Liganden an Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Gruppe, Beschädigung der Integrität der DNA, Strahlung oder große Veränderungen der Homöostase der Zelle (Ziegler & Groscurth, 2004).

Da Apoptose in der Homöostase des Gewebes eine wichtige Rolle spielt und ein Ansatz für die moderne Tumorthherapie (Kerr et al., 1972) darstellt, werden die Abläufe des programmierten Zelltodes intensiv erforscht.

Allgemein lassen sich zwei Hauptsignalwege unterscheiden: Der extrinsische Signalweg über einen Todesrezeptor und der intrinsische, mitochondrial vermittelte Signalweg (Elmore, 2007). In beiden Signalwegen werden aspartat-spezifische Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum, sogenannte Kaspasen, aktiviert, welche den Zelltod vermitteln (Cryns & Yuan, 1998).

Sobald Kaspasen durch ein Signal aktiviert werden, können diese weitere Kaspasen aktivieren und somit die Proteinaseaktivität durch eine Kaskade verstärken (Fulda & Debatin, 2006).

Mit der Aktivierung der Kaspasen 3, 6 und 7 wird die sogenannte „Exekutionsphase“ der Apoptose eingeleitet (Elmore, 2007). Diese aktivierten Kaspasen führen durch die Spaltung wichtiger Proteine den Zelltod herbei (Earnshaw, 1995). Kaspase 3 spaltet die meisten unterschiedlichen Proteine und Versuche haben gezeigt, dass sie während der Apoptose in den Nucleus transloziert wird und dort für die Fragmentierung des Chromatin sorgt (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998).

Der extrinsische und intrinsische Signalweg sind nicht komplett getrennt zu betrachten, da sie auf einander Einfluss nehmen können. Zum Beispiel kann die Kaspase 8, welche im extrinsischen Signalweg aktiviert wird, den mitochondrialen Signalweg aktivieren, was das Todessignal der Zelle verstärkt (Igney & Krammer, 2002). Um dies zu erreichen spaltet Kaspase 8 Bid, welches mit Bcl2 und Bax, zwei wichtigen Proteinen des intrinsischen Signalweges, interagiert (Luo et al., 1998). Des Weiteren werden zwar zu Beginn der

Signalwege unterschiedliche Initiator-kaspasen aktiviert, jedoch laufen beide Wege bei der Aktivierung der Kaspasen 3, 6 und 7 zusammen (Elmore, 2007).

2.1.2.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird aktiviert, wenn ein Ligand an einen Todesrezeptor der Zellmembran bindet (S. Wang & El-Deiry, 2003). Es werden acht Hauptmitglieder der Familie der Todesrezeptoren unterschieden: Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (= TNFR1), CD95 (=Fas-Rezeptor), DR3, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (= TRAILR1), TRAILR2, DR6, Ectodysplasin A Rezeptor (= EDAR), und Nerve Growth Factor Rezeptor (= NGFR) (French & Tschopp, 2003; Wajant, 2003).

Diese Rezeptoren haben eine sogenannte „Todesdomäne“, welche aus Aminosäuren besteht und für die Weiterleitung des Todessignals eine entscheidende Rolle spielt (Sartorius et al., 2001).

Bindet der Ligand an den Rezeptor, werden die Initiator-Kaspasen 8 und 10 rekrutiert und aktiviert (Guicciardi & Gores, 2009). Um diese Kaspasen zu rekrutieren binden zuerst mehrere intrazelluläre Proteine und Prokaspasen an den Rezeptor-Liganden-Komplex und bilden gemeinsam den Death-Inducing Signaling Complex (=DISC, Todeskomplex) (Medema et al., 1997). Unter diesen Proteinen muss sich das Fas-associated death domain Protein (=FADD) befinden um Kaspase 8 zu aktivieren (Hughes et al., 2016). Cellular FLICE-inhibitory protein (=cFLIP) spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptoseregulation. Ist cFLIP in großen Mengen intrazellulär vorhanden, so kann es durch Bindung an FADD den Todeskomplex inaktivieren und somit die Apoptose aufhalten (Irmeler et al., 1997).

Die aktivierten Kaspasen 8 und 10 aktivieren die Kaspasen 3 und 7 (Hughes et al., 2016). Kaspase 3 kann die Kaspasen 8 und 9 aktivieren, wodurch es zu

einem selbstverstärkenden Aktivierungsloop der Kaspasen kommt (Wajant, 2003).

2.1.2.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch Stimulation der Mitochondrienmembran initiiert (Igney & Krammer, 2002). Diese Stimulation erfolgt in der Regel durch Mangel an Wachstumsfaktoren, Etoposide, Actinomycin D, ultraviolette Strahlung, Staurosporine, erzwungene c-Myc-Expression oder Glukokortikoide (Green & Reed, 1998).

Das Mitochondrium setzt auf diese Reize hin Cytochrom c und andere apoptogene Faktoren ins Zytosol frei (Shimizu et al., 1999). Um die Membran der Mitochondrien für diese Substanzen durchgängig zu machen, spielt die Bcl-2-Familie (=B-Cell Lymphoma 2) eine große Rolle. Es gibt sowohl pro- als auch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie (Adams & Cory, 1998). Zu den pro-apoptotischen Proteinen dieser Familie gehören unter Anderem Bax, Bok, Bak und Bbc3, zu den anti-apoptotischen gehören Bcl-2, Bel-w, Mcl -1 und Bfl-1 (Martinou & Youle, 2011). Die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine lassen sich weiter unterteilen in multiregionale Proteine, welche durch Porenbildung die äußere Mitochondrienmembran direkt durchgängiger machen und BH3 Proteine, welche diese porenformenden Bcl-2 Proteine und andere Kanäle aktivieren (Shamas-Din et al., 2013).

Versuche haben gezeigt, dass gesunde Zellen sowohl pro- als auch anti-apoptotische Bcl-2 Proteine exprimieren. Die anti-apoptotischen Proteine inaktivieren die Funktion der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine, indem sie Aktivator-BH3 Proteine an ihrer BH3-spezifischen Domäne binden (Chipuk & Green, 2008). Soll die Apoptose eingeleitet werden, so binden die Sensibilisator-BH3 Proteine Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk und Bnip3 an die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine, welche die Aktivator-BH3 Proteine freigeben (Chipuk & Green, 2008; Kuwana et al., 2005).

Die Bcl-2 Proteine wirken ebenfalls auf die Membran des endoplasmatischen Retikulum (=ER), indem sie Kalziumkanäle aktivieren. Die erhöhte Menge an Kalzium kann zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führen, woraufhin Cytochrom c ebenfalls freigesetzt wird (Kuwana & Newmeyer, 2003). Im Zytosol bildet Cytochrom c mit dem Apoptotic Protease Activating Factor-1 (= APAF1), ATP und der inaktiven Prokaspase 9 einen Komplex, welcher Apoptosom genannt wird (Igney & Krammer, 2002). Durch Dimerisierung aktiviert das Apoptosom die Initiator-kaspase 9 (Pop et al., 2006). Kaspase 9 aktiviert wiederum die Exekutionskapsasen 3 und 7 und die Kapsasen 2, 6, 8 und 10 (Slee et al., 1999).

2.1.2.3 Der alternativ intrinsische Signalweg

Neben den beiden Hauptsignalwegen, kann auch das Endoplasmatische Retikulum bei ER-Stress die Apoptose vermitteln (Sano & Reed, 2013).

In den Ribosomen des rauhen ER findet die Translation der Proteinbiosynthese statt, während im glatten ER die postrtranslationale Modifikation stattfindet. Ist die Kapazität des ER, Proteine zu synthetisieren und modifizieren eingeschränkt oder überstiegen, so versucht die Zelle diesen ER-Stress über Aktivierung des Unfolded Protein Response (=UPR) Signalweges zu lindern (Breckenridge et al., 2003).

Kann der Stress jedoch nicht abgebaut werden, so wird Kaspase 12 aktiviert, welche zur Kalziumfreisetzung ins Zytosol führt (Nakagawa et al., 2000). Wie in 2.1.2.2 beschrieben, zerreißt dies die äußere Mitochondrienmembran. An dieser Stelle läuft somit der alternativ intrinsische Signalweg mit dem intrinsischen Signalweg zusammen.

2.1.3 Regulationsmechanismen der Apoptose

Wie zuvor bereits erwähnt, spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle in der Entstehung vieler Krankheitsbilder. In den folgenden Kapiteln soll daher auf die wichtigsten Mechanismen, welche Angriffspunkte für moderne Therapieansätze darstellen, ebenso wie ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten, eingegangen werden.

2.1.3.1 Todesrezeptoren und DISC

CD95 ist ein Todesrezeptor, welcher eine wichtige Rolle in der Auslese der T- und B-Zellen des menschlichen Immunsystems spielt. Genetische Defekte des CD95 führen zu Autoimmunerkrankungen und nicht-maligner Lymphadenopathie (Krammer, 2000).

Mit HIV infizierte T-Zellen zeigen eine erhöhte CD95-Expression, was zum erhöhten Suizid von T-Zellen und somit zur Schwächung des Immunsystems führt (Baumler et al., 1996).

Die Aktivierung von Todesrezeptoren ist ein wichtiger Bestandteil der Wirkung der Chemotherapie. Tumorzellen mit Mutationen im CD95- und anderen Todesrezeptorgenen zeigen eine Resistenz gegen medikamentöse Einwirkung (Friesen et al., 1997). Somit sind Anzahl und Zustand der Todesrezeptoren wichtige Faktoren bei der Wahl der Therapie.

Auch Mutationen in den anderen Bestandteilen des DISC können zu Krankheiten führen. So führt eine Mutation des für Fas zuständigen Gens zu einer Störung der Fas-FADD-Interaktion und somit zu einer ausbleibenden Bildung des DISC (L. Wang et al., 2010).

Apoptose ist auch ein Defensivmechanismus des Körpers um von Viren infizierte Zellen zu eliminieren. Als Gegenmaßnahme greifen viele Viren in die Mechanismen der Apoptose ein. Zum Beispiel wird das viral-FLICE-like inhibitory Protein (= v-FLIP) vom γ -Herpesvirus und dem menschlichen

Molluscipoxvirus exprimiert und ist in der Lage, durch Bindung an den DISC die Aktivierung der Kaspase 8 zu unterbinden und die Apoptose somit aufzuhalten (Thome et al., 1997).

2.1.3.2 Die Bcl-2 Proteinfamilie

Viren können jedoch auch auf anderen Wegen die Apoptose inhibieren. Um die stark pro-apoptotische Wirkung des E1A Onkoproteins des Adenovirus 5 auszugleichen, enthält es ebenfalls Bcl-2-ähnliche Proteine, welche anti-apoptotisch wirken (Boulakia et al., 1996).

Um die Rolle der Bcl-2 Proteinfamilie in Krankheiten aufzudecken, wurden zahlreiche Studien an Knock-out Mäusen durchgeführt: Bim-Knock-out Mäuse litten unter Splenomegalie und Lymphadenopathie (Bouillet et al., 1999). In Bax-Knock-Out Mäusen zeigte sich Infertilität mit Ansammlung atypischer Keimzellen, ebenso wie eine verminderte T- und B-Lymphozytenauslese (Knudson et al., 1995). Wird dagegen die Wirkung des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 durch Knock-out Mäuse untersucht, beobachtet man eine erhöhte Lymphozytenauslese (Nakayama et al., 1993), Thymus- und Milzinvolution und Nierenversagen (Veis et al., 1993).

In geschädigten Zellen sammelt sich p53 an, welches die Transkription des anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2 hemmt und somit die Apoptose auslösen kann. Ist Bcl-2 jedoch in Tumorzellen in größeren Mengen vorhanden, so ist dieses auch in der Lage, die Wirkung des p53 zu unterbinden (Jiang & Milner, 2003).

Bei vielen therapieresistenten Tumoren ist das Gleichgewicht der Bcl-2 Proteine zugunsten der anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie verschoben (Frenzel et al., 2009).

INNO-406, ein Tyrosinkinaseinhibitor, erhöht die Expression von BH3-Proteinen, welche, wie in 2.1.2.2 beschrieben, die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie inhibieren und somit die Apoptose der Tumorzelle ermöglichen (Kuroda et al., 2007).

Die Regulation der Bcl-2 Proteinfamilie stellt also sowohl in der Tumorthherapie, als auch in der Therapie vieler viraler und Allgemeinerkrankungen einen vielversprechenden Ansatz dar.

2.1.3.3 Kaspasenregulation

Usurpin wird in Herzmuskelzellen ausgeschüttet, wenn diese nach einer Ischämie wieder durchblutet werden um deren apoptotischen Untergang aufzuhalten. Es besitzt eine ähnliche Struktur wie die Kaspasen 8 und 10, doch es fehlen die Aminosäuren Histamin und Cystein, welche für die proteolytische Aktivität essentiell sind. Durch Verdrängung können Kaspase 8 und 10 somit nicht vom DISC aktiviert werden (Rasper et al., 1998).

Spinalmuskelatrophie, welche durch Motorneuronabbau charakterisiert wird, ist eine der häufigsten autosomal rezessiv vererbten Krankheiten (Melki, 1997). Durch eine Mutation des Gens, welches das neuronale Apoptoseinhibitorprotein kodiert, kann dieses Kaspasen nicht mehr inaktivieren, weshalb Motorneurone vermehrt den suizidalen Zelltod einleiten (Roy et al., 1995).

Viren können den Untergang der Wirtszelle auch durch Inaktivierung der Caspasen mittels sogenannter Serin Protease Inhibitoren verhindern. Der Kuhpockenvirus lässt beispielsweise Cytokin Response Modifier (=CrmA) von der Wirtszelle synthetisieren (Pickup et al., 1986). Dieses Protein ist ein wirksamer Inhibitor der Kaspasen 1, 4, 5, 8, 9 und 10 durch Interaktion in deren aktivem Zentrum (Garcia-Calvo et al., 1998). Das Myxomavirusprotein Serin Protease Inhibitor Protein 2(=SERP2) interagiert mit dem Interleukin-1 beta-converting Enzym um die Aktivierung der Kaspase 1 zu verhindern (Petit et al., 1996). P35 des Baculovirus inhibiert in der menschlichen Zelle die Kaspasen 1, 3, 6, 7, 8 und 10 direkt (Zhou et al., 1998).

Auch Tumorzellen verhindern ihre Apoptose indem sie in die Kaspasenregulation eingreifen. Survivin bindet an die Kaspasen 3, 7 und 9 und inaktiviert diese (Chandele et al., 2004; Wright et al., 2000). Survivin spielt eine

wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung, ist in normalen, differenzierten Zellen erwachsener Menschen jedoch nicht mehr nachweisbar (Ambrosini et al., 1997). In vielen Tumoren, vor allem Ösophagus-, Lungen-, Ovarial-, Uterus- und Nierenkarzinomen, sowie Melanomen, kann eine verstärkte Survivinexpression nachgewiesen werden (Fukuda & Pelus, 2006). Tumorzellen mit hohen Survivinkonzentrationen zeigen ebenfalls eine reduzierte Sensibilität gegen Radiotherapie (Asanuma et al., 2000).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass Survivin als Angriffspunkt in der Tumorthherapie erforscht wird. YM155 interagiert mit den 269 Basenpaaren der Promoter Region und wirkt somit als Transkriptioninhibitor von Survivin (Iwasa et al., 2008). Ein phosphorothioate antisense Oligonucleotid bindet an die Survivin mRNA und inhibiert somit die Translation des Proteins (Li et al., 1999). Es werden jedoch auch Wege erforscht, Survivin direkt zu binden und zu inaktivieren. Shepherdin ist ein aus 5 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches an Survivin binden kann und es somit inaktiviert (Plescia et al., 2005). Ein weiterer Therapieansatz ist die Impfung mit Antikörpern, welche anti-apoptotische Moleküle wie Survivin binden (Andersen et al., 2008).

In Huntington's Disease, einer neurodegenerativen Erkrankung, wird durch die Spaltung von Huntingtin die Kaspase-3-Aktivität erhöht und somit verstärkt Apoptose in Nervenzellen ausgelöst (Goldberg et al., 1996).

2.1.3.4 Ceramide

Ceramide wird auch als „tumor suppressor lipid“ bezeichnet, da es pro-apoptotische Signale potenziert (Liu et al., 2013). In vielen Tumorzellen wird diese Funktion von Ceramide durch eine erhöhte Expression von Ceramide-metabolisierenden Enzymen und Inhibition der Biosynthese von Ceramid unterdrückt (Bieberich, 2008).

Normalerweise liegt Ceramide als Sphingomyelin, welches aus Sphingosin und Ceramide zusammengesetzt ist, an der Zellmembran vor. Wird die Zelle Stressfaktoren wie pro-inflammatorischen Zytokinen, oxidativem und nitrosativem Stress, UV- und γ -Strahlung, sowie chemotherapeutisch wirksamen Substanzen ausgesetzt, so erhöht sich die Sphingomyelinaseaktivität (Huwiler & Zangemeister-Wittke, 2007). Diese spaltet Sphingomyelin, woraufhin Ceramide seine Wirkung in der Zelle entfalten kann. Für den intrinsischen Signalweg ist die Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran essentiell. Ceramide interagiert mit dem Bcl-2-Protein Bax um Poren in der Mitochondrienmembran zu bilden (Lee et al., 2011). Es werden deshalb Ceramidase-Inhibitoren und Ceramide-Imitatoren untersucht, um die Apoptose in Tumorzellen zu verstärken (Bhabak et al., 2013).

2.2 Erythrozyten

Um in den Mitochondrien Energie für die Vorgänge der Zelle bereit zu stellen, ist Sauerstoff essentiell. Der Transport des Sauerstoffs von der Lunge zu den Zellen des Körpers ist durch die Erythrozyten zu gewährleisten.

Mit $4 - 6 \times 10^{12}$ Erythrozyten pro Liter Blut beim gesunden erwachsenen Menschen sind Erythrozyten die häufigsten Blutzellen des menschlichen Körpers und tragen 99% zum Gesamtvolumen des Blutes bei (Dzierzak & Philipsen, 2013).

Erythrozyten haben einen Durchmesser von etwa $7 \mu\text{m}$ und eine Dicke von etwa $2 \mu\text{m}$ (Doshi et al., 2009). Von der Seite weisen sie eine bikonkave Form auf. Diese Form der roten Blutkörperchen ist für ihre Funktion äußerst nützlich: Das Oberfläche-Volumen-Verhältnis wird im Gegensatz zu einer runden Form zugunsten der Oberfläche verschoben, weshalb an dieser vergrößerten

Oberfläche ein vermehrter Sauerstoffaustausch stattfinden kann (Svetina, 2012).

Während der Zirkulation im Körper müssen Erythrozyten Kapillaren passieren, welche kleiner als der Durchmesser der Erythrozyten sind. Aus diesem Grund ist es für die Erythrozyten essentiell, verformbar zu sein. Hauptfaktoren für die Verformbarkeit der Erythrozyten sind die mechanischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran, die Viskosität des Zytoplasma (welche wiederum hauptsächlich von der mittleren zellulären Hämoglobin-Konzentration abhängig ist) und die elastischen Eigenschaften des Zytoskeletts (Cluitmans et al., 2012). Im Laufe ihrer Reifung verlieren Erythrozyten Organellen, wie den Nucleus, Mitochondrien oder Ribosomen (Gronowicz et al., 1984). Zwar können Erythrozyten somit nur noch durch anaerobe Glykolyse Energie für zelluläre Prozesse gewinnen, doch sind sie nun in der Lage, trotz ihrer geringen Größe viel Hämoglobin zu transportieren (Jelkmann, 2007). Hämoglobin ist das Protein, welches es den Erythrozyten durch seine Sauerstoffaffinität erlaubt, Sauerstoff von der Lunge aufzunehmen und durch den Blutkreislauf zu den Zellen des Körpers zu transportieren. Hämoglobin wird als Tetramer aus vier Untereinheiten gebildet. Beim gesunden Erwachsenen sind dies 2 α - und 2 β -Untereinheiten (Manning et al., 2009).

Die verschiedenen Untereinheiten des Hämoglobin sind wichtig, da sie für den „kooperativen Effekt“ des Proteins sorgen (Nagatomo et al., 2015). Unter Kooperativität versteht man, dass die Affinität des Proteins zum Liganden, im Fall des Hämoglobin also die Sauerstoffaffinität, davon abhängig ist, wie viele Moleküle bereits an die anderen Untereinheiten des Proteins gebunden sind. Beim $\alpha_2\beta_2$ –Hämoglobin-Tetramer begünstigt die Bindung von Sauerstoff weitere Sauerstoffbindung an das Hämoglobin (Nagatomo et al., 2015). In der Lunge kann somit schnell viel Sauerstoff aufgenommen werden. Im peripheren Blutkreislauf sinkt durch die erhöhte Konzentration von Kohlenstoffdioxid der pH-Wert, was die Sauerstoffaffinität des Hämoglobin herabsetzt (Douglas et al., 1912). Die Abgabe von Sauerstoff an die Zellen wird somit erleichtert.

2.2.1 Erythropoese

Erythrozyten können sich durch den Verlust ihrer Organellen nicht mehr teilen. Sie müssen also in anderen Organen aus pluripotenten Stammzellen kontinuierlich gebildet werden (Jelkmann, 2007). Dieser Vorgang wird als Erythropoese bezeichnet.

Im Embryo von Säugetieren findet die Erythropoese zu Beginn im Dottersack statt (Wu et al., 1995). Nach und nach wird diese Aufgabe von Leber, Milz und Thymus übernommen (Orkin & Zon, 2008). Ab dem 6. Monat findet die Erythropoese hauptsächlich im Knochenmark statt (Wu et al., 1995).

In der Niere wird das Protein Erythropoetin hergestellt, welches die Erythropoese stimuliert (Lin et al., 1985). Dieses Protein wird vermehrt freigesetzt, wenn in der Niere ein Sauerstoffmangel festgestellt wird (Beru et al., 1986).

Die Differenzierung der Erythrozyten von pluripotenten Stammzellen zu funktionsfähigen Erythrozyten läuft über mehrere Zwischenschritte. Hierbei werden aus Pro-Erythroblasten über Erythroblasten und Normoblasten schließlich Retikulozyten, welche das Knochenmark verlassen und im Blut zu Erythrozyten reifen (Dzierzak & Philipsen, 2013).

Durch den Verlust ihrer Organellen ist der Stoffwechsel der Erythrozyten eingeschränkt und der alterungsbedingte Flexibilitätsverlust kann nicht repariert werden. Um die dünnen, peripheren Kapillaren nicht mit den gealterten Erythrozyten zu verstopfen, bleiben diese nach einer Zirkulationsdauer von etwa 120 Tagen im Blut in den dünnen Endothelspalten der Milz stecken und werden dort von Makrophagen beseitigt (Dinkla et al., 2012). Die Kupfferzellen der Leber sind Makrophagen, welche ebenfalls an der Beseitigung gealterter Erythrozyten beteiligt sind (Nguyen-Lefebvre & Horuzsko, 2015). Erythrozytenalterung führt zur Bindung von IgG-Antikörpern an deren Zelloberfläche, weshalb sie für die Kupfferzellen zur Phagozytose markiert sind (Bosman et al., 2005).

2.2.2 Aufbau der Erythrozytenmembran

Die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran und ein Netzwerk aus Membran-assoziierten Proteinen, das Membranskelett, sind für die charakteristische, bikonkave Form und die Flexibilität des Erythrozyten unabdingbar (Khanna et al., 2002).

Die wichtigsten Proteine dieses Membranskeletts sind Spectrin, Actin, Protein 4.1R, Ankyrin, Actin-assoziierte Proteine und Band 3-enhaltende Multiproteinkomplexe (Lux, 2016).

Eine weitere wichtige Funktion der Membran ist die Abgrenzung des intrazellulären vom extrazellulären Milieu. Für die Funktion der Zelle ist es wichtig, dass sich die intrazelluläre Ionenkonzentration von der extrazellulären Zusammensetzung unterscheidet. Ionenaustausch findet daher über Kanäle statt. Zu diesen Kanälen gehört auch der Gardos-Kanal, ein Calcium-abhängiger Kaliumkanal (Andolfo et al., 2016), welcher bei der Eryptose eine wichtige Rolle spielt (Browning et al., 2006).

Während Cholesterol gleichmäßig zwischen den beiden Leaflets der Lipiddoppelschicht verteilt ist, sind die Lipoproteine ungleichmäßig verteilt (Devaux, 1991).

Glycolipide, Phosphatidylcholine und Sphingomyelin befinden sich auf der Außenseite der Membran, während Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserin auf der Innenseite der Membran zu finden sind (Smith, 1987). Um die Asymmetrie aufrecht zu halten, befinden sich Lipidtransporter in der Membran, welche die Verteilung der Phospholipide regulieren (Daleke, 2008).

Diese Asymmetrie zu wahren ist wichtig, da zum Beispiel durch Expression von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran die Adhäsion der Erythrozyten an Endothel gesteigert wird, was zur Bildung von Thromben und somit zur Verstopfung kleiner Kapillaren führen kann (Wautier et al., 2011; Wood et al., 1996).

Die Expression von Phosphatidylserin auf der Erythrozytenoberfläche gehört außerdem zu den Charakteristika sowohl der Apoptose, als auch der Eryptose (E. Lang & Lang, 2015).

2.3 Eryptose

Erythrozyten besitzen weder Zellkern, noch Mitochondrien oder ein endoplasmatisches Retikulum. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, sind diese Organellen für den Ablauf der Apoptose essentiell. Aus diesem Grund dachte man lange, Erythrozyten könnten keinen suizidalen Zelltod einleiten. Versuche zeigten, dass gealterte Erythrozyten in Milz und Leber abgebaut werden. Man ging daher davon aus, dass die Erythrozytenmauserung einzig durch diese beiden Organe stattfinden würde.

Wie zuvor bereits erwähnt, wurde im Jahr 2001 von D. Bratosin et al. der suizidale Zelltod von Erythrozyten in Versuchen nachgewiesen (Bratosin et al., 2001). Vier Jahre lang beschrieben Wissenschaftler diesen Vorgang als Apoptose oder Erythrozytenapoptose. Für den Ablauf der Apoptose sind jedoch Organellen erforderlich. Der suizidale Zelltod der Erythrozyten weist somit unterschiedliche Mechanismen auf. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde 2005 von Lang et al. der Begriff „Eryptose“ geprägt. Dieser setzt sich aus Erythrozyt und Apoptose zusammen (K. S. Lang et al., 2005a).

Trotz unterschiedlicher Mechanismen, welche zum suizidalen Zelltod von Erythrozyten und kernhaltigen Zellen führen, weisen diese viele morphologische Gemeinsamkeiten auf.

Bereits vor der Entdeckung des suizidalen Zelltodes von Erythrozyten wurde beobachtet, dass sie in der Lage sind, Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (Setty et al., 2000). Des Weiteren zeichnet sich Eryptose auch durch Zellschrumpfung, Blebbing und Phagozytose der somit gebildeten Vesikel durch Makrophagen aus (Bratosin et al., 2001).

Während ihrer ca. 120-tägigen Zirkulation sind Erythrozyten multiplen Stressfaktoren ausgesetzt. Aufgrund ihrer Sauerstofftransportfunktion erleiden sie in der Lunge hohen oxidativen Stress (Stocker et al., 1985). Durch ihre Passage in Kapillaren werden sie mechanischem Stress ausgesetzt. Um die dadurch entstandenen Schäden zu reparieren, erhöhen Erythrozyten ihren Energieumsatz (Kodicek et al., 1990). Sind die Schäden allerdings zu hoch, so können die roten Blutkörperchen durch Hämolyse zugrunde gehen. Dies führt zur Freisetzung der zellulären Bestandteile des Erythrozyten (Jelkmann, 2007). Das sich nun extrazellulär befindliche Hämoglobin wirkt aufgrund der gebundenen Eisenionen gefäßschädigend und kann zu Thrombosen führen (Woollard et al., 2009). Des Weiteren kann Häm die Tubuli der Niere schädigen, weshalb Patienten mit Krankheiten, welche mit verstärkter Hämolyse einhergehen, oft unter Niereninsuffizienz leiden (Qian et al., 2010).

Schafft es ein Erythrozyt sein suizidales Programm ablaufen zu lassen, bevor er durch Hämolyse zugrunde geht, so gelangen seine schädigenden Inhalte nicht nach extrazellulär, sondern werden von Makrophagen abgebaut.

Während Apoptose im Vergleich zur Nekrose einen gewebeschonenden Zelltod einer kernhaltigen Zelle darstellt, so stellt die Eryptose analog einen schonenden Zelltod im Gegensatz zur Hämolyse dar.

2.3.1 Signalwege der Eryptose

Während die Eryptose wie zuvor beschrieben morphologisch große Ähnlichkeit mit der Apoptose aufweist, so sind die grundlegenden Mechanismen aufgrund der fehlenden Organellen unterschiedlich.

Es konnten zwei grundlegende Signalwege der Eryptose nachgewiesen werden: Ein kalziumabhängiger Signalweg und ein ceramideabhängiger Signalweg (F. Lang et al., 2006a).

In geschädigten Erythrozyten werden Cyclooxygenasen aktiviert, weshalb vermehrt Prostaglandin E₂ gebildet werden kann (Oonishi et al., 1998). Die Ansammlung von Prostaglandin E₂ in den Erythrozyten führt zur Öffnung von Kalziumkanälen. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt wiederum zur Öffnung von Kaliumkanälen und folglich zum Kaliumchloridverlust, zur Hyperpolarisation und zur Zellschrumpfung (K. S. Lang et al., 2005a). Diese als Gardos-Kanäle bezeichneten Kaliumkanäle der Erythrozyten werden sowohl von erhöhtem intrazellulärem Kalzium, als auch bei ATP-Mangel aktiviert (F. Lang, 2007).

Der erhöhte intrazelluläre Kalziumgehalt führt ebenfalls zur Aktivierung von Scramblasen, welche Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite befördern (K. S. Lang et al., 2003). Wie zuvor beschrieben wird durch die Bindung von Rezeptoren der Makrophagen an Phosphatidylserin eine suizidale Zelle erkannt und kann phagozytiert werden.

Beim ceramideabhängigen Signalweg wird aufgrund eines osmotischen Schocks Ceramide durch Aktivierung der Sphingomyelinase gebildet (K. S. Lang et al., 2004a). Während Ceramide in kernhaltigen Zellen, wie zuvor beschrieben, die Mitochondrienmembran durchlässiger macht und somit pro-apoptotisch wirksam ist, wirkt es in Erythrozyten pro-eryptotisch, indem es durch Interaktion mit dem Zytoskelett die Erythrozytenmembran fragiler macht und somit die Vesikelbildung beim Blebbing erleichtert (Dinkla et al., 2012).

Der Platelet-activating factor (=PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3phosphocholin) wirkt auf beide Signalwege der Eryptose (K. S. Lang et al., 2005a). PAF erhöht das intrazellulär verfügbare Calcium, indem es einerseits die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern fördert und auf die Ionenkanäle der Zellmembran wirkt (Valone & Johnson, 1987). Versuche zeigten auch eine erhöhte Bildung von Ceramide aus Sphingomyelin durch PAF (P. A. Lang et al., 2005c).

Ein Mangel an Glucose und somit ein Energiemangel des Erythrozyten aktiviert durch Phosphorylierung die Janus Kinase 3, welche ebenfalls auf beide Signalwege der Eryptose einwirkt (Bhavsar et al., 2011).

So wie kernhaltige Zellen enthalten auch Erythrozyten die Kaspasen 3 und 8 (Berg et al., 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese durch erhöhten oxidativen Stress in Erythrozyten aktiviert werden (F. Lang et al., 2006a).

Die zuvor beschriebenen Kalziumkanäle können ebenfalls durch Oxidation aktiviert werden und somit nach oxidativem Stress den suizidalen Zelltod einleiten (Duranton et al., 2002).

In gealterten Erythrozyten befindet sich weniger N-acetyl-L-Cystein, ein wichtiger Antioxidant zum Schutz der Erythrozyten vor oxidativem Stress. Aus diesem Grund zeigten in Versuchen gealterte Erythrozyten eine erhöhte Anfälligkeit für Eryptose (Ghashghaeinia et al., 2012).

2.3.2 Inhibitoren der Eryptose

In den Versuchen über gealterte Erythrozyten konnte die vermehrte Eryptoserate gealterter Erythrozyten durch Zugabe von N-acetyl-L-Cystein wieder herabgesetzt werden (Ghashghaeinia et al., 2012).

Erythropoetin spielt nicht nur bei der Bildung von Erythrozyten eine entscheidende Rolle. Es wirkt dem suizidalen Sterben von Erythrozyten entgegen indem es Kalziumkanäle hemmt (F. Lang & Qadri, 2012).

Stickstoffmonoxid (=NO) wirkt in kernhaltigen Zellen je nach Konzentration pro- oder anti-apoptotisch (Haendeler et al., 1999). In geringer Konzentration kann es das Überleben der Zelle durch Inaktivierung der Kaspase 3 sichern (Kim et al., 1997). Durch seine inhibierende Wirkung auf das Scrambling der Membran, konnte auch in Erythrozyten der suizidale Zelltod durch Stickstoffmonoxid herabgesetzt werden (Nicolay et al., 2008). Endothelin B stimuliert die Bildung von Stickstoffmonoxid und wirkt somit ebenfalls anti-eryptotisch (Foller et al., 2010b).

Wie in 2.3.1 erwähnt, führt Energiemangel zur Eryptose. AMP-activated Proteinkinase (=AMPK) wird bei Energiemangel aktiviert und stimuliert die Energieproduktion, limitiert den Energieverbrauch und macht Erythrozyten resistenter gegen pro-eryptotische Stimuli (Foller et al., 2009b).

Koffein wirkt hemmend auf Kalziumkanäle der Erythrozyten und somit ebenfalls anti-eryptotisch (Floride et al., 2008). Einige Katecholamine inhibieren den Austritt von Chlorid aus dem Erythrozyten und hemmen somit den Kalziumeinstrom (P. A. Lang et al., 2005b).

Glutathion wirkt deoxidierend auf die Ionenkanäle der Erythrozytenmembran, woraufhin diese bei oxidativem Stress weniger aktiviert werden und folglich die Eryptoserate sinkt (Dumaswala et al., 2000).

Weitere Inhibitoren der Eryptose sind Adenosin (Niemoeller et al., 2007), Amitriptylin (Brand et al., 2008), Staurosporine (Klarl et al., 2006) und Harnstoff (K. S. Lang et al., 2004b).

2.3.3 Anämie

Der suizidale Zelltod von Erythrozyten schützt den Körper vor den gewebeschädigenden Folgen der Hämolyse. Ist die Regulation der Eryptose jedoch fehlgesteuert, so können, wie bei der Fehlregulation der Apoptose, Krankheitsbilder entstehen. Eine vermehrte Eryptose kann somit zur Entstehung einer Anämie führen oder eine bereits bestehende Anämie verschlimmern (F. Lang et al., 2006a).

Die WHO definiert Anämie als einen Zustand, bei dem die Anzahl der roten Blutkörperchen oder deren Sauerstofftransportkapazität insuffizient ist um den physiologischen Bedürfnissen des Körpers gerecht zu werden. Diese Bedürfnisse variieren je nach Alter, Geschlecht, Höhenlage und Schwangerschaftszustand (McLean et al., 2009).

Klinische Symptome einer Anämie sind Müdigkeit, Atemlosigkeit, Schwächegefühl, Kopfschmerzen und Appetitlosigkeit (Yellen et al., 1997).

Eisenmangel ist der häufigste Grund für das Entstehen einer Anämie (Rusia et al., 1995).

Leidet eine Schwangere unter Anämie, so kann dies zu Frühgeburten und Wachstumsstörungen führen (Steer, 2000) und die kognitive Entwicklung des Kindes beeinträchtigen (Grantham-McGregor & Ani, 2001).

In älteren Patienten mit chronischen Erkrankungen stellt Anämie eine weitere Belastung für den Körper dar und wirkt sich negativ auf deren Überlebensrate aus (McEvoy & Shander, 2013). Die Bluttransfusionen, welche der Anämie entgegenwirken sollen, sind jedoch auch nicht ohne Risiko: Sie können beim erkrankten Patienten zu Infektionen, Immunsuppression und Organversagen führen (Athar et al., 2012).

Gerade bei älteren, multimorbiden Patienten sollte daher versucht werden, eine Anämie zu vermeiden und den suizidalen Zelltod von Erythrozyten zu minimieren. Viele Krankheiten sind jedoch mit einer erhöhten Eryptoserate vergesellschaftet.

2.3.4 Eryptose in Krankheiten

Versuche konnten zeigen, dass Eisen nicht nur für die Sauerstofftransportfunktion der roten Blutkörperchen essentiell ist, sondern auch für das Überleben der Erythrozyten eine Rolle spielt: Erythrozyten von Mäusen mit Eisenmangel gingen verstärkt durch suizidalen Zelltod zugrunde, was auf eine Eisenmangelanämie noch verstärkend wirkt (Kempe et al., 2006).

Bei der Sichelzellanämie besitzen die Erythrozyten nicht ihre charakteristische bikonkave Form. Durch Mutation besitzen sie stattdessen eine Sichelform und sind weniger verformbar, bleiben vermehrt in den Milzsinus stecken und werden

daher vermehrt aussortiert. Die mit dieser Krankheit vergesellschaftete erhöhte Eryptose verstärkt somit die vorbestehende Anämie (P. A. Lang et al., 2009).

Während die meisten Erythrozyten beim Hämolytisch Uremischen Syndrom (=HUS) durch Hämolyse zugrunde gehen, konnte beim HUS auch eine vermehrte Eryptose nachgewiesen werden (P. A. Lang et al., 2006b).

In Patienten mit Fieber konnte eine erhöhte Eryptoserate festgestellt werden (Foller et al., 2010a). Auch bei Lebererkrankungen zeigte sich eine erhöhte Sphingomyelinaseaktivität und somit Aktivierung der Eryptose über den Ceramide-abhängigen Signalweg (P. A. Lang et al., 2007). In septischen Patienten wird die vermehrte Eryptose durch erhöhtes intrazelluläres Kalzium hervorgerufen (Kempe et al., 2007).

Krebs ist eine schwerwiegende Erkrankung, deren Verlauf und Therapie mit vielen beeinträchtigenden Nebenwirkungen einhergeht. Viele an Krebs erkrankte Patienten leiden ebenfalls unter einer Anämie (Spivak, 1994). In Patienten mit Lungenkrebs konnte nachgewiesen werden, dass verstärkte Eryptose zu dieser Anämie beiträgt (Bissinger et al., 2016).

Das von der Niere produzierte Hormon Erythropoetin ist für die Erythropoese essentiell und inhibiert, wie in 2.3.2 erwähnt die Eryptose. Bereits im Jahr 1836 beschrieb der Pathologe Richard Bright schwere Blutarmut als eine Komplikation bei Patienten mit Nierenversagen. Heute weiß man, dass dieser Komplikation reduzierte Erythropoese durch fehlendes Erythropoetin zugrunde liegt (Erslev & Besarab, 1997). Durch das fehlende Erythropoetin findet bei diesen Patienten eine vermehrte Eryptose statt, was deren Anämie verstärkt (Abed et al., 2014).

Eine Krankheit, bei welcher die mit ihr vergesellschaftete vermehrte Eryptose einen Vorteil darstellt, ist Malaria. Plasmodien, die Krankheitserreger von Malaria, vermehren sich in Erythrozyten. Geht der Erythrozyt aufgrund von Eryptose zugrunde, so werden auch die in ihm befindlichen Plasmodien zerstört (Foller et al., 2009a).

2.4 Carnosolsäure

1962 wurde Carnosolsäure, auch Salvin genannt, von Horst Linde aus den Blättern von *Salvia officinalis* (=Salbei) isoliert und beschrieben (Linde, 1964). Im Jahr 1969 zeigte Carl Heinz Brieskorn, dass Carnosolsäure für die antioxidative Wirkung von Rosmarin und Salbei zuständig ist (Brieskorn & Domling, 1969).

Versuche haben gezeigt, dass die Konzentration von Carnosolsäure in den Blättern von Salbei und Rosmarin zwar variieren kann, in der Regel jedoch zwischen 3 und 10% des Gewichts luftgetrockneter Rosmarinblätter ausmacht (Wellwood & Cole, 2004). Carnosolsäure konnte sonst nur in weiteren Mitgliedern der Familie der Lippenblütler, zu welcher Rosmarin und Salbei gehören, nachgewiesen werden (Birtic et al., 2015).

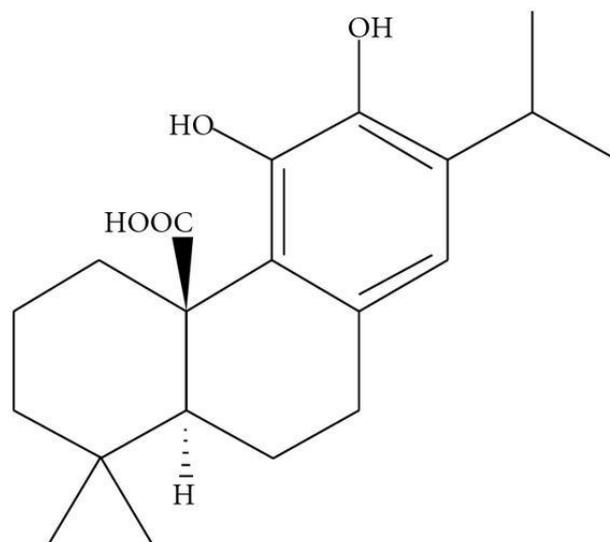


Abbildung 1: Strukturformel von Carnosolsäure (Oh et al., 2012)

Carnosolsäure gehört zu den phenolischen Diterpenen und besitzt die Summenformel $C_{20}H_{28}O_4$ (de Oliveira et al., 2016). Aufgrund seiner vielseitigen Eigenschaften findet Carnosolsäure sowohl in der Industrie als auch in der Forschung Interesse.

Durch seine anti-oxidative Wirkung wird Carnosolsäure als Konservierungsmittel in Lebensmitteln und Kosmetik angewendet (Gottardi et al., 2016; Yesil-Celiktas et al., 2010).

In der Medizin findet Carnosolsäure momentan noch keine therapeutische Anwendung, doch sowohl in Vitro, als auch Tierversuche zeigen vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten der Substanz.

Carnosolsäure zeigte in Versuchen anti-virale und anti-bakterielle Eigenschaften, unter Anderem auch gegen das multi-resistente Bakterium *Staphylococcus aureus* (Shin et al., 2013; Vazquez et al., 2016).

In übergewichtigen, Insulin-resistenten Mäusen wirkt sich Carnosolsäure durch Hemmung des Tumor Nekrose Faktor- α (= TNF α) positiv auf die Insulin-Sensitivität der Mäuse aus und verminderte die mit Übergewicht einhergehende verstärkte Entzündungsneigung (Tsai et al., 2014).

Carnosolsäure wirkt sich ebenfalls hemmend auf Lipasen des Pankreas aus, woraufhin die Energieaufnahme durch die Nahrung reduziert wird und die Gewichtszunahme von Mäusen reduziert werden konnte (Ninomiya et al., 2004).

Carnosolsäure wird des Weiteren ein neuroprotektiver Effekt durch seine anti-angiogenen Eigenschaften zugeschrieben (Kayashima & Matsubara, 2012). Im Tierversuch konnte die Anzahl der zugrunde gehenden Neurone bei Ratten mit Alzheimer durch die anti-oxidativen Eigenschaften von Carnosolsäure reduziert werden (Azad et al., 2011).

Die Substanz zeigt ebenfalls positive Eigenschaften für Krebsprävention und Tumorthherapie: In Lungenkarzinomzellen verlangsamte Carnosolsäure durch Inhibition der Transkription, woraufhin die mRNA-Bildung um bis zu 50% reduziert wurde, das Tumorstadium und verminderte die Produktion des gewebschädigenden Benzo- α -Pyren der Tumorzellen (Offord et al., 1995).

In Versuchen mit Ratten konnte die Entstehung von Brustkrebs durch Carnosolsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Verhinderung von DNA-Schäden reduziert werden und zeigt somit ein präventives Potential (Singletary et al., 1996).

Die Bildung von Karzinomen in der Wange von Hamstern konnte ebenfalls durch Carnosolsäure verlangsamt werden (Rajasekaran et al., 2012).

Die pro-apoptotische Wirkung von Carnosolsäure kann auf eine Inhibition der Expression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie und Aktivierung der Kaspasen 3 und 9 zurückgeführt werden (Tsai et al., 2011). Des Weiteren führt Carnosolsäure zu vermehrter Prostaglandin E2-Synthese (Theoduloz et al., 2014).

3 Ziel der Dissertation

Carnosolsäure werden, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, anti-oxidative, anti-mutagenene, anti-virale, anti-bakterielle, anti-inflammatorische, anti-angiogene und pro-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben. In Zukunft könnte Carnosolsäure somit in vielen Bereichen Anwendung finden. Es lohnt sich daher, die Eigenschaften dieser Substanz genau zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob Carnosolsäure einen Einfluss auf das Überleben der Erythrozyten durch Einwirkung auf ihr Suizidprogramm besitzt.

Dafür wurden Erythrozyten für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentration von Carnosolsäure inkubiert und auf die Charakteristika der Eryptose mit dem Durchflusszytometer untersucht. Zu diesen gehört, wie zuvor beschrieben, die Phosphatidylserinexposition auf der äußeren Erythrozytenmembran, Abnahme des Zellvolumens, erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen und Ceramidebildung.

Um zu untersuchen, ob Carnosolsäure die Eryptose auf dem kalziumabhängigen oder dem kalziumunabhängigen Signalweg auslöst, wurde die induzierte Eryptoserate auch mit kalziumfreier Ringerlösung gemessen.

Um die pro-eryptotische Wirkung von Carnosolsäure von dessen hämolytischer Wirkung abzugrenzen, wurde das freigesetzte Häm bestimmt.

4 Material

4.1 Erythrozyten

Da ausgereifte Erythrozyten nicht mehr teilungsfähig sind, können sie nicht in Zellkulturen vermehrt werden, sondern müssen von freiwilligen Spendern zu Verfügung gestellt werden. Freundlicherweise stellte die Blutspendezentrale der Universitätsklinik Tübingen diese zur Verfügung. Die adulten Zellen wurden hierfür als Vollblut, welches mit Lithium-Heparin antikoaguliert wurde, von gesunden Spendern entnommen. Das Einverständnis der freiwilligen Spender ist schriftlich dokumentiert. Um einen möglichen Einfluss von Blutgruppe oder Rhesusfaktor auszugleichen wurden Blutproben von Spendern verschiedener Blutgruppen verwendet.

Sowohl die experimentelle Studie als auch die Entnahme von Blut gesunder Probanden wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen unter der Projektnummer 184/2003V genehmigt.

Da für die Versuche nicht Vollblut, sondern isolierte Erythrozyten notwendig sind, wurde aus jeder Spende 1ml Vollblut zu 3ml Ringerlösung unter einer Sterilbank pipettiert. Um die Keimfreiheit der Proben zu gewährleisten wurde immer unter einer Sterilbank pipettiert.

Bei 21°C wurde diese Suspension für 20 Minuten bei 120 rcf (=relative centrifugal force) zentrifugiert. Der somit entstehende Überstand an Leukozyten und Thrombozyten wurde abpipettiert und verworfen. Die somit isolierten Erythrozyten wurden in frische Eppendorf-Cups pipettiert und für höchstens zwei Tage in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Um die Messungen mit einem Hämatokrit von 0,4% durchzuführen, wurde zu 1ml Ringerlösung 4µl Erythrozytenkonzentrat pipettiert. Im Anschluss wurden in die Proben 1µl, 2,5µl, 5µl und 10µl Carnosolsäure pipettiert, um die Auswirkung von Carnosolsäure in verschiedenen Konzentrationen zu testen. Die Proben

wurden bei 37°C für 48 Stunden inkubiert, bevor die jeweiligen Werte gemessen wurden.

Um Fehler zu vermeiden wurde für jede Erythrozytenprobe auch eine Negativkontrolle ohne Carnosolsäure, mit lediglich Ringerlösung, und eine Kontrollprobe ohne Carnosolsäure aber mit 1µl Dimethylsulfoxid (=DMSO) angefertigt.

4.2. Verwendete Substanzen

4.2.1 Carnosolsäure

Die für die Experimente verwendete Carnosolsäure wurde von der Firma Sigma Aldrich GmbH Hamburg bestellt. Um eine Stammlösung der Konzentration 10mg/ml zu erhalten, wurden 10mg Carnosolsäure mit 1ml DMSO verdünnt. In die Proben wurden 0,1µl, 0,25µl, 0,5µl und 1,0µl der Stammlösung pipettiert um Carnosolsäurekonzentrationen in den Proben von 1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml zu erhalten.

4.2.2 Annexin V

Phosphatidylserin wird, wie in Kapitel 2.1.2 und 2.3 beschrieben, bei apoptotischen und eryptotischen Zellen auf der Außenseite der Zellmembran exprimiert. Annexin V ist in der Lage, an Phosphatidylserin zu binden.

Um das gebundene Annexin V messen zu können, wird es mit dem Färbemittel Fluoresceinisothiocyanat (=FITC), gekoppelt. Das in den Versuchen verwendete Annexin-V-FITC wurde bei der Firma Roche Deutschland Holding GmbH

gekauft. Für die Versuche wird das Annexin-V-FITC mit dem in 4.3.3 beschriebenen Waschpuffer im Verhältnis 1:200 verdünnt.

4.2.3 Fluo-3-Acetoxymethylester

Fluo-3-Acetoxymethylester ermöglicht die Messung von intrazellulärem Kalzium. Es ist ein membranpermeabler Ester und kann somit in die Zellen eindringen. Fluo-3-AM-Ester kann selbst nicht an Kalzium binden, aber durch intrazelluläre Esterasen wird Fluo-3 freigesetzt, welches an Kalzium konjugieren kann. Da es in dieser Konfiguration die Zelle nicht mehr verlassen kann, wird bei der Messung im FACS Calibur nur das intrazelluläre Kalzium bestimmt.

Das in den Versuchen verwendete Fluo-3 stammt von der Firma Biotium aus Hayward (USA) und wird in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

Auch Fluo-3 wird für die Versuche mit dem in 4.3.3 beschriebenen Waschpuffer im Verhältnis 1:200 verdünnt.

4.2.4 DCFDA

Um zu testen, ob Carnosolsäure durch Erhöhung des oxidativen Stress auf den suizidalen Zelltod von Erythrozyten einwirkt, sollten die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Proben gemessen werden.

2-7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (=DCFDA) ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher an reaktive Sauerstoffspezies binden kann. Durch Deacetylierung entsteht hierbei 2-7-Dichlorodihydrofluorescin (=DCF), wessen Fluoreszenz vom FACS Calibur gemessen werden kann.

In den Versuchen wird durch Zugabe von 1µl Antikörper zu 10ml Ringerlösung eine Konzentration des Antikörpers in der Lösung von 10µM erreicht. Das in

den Versuchen verwendete DCFDA wurde von der Firma Sigma aus Schnelldorf geliefert.

4.2.5 Antikörper

Wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben ist die Bildung von Ceramide aus Sphingomyelin ein wichtiges Merkmal der Eryptose. Um dieses nachzuweisen werden mehrere Antikörper verwendet. Ein von Mäusen stammender Anti-Ceramide-Antikörper (Clone MID 15B4 der Firma Alexis aus Grünberg) kann an Ceramide binden. Für die Versuche wurde der Antikörper im Verhältnis 1:10 in PBS-BSA (siehe Kapitel 4.3.4) gelöst.

Der Anti-Ceramide-Antikörper ist jedoch nicht fluoreszent und kann somit vom FACS Calibur nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund wird ein von Ziegen stammender Antikörper verwendet. Dieser polyklonale fluorescein-isothiocyanate-konjugierte (=FITC) Anti-Maus IgG und IgM Antikörper wurde von der Firma BD Pharmingen aus Hamburg geliefert und für die Versuche im Verhältnis 1:50 mit PBS-BSA (siehe Kapitel 4.3.4) verdünnt.

4.3 Verwendete Lösungen

4.3.1 Ringerlösung

Eine Nährlösung soll für die Zellen eine stressarme Umgebung bieten und sie mit lebensnotwendigen Substraten versorgen.

Durch den bei ihrer Reifung stattfindenden Verlust ihrer Organellen ist der Stoffwechsel der Erythrozyten eingeschränkt. Für die Energiegewinnung reicht ihnen somit Glucose im Nährmedium. Des Weiteren ist es wichtig, dass sie ihren Elektrolythaushalt im Gleichgewicht halten können. Abweichungen würden in den Erythrozyten zu Stress und somit zu erhöhter Eryptose führen. Deswegen wurde eine Ringerlösung hergestellt, welche die gleiche Osmolarität, Elektrolytkonzentration und pH-Wert wie humanes Blutplasma besitzt. Die Ringerlösung enthält somit NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, Glukose, NaOH und H₂O. Um den pH-Wert der Ringerlösung bei 7,4 konstant zu halten, wurde 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-1-Ethansulfonsäure (=HEPES) hinzu gefügt. In Tabelle 1 sind die genauen Konzentrationen der Bestandteile der Ringerlösung aufgelistet.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Ringerlösung

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

4.3.2 Kalziumfreie Ringerlösung

Um abzugrenzen, ob Carnosolsäure Eryptose über den kalziumabhängigen oder den kalziumunabhängigen Signalweg auslöst, wurde auch eine Ringerlösung ohne Kalzium als Nährmedium hergestellt. Der pH-Wert beträgt 7,4, so wie die zuvor beschriebene Ringerlösung. Die genauen Konzentrationen der Bestandteile lassen sich Tabelle 2 entnehmen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der kalziumfreien Ringerlösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge für 1 L[g]
NaCl	125	7,305
HEPES	32,2	7,674
NaOH	13,7	0,541
KCl	5	0,373
Glucose	5	0,901
MgSO ₄	1	0,296
EGTA	1	0,190
H ₂ O		982,798 ml

4.3.3 Waschpuffer

Wie in 4.2.2 und 4.2.3 erwähnt, ist für die Messung der Phosphatidylexposition und des intrazellulären Kalziums ein Waschpuffer nötig.

Der Waschpuffer besitzt durch die Konzentrationen von NaOH und HEPES ebenfalls einen physiologischen pH von 7,4. Da die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin kalziumabhängig ist, enthält der Waschpuffer im Gegensatz

zur Ringerlösung mehr NaCl. Die genauen Anteile des Waschpuffers können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Waschpuffers

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

4.3.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung und BSA

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (=Phosphate Buffered Saline, PBS) ist eine isotone Lösung, welche nicht toxisch auf Zellen wirkt. Der pH-Wert ist 7,4 und somit für die Zellen ebenfalls verträglich. Die Lösung eignet sich somit um Zellkulturen zu waschen. Die genaue Zusammensetzung kann Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Zusammensetzung gepufferten Kochsalzlösung

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

PBS enthielt außerdem 0,1% Rinderserumalbumin (=Bovine Serum Albumin, BSA).

Für die Versuche wurde der Ceramide-Antikörper im Verhältnis 1:10 und der Anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper im Verhältnis 1:50 mit PBS-BSA verdünnt.

5 Methoden

5.1 Durchflusszytometrie

1968 wurde die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie an der Universität Münster entwickelt und noch im gleichen Jahr patentiert (Wolfgang & Wolfgang, 1971). Ein weiterer Name für die Durchflusszytometrie ist Fluorescence Activated Cell Sorting (=FACS).

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen und Partikel in einer Suspension zu zählen und zu analysieren. Man kann hierbei die Größe der Partikel, deren Granulierung und Fluoreszenzintensität bestimmen (Oberle et al., 2010).

Für die Analyse werden die Zellen oder Partikel, in unserem Fall Erythrozyten, aus der Suspension durch ein dünnes Rohr angesaugt. Der Durchmesser dieses Rohres ist so klein, dass jeweils nur ein einziger Erythrozyt in die Zählkammer eintritt (Beisker, 2013). Dort trifft ein Laserstrahl genau definierter Wellenlänge auf den Erythrozyt, woraufhin das Licht je nach Größe und Beschaffenheit der Zelle unterschiedlich gestreut wird (Oberle et al., 2010). Ist die Zelle fluoreszenzmarkiert, so entstehen bei diesem Vorgang ebenfalls Fluoreszenzimpulse. Dieses Streulicht und die Fluoreszenzimpulse können nun von Detektoren aufgenommen und verarbeitet werden.

Um die Zellgröße zu bestimmen, ist das Vorwärtsstreulicht (=Forward Scatter) wichtig (Koch et al., 2013). Es verläuft parallel zur Richtung des Laserstrahls und entsteht durch Lichtbeugung. Das durch Lichtbrechung entstehende seitlich gestreute Licht (=Side Scatter) gibt Auskunft über die Granulierung der Zelle. Diese ist für Eryptose jedoch irrelevant.

Die für diese Studie wichtigen Messgrößen sind somit das Vorwärtsstreulicht und die Fluoreszenzmessung.

In den Versuchen dieser Studie wurde das FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson Biosciences aus Heidelberg verwendet.

5.2 Annexin-V-Bindung und Vorwärtsstreulicht

Wie in Kapitel 4.1 und 4.2.1 erwähnt, werden jeweils 4µl Erythrozytenkonzentrat mit 1ml Ringerlösung und 0,1µl, 0,25µl, 0,5µl und 1µl Carnosolsäure angesetzt, um Carnosolsäurekonzentrationen von 1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml für die Proben zu erhalten. Diese werden, zusammen mit der Negativkontrolle und der DMSO-Kontrolle bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Nach 48 Stunden werden aus jeder Probe 150µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wird mit 160 rpm(=revolutions per minute) bei 21°C für 3 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird daraufhin verworfen.

In jede Probe werden nun 150µl Annexin-Waschpuffer (siehe Kapitel 4.3.3) pipettiert. Für 15 Minuten wird die Suspension nun wieder in den 37°C warmen, lichtlosen Wärmeschrank gestellt.

Die Annexin-V-Fluoreszenz wurde nun im FACS Calibur mittels einer Erregungswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm bestimmt.

Gleichzeitig wurde mittels eines „Dot Plots“ der Forward Scatter der Zellen und somit deren Größe bestimmt. Hierfür wurde auf einer linearen Skala das Vorwärtsstreulicht und das seitlich gestreute Licht aufgeführt und im geometrischen Mittel analysiert.

5.3 Eryptose im kalziumfreien Medium

Um zu testen, ob Carnosolsäure den suizidalen Zelltod der Erythrozyten über den kalziumabhängigen oder den kalziumunabhängigen Signalweg auslöst, wurde der im vorigen Kapitel beschriebene Versuch mit der höchsten Konzentration an Carnosolsäure, 10µg/ml, in kalziumhaltiger und kalziumfreier Ringerlösung (siehe Kapitel 4.3.2) durchgeführt. Um Fehler auszuschließen wurden wieder Negativkontrollen ohne Carnosolsäure angefertigt. Es wurden

zur Ermittlung der Eryptoserate wieder Annexin-V-Fluoreszenz und Vorwärtsstreulicht bestimmt.

5.4 Messung des intrazellulären Kalziums durch Fluo-3

Der Aufbau dieses Versuches beginnt wie die Annexin-V-Messung des Kapitels 5.2. Nach der Inkubation, dem 3-minütigen Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes, wird jedoch statt Annexin-Waschpuffer, 150µl Fluo-3-Waschpuffer (siehe Kapitel 4.3.3) zum Zellpellet pipettiert. Die Suspension wird nun für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Fluoreszenz des an Kalzium gebundenen Fluo-3 wird nun im FACS Calibur mit einer Erregungswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm gemessen.

5.5 Ceramide-Messung

Um die Menge an Ceramide zu ermitteln werden erneut Proben bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss werden 100µl aus den Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wird bei 1600 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand wird verworfen.

Dem Zellpellet werden nun 100µl Anti-Ceramide-PBS-BSA (siehe Kapitel 4.3.4) hinzu pipettiert. Die Suspension wird nun für eine Stunde bei 37°C im Wärmeschrank gelagert. Um die überschüssigen Antikörper zu entfernen wurden die Zellen zwei Mal gewaschen. Hierfür wurde PBS-BSA ohne Antikörper hinzugefügt und die Mikrotiterplatte für 3 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Nach den Waschvorgängen wird dem Zellpellet nun das in PBS-BSA, welches den FITC-konjugierten Antikörper (siehe Kapitel 4.2.5) enthält, zugefügt. Die

Proben erneut in den Inkubator gestellt, dieses Mal für 30 Minuten. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen erneut, wie zuvor beschrieben, gewaschen.

Für die Messung im FACS Calibur müssen die Zellen in einer Flüssigkeit suspendiert sein, weshalb zu jeder Probe 200µl PBS-BSA pipettiert wurde.

Die Fluoreszenz wurde nun im Durchflusszytometer mit einer Erregungswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm bestimmt.

5.6 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde aus jeder Probe 150µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und für 3 Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Je 150µl der 10µM DCFDA-Ringerlösung wurden zu den Proben pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im dunklen Wärmeschrank wurden 150µl Ringerlösung ohne DCFDA zu den Proben pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für drei Minuten bei 1600rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem die Zellen auf diese Weise drei Mal gewaschen wurden, pipettierte man 200µl Ringerlösung zum Zellpellet und maß die Fluoreszenz im FACS Calibur. Die Erregungswellenlänge betrug wieder 488nm und die Emissionswellenlänge 530nm.

5.7 Messung der Hämolyse

Substanzen können nicht nur zum suizidalen Zelltod von Erythrozyten führen, sondern auch zu deren Hämolyse. Hierbei wird Hämoglobin aus den Zellen freigesetzt. Um zu bestimmen, ob Carnosolsäure neben Erytose auch Hämolyse auslöst, wurde somit das freigesetzte Hämoglobin bestimmt.

Neben den Proben mit Carnosolsäure wurde für diesen Versuch auch Proben mit 4µl Erythrozytenkonzentrat in destilliertem Wasser angesetzt.

Die Proben wurden nach Inkubation für 3 Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden jeweils 100µl pipettiert. Die Überstände wurden dann im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 405nm untersucht.

Die Erythrozyten im destillierten Wasser wurden als 100% Hämolyse definiert, da Erythrozyten in destilliertem Wasser lysiert werden. Durch Verdünnung der lysierten Erythrozyten konnte eine Standardkurve für die Hämolyse der Erythrozyten erstellt werden.

Die Werte der Proben konnten nun mit der Standardkurve verglichen werden und somit die Hämolyse berechnet werden.

5.7 Statistik

Die Daten werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (=SEM) angegeben. Wie in den Abbildungen angegeben wurden die Daten statistisch analysiert mit Hilfe der Varianzanalyse (=ANOVA, analysis of variance), dem Schnelltest nach Turkey und dem t-Test.

Nur p-Werte, welche kleiner als 0,05 sind, wurden als statistisch signifikant gewertet.

n bezeichnet die Anzahl der Erythrozytenproben und somit der Patienten. Für jedes Erythrozytenkonzentrat wurden mit den Proben für das Experiment auch

Kontrollproben angesetzt, da Erythrozytenproben unterschiedlich auf proeryptotische Reize reagieren können.

6 Ergebnisse

Die in Kapitel 5 beschriebenen Versuche sollen klären, ob und ab welcher Konzentration Carnosolsäure auf die Eryptoserate von Erythrozyten Einfluss nimmt und durch welche Mechanismen Carnosolsäure eine verstärkte Eryptose auslöst.

6.1 Annexin-V-Bindung

Da Eryptose unter Anderem durch Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten gekennzeichnet ist (K. S. Lang et al., 2003), wurde die Menge an eryptotischen Zellen, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, gemessen, indem die Fluoreszenz des an Phosphatidylserin gebundenen, mit FITC konjugierten Annexin V am FACS Calibur bestimmt wurde.

Abbildung 2 und 3 veranschaulichen die erhöhte Annexin-V-Bindung unter Einfluss von Carnosolsäure.

Wie Abbildung 3 zeigt, reicht nach 48-stündiger Inkubation bereits eine Konzentration von 2,5µg/ml Carnosolsäure um eine signifikant erhöhte Phosphatidylserinexposition auszulösen. Die Anzahl Annexin V bindender Zellen steigt mit zunehmender Carnosolsäurekonzentration an (Stockinger et al., 2015).

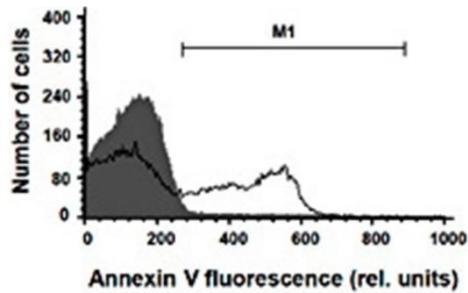


Abbildung 2: Effekt von Carnosolsäure auf die Phosphatidylserinexposition: Fluoreszenz-Histogramm (Stockinger et al., 2015)

Original Histogramm Annexin-V-bindender Zellen nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Linie) (Stockinger et al., 2015).

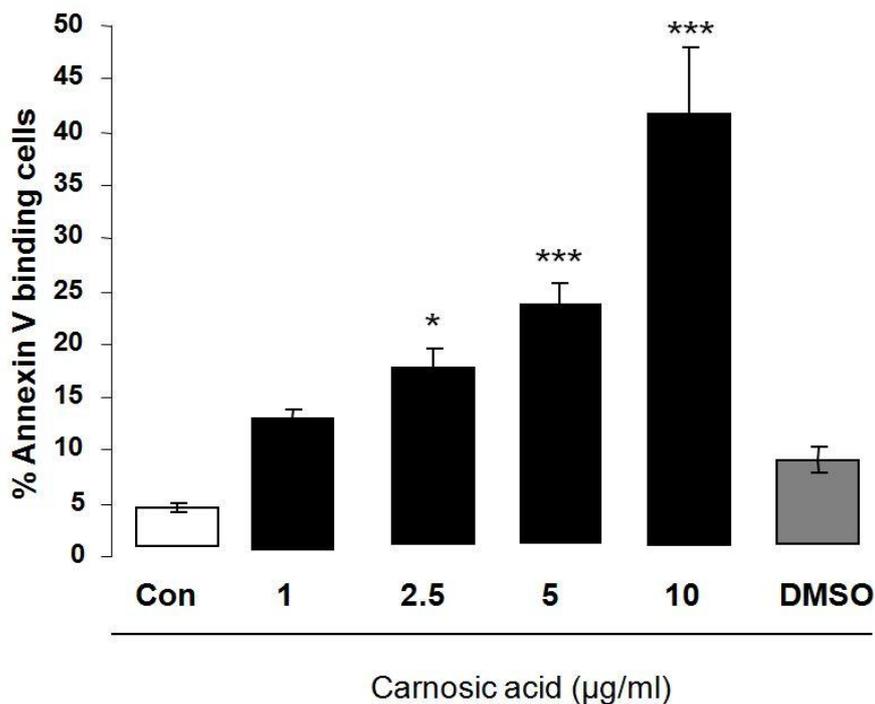


Abbildung 3: Konzentrationsabhängiger Effekt von Carnosolsäure auf die Phosphatidylserinexposition (Stockinger et al., 2015)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=11) der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung (weißer Balken), DMSO (1µl DMSO/ml Ringerlösung, grauer Balken) und verschiedener Konzentrationen (1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml) an Carnosolsäure (schwarze Balken). *($P < 0.05$) und ***($P < 0.001$) zeigen die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (ANOVA) (Stockinger et al., 2015).

6.2 Messung des Vorwärtsstreulichts

Volumenverlust und die somit einhergehende Zellschrumpfung ist ein weiteres Merkmal des suizidalen Zelltodes von Erythrozyten (Bratosin et al., 2001). Mittels Durchflusszytometrie konnte durch die Veränderung des Vorwärtsstreulichts Aussage über die Größe der Erythrozyten getroffen werden (siehe Kapitel 5.2). Nach 48 Stunden Inkubationszeit mit verschiedenen Konzentrationen an Carnosolsäure zeigte die Probe mit 10µg/ml Carnosolsäure ein signifikant verändertes Vorwärtsstreulicht. Abbildung 4 und 5 zeigen diese Veränderung des Vorwärtsstreulichts (Stockinger et al., 2015).

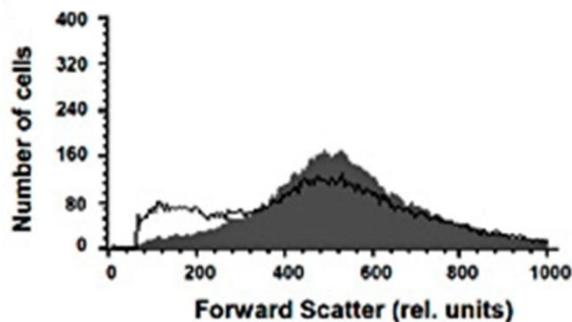


Abbildung 4: Effekt von Carnosolsäure auf Erythrozyten Forward Scatter: Histogramm (Stockinger et al., 2015)

Original Histogramm der Erythrozytenvorwärtsstreulichts nach 48 Stunden Inkubationszeit in Ringerlösung (graue Fläche) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Linie) (Stockinger et al., 2015).

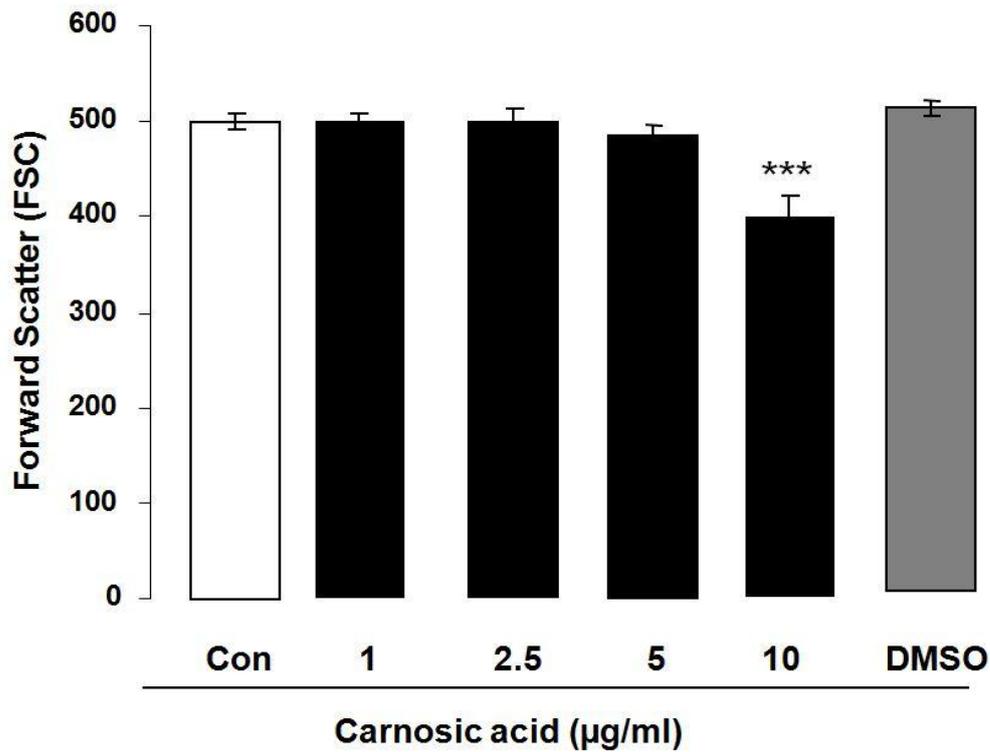


Abbildung 5: Konzentrationsabhängiger Effekt von Carnosolsäure auf Erythrozyten Forward Scatter (Stockinger et al., 2015)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=11) des Erythrozytenvorwärtsstreulichts nach Inkubation mit Ringer Lösung (weißer Balken), DMSO (1µlDMSO/ml Ringerlösung, grauer Balken) und unterschiedlichen Konzentrationen (1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml) an Carnosolsäure (schwarze Balken) für 48 Stunden. ***($P < 0.001$) zeigt die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (ANOVA) (Stockinger et al., 2015).

6.3 Messung des intrazellulären Kalziums

Erhöhtes zytosolisches, aus intrazellulären Kalziumspeichern freigesetztes oder von extrazellulär einströmendes Kalzium spielt eine Rolle bei der Zellschrumpfung während des suizidalen Zelltodes (K. S. Lang et al., 2003). Um die Auswirkung von Carnosolsäure auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu untersuchen, wurden die Erythrozytenproben für 48 Stunden mit und ohne Carnosolsäure inkubiert und mit Fluo-3-AM, welches an Kalzium bindet, markiert. Die erhöhte Fluo-3-Fluoreszenz stellte hierbei die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration dar. Wie Abbildung 6 und 7 zeigen, wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und erreicht ab einer Carnosolsäurekonzentration von 10µg/ml statistische Signifikanz (Stockinger et al., 2015).

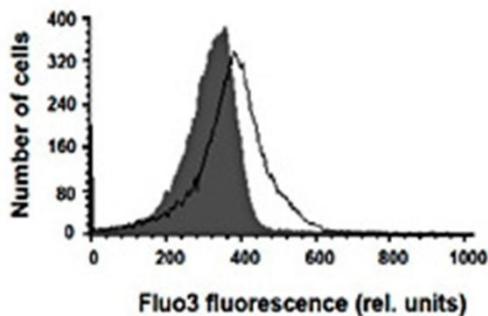


Abbildung 6: Effekt von Carnosolsäure auf intrazelluläre Kalziumaktivität: Histogramm (Stockinger et al., 2015)

Original Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz in Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Linie) (Stockinger et al., 2015).

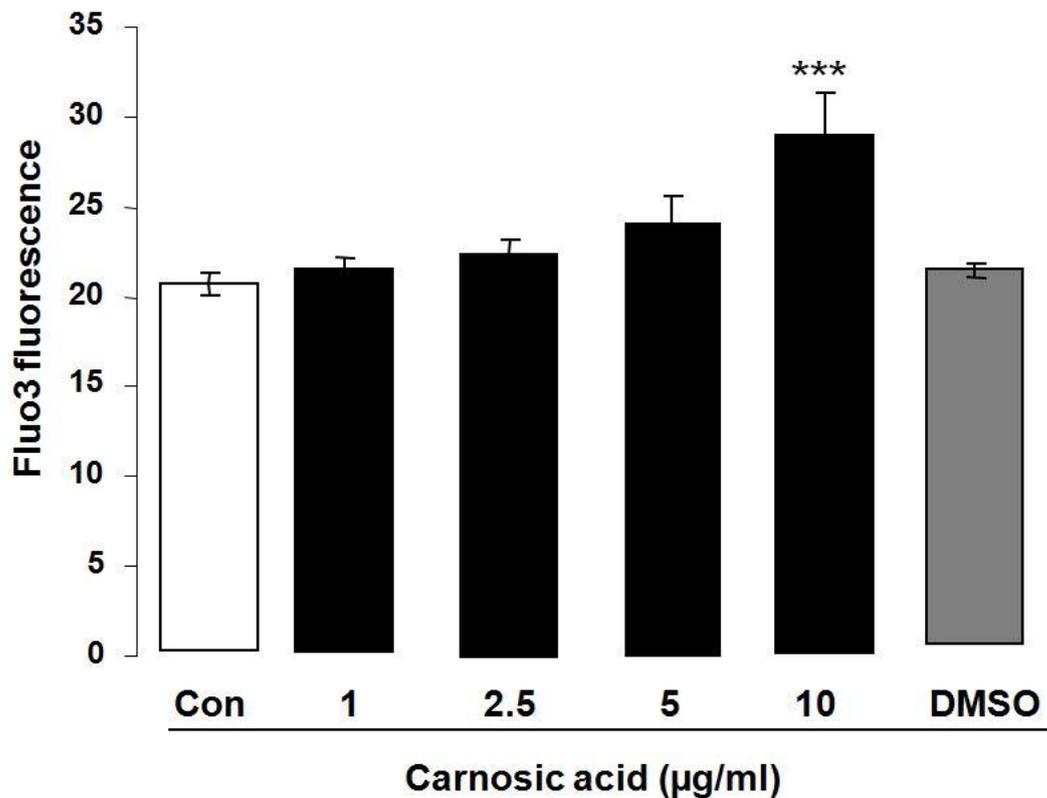


Abbildung 7: Konzentrationsabhängiger Effekt von Carnosolsäure auf intrazelluläre Kalziumaktivität (Stockinger et al., 2015)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=11) der Fluo-3-Fluoreszenz in Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung (weißer Balken), mit verschiedenen Konzentrationen (1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml) an Carnosolsäure (schwarze Balken) und mit DMSO (1µlDMSO/ml Ringerlösung, grauer Balken). ***($P<0.001$) zeigt die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (ANOVA) (Stockinger et al., 2015).

6.4 Eryptose im kalziumfreien Medium

Um zu testen, ob bei der von Carnosolsäure ausgelösten Eryptose die Öffnung von Kalziumkanälen mit Eintritt von extrazellulärem Kalzium eine Rolle spielt, wurden Erythrozytenproben für 48 Stunden sowohl mit 10µg/ml Carnosolsäure als auch ohne in kalziumhaltiger und kalziumfreier Ringerlösung inkubiert. Wie Abbildung 8 zeigt, wird die Wirkung von Carnosolsäure durch den Entzug von extrazellulärem Kalzium signifikant geschwächt. Dennoch zeigt Carnosolsäure auch im kalziumfreien Medium eine signifikante Erhöhung der Annexin-V-Bindung. Abbildung 9 zeigt, dass der Effekt von Carnosolsäure auf die Zellschrumpfung durch Kalziumentzug nicht signifikant geschwächt wurde (Stockinger et al., 2015).

Man kann somit davon ausgehen, dass der Kalziumeinstrom von extrazellulär einen Teil des Mechanismus darstellt, auf dem Carnosolsäure Eryptose auslöst, jedoch andere Mechanismen ebenfalls eine Rolle spielen.

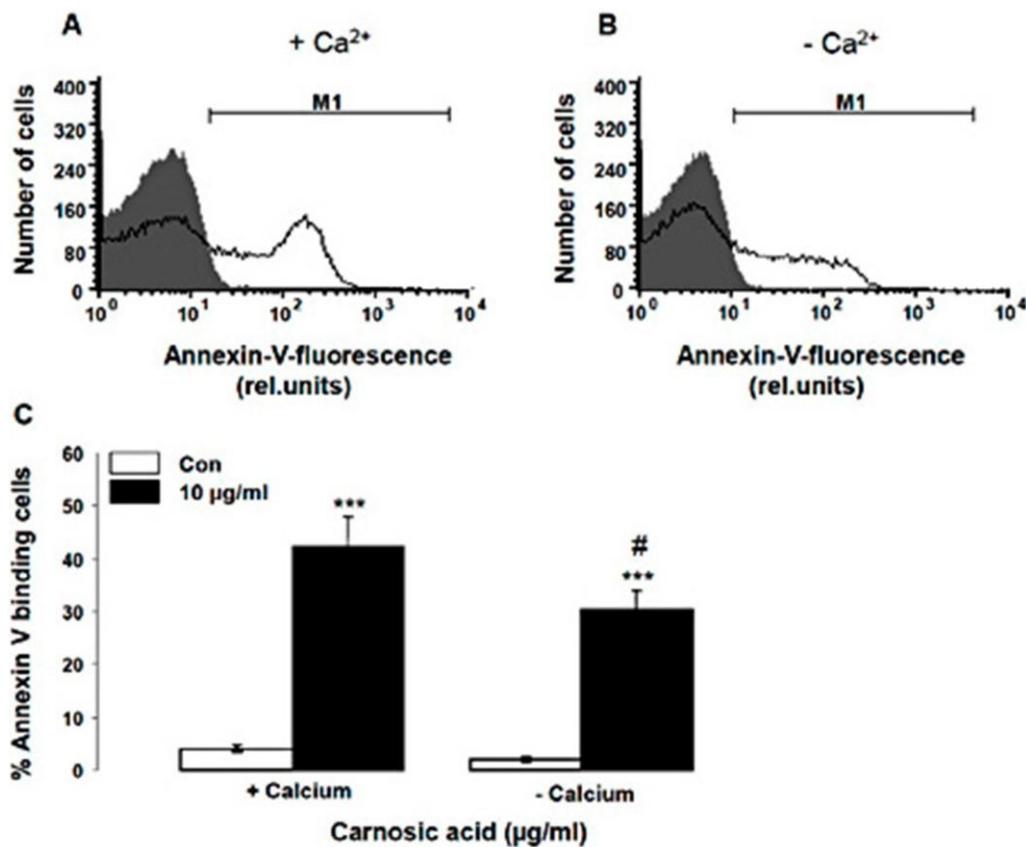


Abbildung 8: Kalziumsensitivität der von Carnosolsäure hervorgerufenen Phosphatidylserinexposition (Stockinger et al., 2015)

8A und 8B: Original Histogramm der Annexin-V-Bindung der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation mit Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Linie). Abbildung 8A stellt die Fluoreszenz in kalziumhaltiger Ringerlösung dar, Abbildung 8B im kalziumfreien Medium.

8C: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=12) der Annexin-V-Bindung in Erythrozyten nach 48 Stunden Inkubation in Ringerlösung ohne (weiße Balken) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Balken). Die linken Balken zeigen die Annexin-V-Bindung im kalziumhaltigen Medium, die rechten Balken im Kalziumfreien. ***($P < 0.001$) zeigt die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Negativkontrolle. #($P < 0.05$) zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kalziumhaltigen Ringerlösung (ANOVA) (Stockinger et al., 2015).

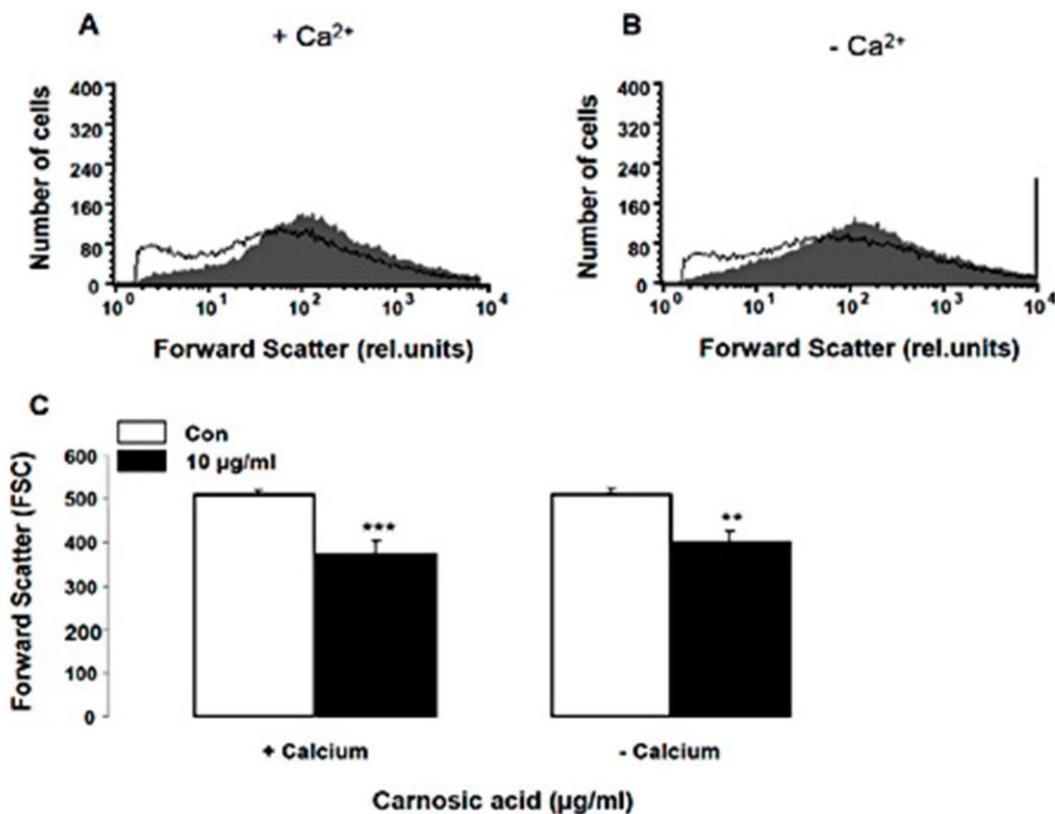


Abbildung 9: Kalziumsensitivität der von Carnosolsäure hervorgerufenen Zellschrumpfung (Stockinger et al., 2015)

9A und 9B: Original Histogramm des Erythrozyten Vorwärtsstreulichts nach Inkubation in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Linie). 9A stellt den gemessenen Forward Scatter in kalziumhaltiger Ringerlösung, 9B in kalziumfreier Ringerlösung dar.

9C: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=12) des Forward Scatter nach 48 Stunden Inkubation in Ringerlösung ohne (weiße Balken) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarze Balken). Die linken Balken zeigen den Forward Scatter im kalziumhaltigen Medium, die rechten Balken im Kalziumfreien. **($P < 0.01$) und ***($P < 0.001$) zeigen die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (Stockinger et al., 2015).

6.5 Ceramide-Messung

Da über den ceramide-abhängigen Signalweg die Eryptose auch ohne erhöhte Kalziumkonzentration eingeleitet werden kann, wurde getestet, ob Carnosolsäure Eryptose auch durch vermehrte Ceramide-Anreicherung der Erythrozytenmembran auslöst. Erythrozytenproben wurden daher für 48 Stunden inkubiert und die Ceramide-Anreicherung mittels fluoreszierender Antikörper im FACS Calibur gemessen. Figur 10 und 11 zeigen, dass bei einer Konzentration von 10µg/ml Carnosolsäure die Ceramide-Anreicherung der Membran signifikant erhöht wird. Carnosolsäure löst die Eryptose somit auch durch den ceramide-abhängigen Signalweg aus (Stockinger et al., 2015).

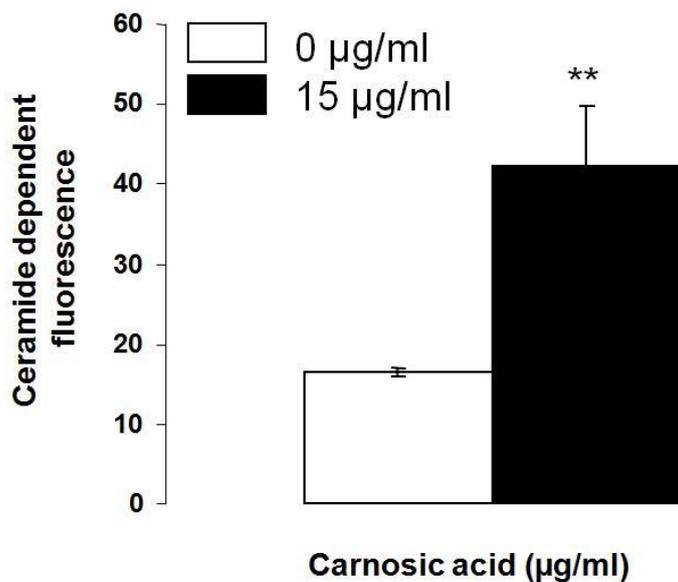


Abbildung 10: Wirkung von Carnosolsäure auf Ceramide-Anreicherung (Stockinger et al., 2015)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=5) der Ceramide-Anreicherung nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (schwarzer Balken). ** (p<0.01) zeigt eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle (t Test) (Stockinger et al., 2015).

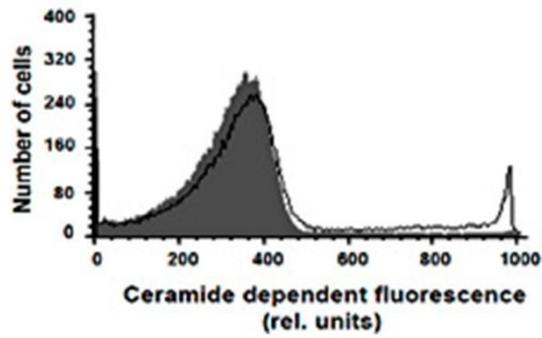


Abbildung 11: Wirkung von Carnosolsäure auf Ceramide-Anreicherung: Histogramm (Stockinger et al., 2015)

Original Histogramm der Ceramide-Anreicherung auf der Erythrozytenoberfläche nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit 10µg/ml Carnosolsäure (Stockinger et al., 2015).

6.6 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

Oxidativer Stress ist eine weitere Möglichkeit, Eryptose auszulösen (Duranton et al., 2002). Aus diesem Grund wurde getestet, ob nach der 48-stündigen Einwirkung von Carnosolsäure die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies zunimmt. Durch die Bindung von DCFDA an die reaktiven Sauerstoffspezies sollten diese im FACS Calibur als erhöhte Fluoreszenz analysierbar werden. Wie aus Abbildung 12 und 13 ersichtlich wird, vermindert Carnosolsäure (10µg/ml) nach 48 Stunden Inkubation die DCFDA-Fluoreszenz und somit den oxidativen Stress der Erythrozyten signifikant (Stockinger et al., 2015).

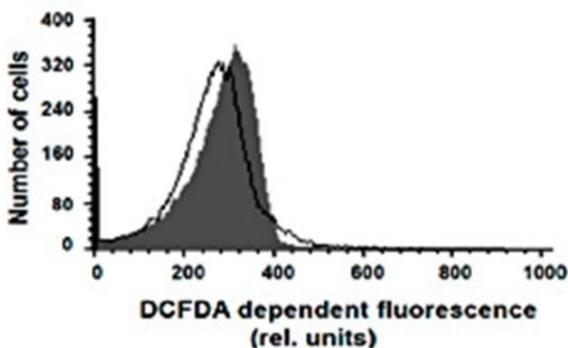


Abbildung 12: Wirkung von Carnosolsäure auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Erythrozyten: Histogramm (Stockinger et al., 2015)

Original Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer Inkubation von 48 Stunden in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit (schwarze Linie) 10µg/ml Carnosolsäure (Stockinger et al., 2015).

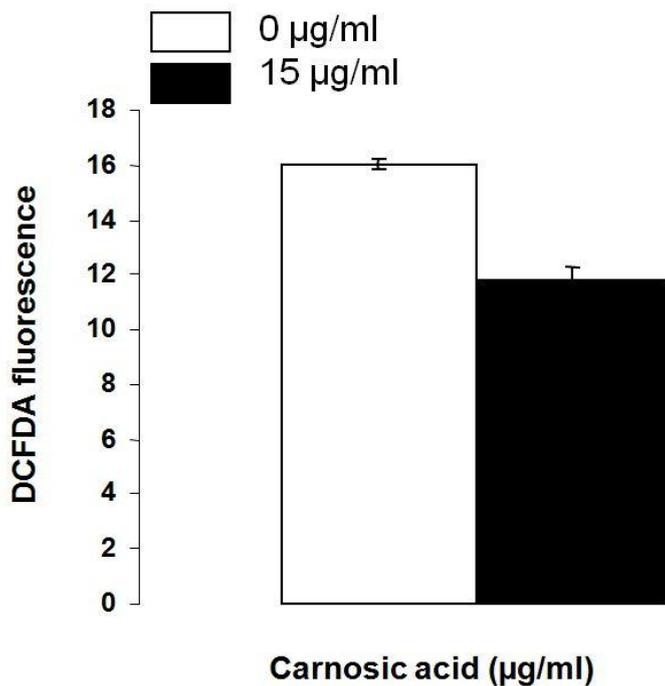


Abbildung 13: Wirkung von Carnosolsäure auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Erythrozyten (Stockinger et al., 2015)

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=5) der DCFDA-Fluoreszenz in Erythrozyten, welche 48 Stunden in Ringerlösung ohne (weißer Balken) oder mit (schwarzer Balken) 10µg/ml Carnosolsäure inkubiert wurden. ***($p < 0,001$) zeigt eine Signifikante Veränderung der Werte im Vergleich zur Negativkontrolle (t Test) (Stockinger et al., 2015).

6.7 Messung der Hämolyse

Wie in der Einleitung beschrieben, ist der suizidalen Zelltod der Erythrozyten, die Eryptose, von der Hämolyse abzugrenzen. Nachdem durch die vorigen Experimente bewiesen werden konnte, dass Carnosolsäure Einfluss auf die Eryptose von Erythrozyten hat, sollte nun geklärt werden, ob Carnosolsäure auch die Hämolyse der Erythrozyten induziert.

Bei der Hämolyse wird im Gegensatz zur Eryptose Hämoglobin freigesetzt. Dieses konnte im Überstand photometrisch bestimmt werden. Nach 48-stündiger Inkubation erhöht Carnosolsäure die Hämolyserate der Erythrozyten. Abbildung 14 zeigt, dass dieser Effekt ab einer Konzentration von 10µg/ml eine statistische Signifikanz erreicht (Stockinger et al., 2015).

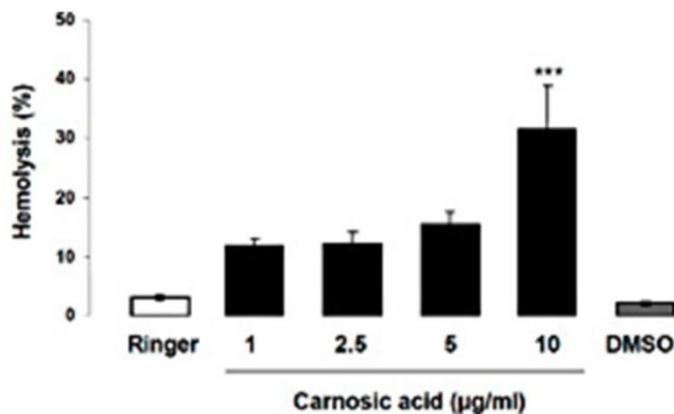


Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Wirkung von Carnosolsäure auf die Hämolyse (Stockinger et al., 2015)

Arithmetisches Mittel \pm SEM der Hämolyse (n=5) nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit verschiedenen Konzentrationen (1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml) an Carnosolsäure (schwarze Balken) und mit DMSO (1µlDMSO/ ml Ringerlösung, grauer Balken). ***(p<0,001) zeigt eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle (Stockinger et al., 2015).

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Methoden

Bei allen Versuchen dieser Studie wurde die Wirkung von Carnosolsäure auf Erythrozyten durch Erythrozytenkonzentrat getestet. Um die Versuche aussagekräftig zu machen, wurden die Rahmenbedingungen für die Versuche möglichst realistisch gewählt: Die Ringerlösung, welche als Nährmedium dient besitzt einen physiologischen pH von 7,4 und ist plasmaiton. Der Wärmeschrank wurde auf eine Temperatur von 37°C eingestellt, um den Rahmenbedingungen im menschlichen Körper möglichst nahe zu kommen. Trotzdem muss bedacht werden, dass die Versuche in vitro stattgefunden haben, nicht in vivo. Mögliche Änderungen der Ergebnisse unter den komplexen Bedingungen des Körpers lassen sich somit nicht ausschließen.

Des Weiteren wurden die Erythrozyten für nur 48 Stunden inkubiert. Im menschlichen Körper haben die roten Blutkörperchen eine durchschnittliche Lebensdauer von 120 Tagen. Während dieser Zeit können viele andere Stimuli auf die Erythrozyten einwirken und somit die Auswirkung von Carnosolsäure verstärken oder abschwächen. Darüber, inwiefern dies in einem in vivo-Experiment der Fall wäre, lässt sich durch die durchgeführten Versuche keine Aussage treffen.

Bei der Lagerung der Substanzen wurde auf die Herstellerangaben geachtet. Je nach Angabe wurden die Substanzen bei 4°C oder -20°C gelagert. Für lichtempfindliche Substanzen wurden lichtundurchlässige Behälter verwendet. Alle für die Substanzen verwendeten Behälter wurden vor und nach den Versuchen luftdicht verschlossen.

Das hergestellte Erythrozytenkonzentrat wurde in beschrifteten Eppendorf-Cups bei 4°C gelagert. Es wurde darauf geachtet, dass das Erythrozytenkonzentrat maximal zwei Tage gelagert wurde.

Alle Versuche wurden mit dem Erythrozytenkonzentrat mehrerer Spender durchgeführt um falsche Ergebnisse aufgrund individueller Unterschiede vorzubeugen. Die Messwerte wurden gemittelt um Messfehler auszugleichen.

Es wurde unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde immer unter einer Sterilbank pipettiert. Leichte Verunreinigungen der Proben können dennoch nicht komplett ausgeschlossen werden.

Um falschen Ergebnissen aufgrund verunreinigter Ringerlösung oder DMSO entgegenzuwirken, wurden Negativkontrollen ohne Carnosolsäure erstellt. Die Negativkontrollen würden des Weiteren vor falschen Ergebnissen im Fall von verunreinigtem Erythrozytenkonzentrat schützen.

Durchflusszytometrische Methoden sind in der Forschung zur Untersuchung von Zellen und Zellbestandteilen eine etablierte Technik und eignen sich somit auch zu Untersuchung der Eryptose. Um Verunreinigungen vorzubeugen wird das FACS Calibur im physiologischen Institut nach jeder Messung gereinigt.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass Carnosolsäure den suizidalen Zelltod von Erythrozyten stimuliert und geben Hinweise, auf welchen Signalwegen diese Substanz den suizidalen Zelltod der Erythrozyten auslöst.

Ein wichtiges Merkmal der Eryptose ist die Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Erythrozytenmembran (F. Lang & Qadri, 2012). Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, befindet sich Phosphatidylserin bei gesunden Zellen auf der Innenseite der Membran (Smith, 1987). Wird es durch Scramblasen an die Außenseite der Membran gebracht, können Rezeptoren der Makrophagen an diese Zellen binden und die Phagozytose einleiten (Rubartelli et al., 1997). Die Phosphatidylserinexposition besitzt allerdings auch einen negativen Effekt: Phosphatidylserin steigert die Adhäsion der Erythrozyten an Endothel und kann

somit zu Blutkoageln und zum Verschluss kleiner Kapillaren führen (Wautier et al., 2011; Wood et al., 1996).

Die Phosphatidylserinexposition wurde mit Hilfe der FITC-konjugierten Annexin-V-Bindung analysiert. Bei Inkubation mit Carnosolsäure erhöhte sich die Phosphatidylserinexposition ab einer Konzentration von 2,5µg/ml signifikant und stieg bei erhöhter Konzentration weiter an (Stockinger et al., 2015).

Die für suizidale Erythrozyten typische erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration konnte unter Einfluss von Carnosolsäure anhand der erhöhten Fluo-3-Fluoreszenz beobachtet werden (Stockinger et al., 2015).

Eryptotische Zellen schrumpfen, da Kaliumchlorid über Ionenkanäle, welche durch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, oxidativen Stress oder Ceramide geöffnet werden können, die Zelle verlässt und der Erythrozyt nun durch Osmose Wasser verliert (K. S. Lang et al., 2005a). Die Zellgröße wurde durch Bestimmung des Vorwärtsstreulicht analysiert. Unter Einfluss von Carnosolsäure verringerte sich die Größe der Erythrozyten. Dieser Effekt erreichte statistische Signifikanz ab einer Konzentration von 10µg/ml (Stockinger et al., 2015).

Um zu testen, ob Carnosolsäure die Eryptose auf dem kalziumabhängigen Signalweg auslöst, wurden Phosphatidylserinexposition und Zellgröße unter Einfluss von Carnosolsäure im kalziumfreien und kalziumhaltigen Nährmedium untersucht und verglichen. Sowohl Zellgröße als auch Phosphatidylserinexposition waren auch in kalziumfreier Ringerlösung signifikant verändert. Die Annexin-V-Bindung war signifikant geringer erhöht im Vergleich zum Versuch mit kalziumhaltiger Ringerlösung (Stockinger et al., 2015). Dies weist darauf hin, dass Carnosolsäure zum Teil durch den Kalziumeinstrom von extrazellulär die Eryptose auslöst, jedoch auch andere Mechanismen zugrunde liegen müssen.

Ein weiterer Mechanismus der Eryptose ist die Erhöhung des oxidativen Stresses in Erythrozyten. Die reaktiven Sauerstoffspezies wurden mittels DCFDA-Fluoreszenz bestimmt. Nach Inkubation mit Carnosolsäure verminderte sich die DCFDA-Fluoreszenz (Stockinger et al., 2015). Carnosolsäure wirkt somit nicht durch Erhöhung des oxidativen Stress pro-eryptotisch.

Um den ceramide-abhängigen Signalweg zu überprüfen wurde die Ceramide-Anreicherung der Erythrozytenmembran mittels mehrerer Antikörper bestimmt. Da der Ceramide-Gehalt der Erythrozytenmembran unter Einfluss von Carnosolsäure erhöht war, weist dies darauf hin, dass Carnosolsäure auch über den Ceramide-abhängigen Signalweg die Eryptose auslöst (Stockinger et al., 2015).

Eine erhöhte Auslese von Erythrozyten wirkt sich positiv auf den klinischen Verlauf von Malaria aus. Schon im Jahr 1954 konnte ein Zusammenhang zwischen Sichelzellanämie und Schutz vor Malaria festgestellt werden (Allison, 1954). Mittlerweile konnten Versuche zeigen, dass bei der vermehrten Phagozytose der sichelförmigen Erythrozyten die sich in ihnen vermehrenden Plasmodien ebenfalls beseitigt werden (Aidoo et al., 2002). Geht ein Erythrozyt aufgrund von Eryptose zugrunde, werden die in ihm befindlichen Malariaerreger ebenfalls zerstört (Foller et al., 2009a). Eine durch Carnosolsäure induzierte erhöhte Eryptoserate könnte somit ebenfalls positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf von Malariapatienten haben.

Eine vermehrte Eryptose ist mit vielen Krankheiten vergesellschaftet. Hierzu gehören unter anderem Eisenmangel- (Kempe et al., 2006) und Sichelzellanämie (P. A. Lang et al., 2009), hämolytisch-urämisches Syndrom (P. A. Lang et al., 2006b), Fieber (Foller et al., 2010a), Lebererkrankungen (P. A. Lang et al., 2007), Sepsis (Kempe et al., 2007), Niereninsuffizienz (Abed et al., 2014) und Lungenkrebs (Bissinger et al., 2016). Bei diesen Krankheiten könnte die durch Carnosol weiter verstärkte auftretende Eryptose zur Anämie führen, oder eine vorbestehende Anämie verschlimmern. Diese vorbestehenden Krankheiten könnten somit eine Kontraindikation für die Gabe von Carnosolsäure darstellen.

Um zu testen, ob Carnosolsäure auch hämolytisch wirkt, wurde das durch Hämolysen freigewordene Hämoglobin in den Überständen photometrisch bestimmt. Nach Inkubation mit Carnosolsäure war die Hämolysen ab einer Konzentration von 10 µg/ml signifikant erhöht (Stockinger et al., 2015). Geht ein Erythrozyt durch Hämolysen zugrunde, werden dessen zelluläre Bestandteile freigesetzt. Das von den Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin wirkt

schädigend auf die Gefäße und kann somit zu Thrombosen führen (Woollard et al., 2009). Besonders werden durch Häm auch die Tubuli der Niere geschädigt. Dies kann bei verstärkt auftretender Hämolyse bis zur Niereninsuffizienz führen (Qian et al., 2010). Sollte sich Carnosolsäure als Medikament etablieren, kann eine bereits bestehende Niereninsuffizienz eine Kontraindikation darstellen.

Carnosolsäure wirkt jedoch nicht nur auf Erythrozyten. In Versuchen zeigte Carnosolsäure anti-mikrobielle Eigenschaften gegen multi-resistente Staphylococcus-aureus-Stämme (Shin et al., 2013; Vazquez et al., 2016). Es erhöhte die Insulin-Sensitivität in Mäusen (Tsai et al., 2014) und wirkte neuroprotektiv in Ratten mit Alzheimer (Azad et al., 2011). Des Weiteren wirkte sich Carnosolsäure protektiv, wachstumshemmend und pro-apoptotisch in verschiedenen Tumoren aus (Offord et al., 1995; Rajasekaran et al., 2012; Singletary et al., 1996).

Trotz der Kontraindikationen lohnt sich somit weitere Forschung mit Carnosolsäure durch die vielseitigen positiven Einflüsse auf Krankheiten, welche bereits in vitro und in Tierversuchen gezeigt werden konnten.

8 Zusammenfassung

In dieser Studie sollte mittels in vitro Versuchen getestet werden, ob Carnosolsäure einen Einfluss auf den suizidalen Zelltod von Erythrozyten ausübt. Mittels verschiedener Versuche sollte geklärt werden, über welche Mechanismen Carnosolsäure die charakteristischen Merkmale der Eryptose auslöst.

Hierfür wurden Phosphatidylserinexposition, Zellschrumpfung, intrazelluläre Kalziumkonzentration, ROS- und Ceramidebildung gemessen. Phosphatidylserinexposition und Zellschrumpfung wurden sowohl im kalziumhaltigen als auch im kalziumfreien Nährmedium untersucht. Des Weiteren wurde getestet, ob Carnosolsäure hämolytisch wirkt.

Die Phosphatidylserinexposition wurde mithilfe von FITC-konjugiertem Annexin-V bestimmt. Carnosolsäure bewirkte sowohl in kalziumhaltiger, als auch in kalziumfreier Ringerlösung eine signifikant erhöhte Phosphatidylserinexposition, wobei dieser Effekt durch Kalziumentzug signifikant geschwächt wurde.

Die Zellschrumpfung wurde durch die Änderung im Vorwärtsstreulicht untersucht. Sowohl im kalziumhaltigen, als auch im kalziumfreien Medium war die Wirkung von Carnosolsäure signifikant. Kalziumentzug führte hierbei zu keiner signifikanten Abschwächung des Effekts.

Der signifikante Anstieg des intrazellulären Kalziums in den Erythrozyten nach Einwirkung von Carnosolsäure wurde am FACS Calibur mittels der Fluo-3-Fluoreszenz bestimmt.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und somit die DCFDA-Fluoreszenz sank nach Inkubation der Erythrozyten mit Carnosolsäure.

Um die Bildung von Ceramide nachzuweisen, wurden zwei unterschiedliche Antikörper verwendet und deren Fluoreszenz am FACS Calibur analysiert. Die Untersuchung zeigte eine signifikante Erhöhung der Ceramidebildung. Die Hämolyserate wurde durch photometrische Untersuchung des

Hämoglobingehalts im Überstand ermittelt. Carnosolsäure steigerte die Hämolyse signifikant.

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass Carnosolsäure pro-eryptotisch, aber auch hämolytisch wirkt und die Eryptose sowohl durch den kalziumabhängigen, als auch den ceramide-abhängigen Signalweg auslöst.

9 Literaturverzeichnis

- Abed, M., Artunc, F., Alzoubi, K., Honisch, S., Baumann, D., Foller, M., & Lang, F. (2014). Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med (Berl)*, 92(8), 871-879.
- Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
- Aidoo, M., Terlouw, D. J., Kolczak, M. S., McElroy, P. D., ter Kuile, F. O., Kariuki, S., . . . Udhayakumar, V. (2002). Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*, 359(9314), 1311-1312.
- Allison, A. C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J*, 1(4857), 290-294.
- Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 3(8), 917-921.
- Andersen, M. H., Sorensen, R. B., Schrama, D., Svane, I. M., Becker, J. C., & Thor Straten, P. (2008). Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. *Cancer Immunol Immunother*, 57(11), 1735-1743.
- Andolfo, I., Russo, R., Gambale, A., & Iolascon, A. (2016). New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*, 101(11), 1284-1294.
- Asanuma, K., Moriai, R., Yajima, T., Yagihashi, A., Yamada, M., Kobayashi, D., & Watanabe, N. (2000). Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res*, 91(11), 1204-1209.
- Athar, M. K., Puri, N., & Gerber, D. R. (2012). Anemia and blood transfusions in critically ill patients. *J Blood Transfus*, 2012, 629204.
- Azad, N., Rasoolijazi, H., Joghataie, M. T., & Soleimani, S. (2011). Neuroprotective effects of carnosic Acid in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. *Cell J*, 13(1), 39-44.
- Baumler, C. B., Bohler, T., Herr, I., Benner, A., Krammer, P. H., & Debatin, K. M. (1996). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood*, 88(5), 1741-1746.

- Beisker, W. (2013). Durchflusszytometrie isolierter subzellulärer Bestandteile. *BIOspektrum*, 19(1), 42-44.
- Berg, C. P., Engels, I. H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S. F., . . . Wesselborg, S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*, 8(12), 1197-1206.
- Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C., & Goldwasser, E. (1986). Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol*, 6(7), 2571-2575.
- Bhabak, K. P., Kleuser, B., Huwiler, A., & Arenz, C. (2013). Effective inhibition of acid and neutral ceramidases by novel B-13 and LCL-464 analogues. *Bioorg Med Chem*, 21(4), 874-882.
- 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.
- Bieberich, E. (2008). Ceramide signaling in cancer and stem cells. *Future Lipidol*, 3(3), 273-300.
- Birtic, S., Dussort, P., Pierre, F. X., Bily, A. C., & Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9-19.
- Bissinger, R., Schumacher, C., Qadri, S. M., Honisch, S., Malik, A., Gotz, F., . . . Lang, F. (2016). Enhanced eryptosis contributes to anemia in lung cancer patients. *Oncotarget*, 7(12), 14002-14014.
- Bodey, B., Bodey, B., Jr., & Kaiser, H. E. (1998). Apoptosis in the mammalian thymus during normal histogenesis and under various in vitro and in vivo experimental conditions. *In Vivo*, 12(1), 123-133.
- 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.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., . . . Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286(5445), 1735-1738.
- Boulakia, C. A., Chen, G., Ng, F. W., Teodoro, J. G., Branton, P. E., Nicholson, D. W., . . . Shore, G. C. (1996). Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene*, 12(3), 529-535.

- Brand, V., Koka, S., Lang, C., Jendrossek, V., Huber, S. M., Gulbins, E., & Lang, F. (2008). Influence of amitriptyline on eryptosis, parasitemia and survival of Plasmodium berghei-infected mice. *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6), 405-412.
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J. P., . . . Ameisen, J. C. (2001). Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ*, 8(12), 1143-1156.
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., & Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22(53), 8608-8618.
- Brieskorn, C. H., & Domling, H. J. (1969). [Natural and synthetic derivatives of carnosol acid]. *Mitt Dtsch Pharm Ges Pharm Ges DDR*, 39(9), 641-649.
- Browning, J. A., Ellory, J. C., & Gibson, J. S. (2006). Pathophysiology of red cell volume. *Contrib Nephrol*, 152, 241-268.
- Chandele, A., Prasad, V., Jagtap, J. C., Shukla, R., & Shastry, P. R. (2004). Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia*, 6(1), 29-40.
- Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology*, 18(4), 157-164.
- Cluitmans, J. C., Hardeman, M. R., Dinkla, S., Brock, R., & Bosman, G. J. (2012). Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank. *Blood Transfus*, 10 Suppl 2, s12-18.
- Cohn, E. J., Strong, L. E., & et al. (1946). Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc*, 68, 459-475.
- Cryns, V., & Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev*, 12(11), 1551-1570.
- Cunningham, C. C. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol*, 129(6), 1589-1599.
- Daleke, D. L. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*, 15(3), 191-195.

- de Oliveira, M. R., Peres, A., Ferreira, G. C., Schuck, P. F., & Bosco, S. M. (2016). Carnosic Acid Affords Mitochondrial Protection in Chlorpyrifos-Treated Sh-Sy5y Cells. *Neurotox Res*, 30(3), 367-379.
- Devaux, P. F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 30(5), 1163-1173.
- Dinkla, S., Wessels, K., Verdurmen, W. P., Tomelleri, C., Cluitmans, J. C., Fransen, J., . . . Bosman, G. J. (2012). Functional consequences of sphingomyelinase-induced changes in erythrocyte membrane structure. *Cell Death Dis*, 3, e410.
- Doshi, N., Zahr, A. S., Bhaskar, S., Lahann, J., & Mitragotri, S. (2009). Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(51), 21495-21499.
- Douglas, C. G., Haldane, J. S., & Haldane, J. B. (1912). The laws of combination of haemoglobin with carbon monoxide and oxygen. *J Physiol*, 44(4), 275-304.
- Dumaswala, U. J., Wilson, M. J., Wu, Y. L., Wykle, J., Zhuo, L., Douglass, L. M., & Daleke, D. L. (2000). Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radic Res*, 33(5), 517-529.
- Durantou, 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.
- Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(4), a011601.
- Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 7(3), 337-343.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
- Erslev, A. J., & Besarab, A. (1997). Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int*, 51(3), 622-630.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*, 108(7), 957-962.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 330-349.

- Floride, E., Foller, M., Ritter, M., & Lang, F. (2008). Caffeine inhibits suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 22(1-4), 253-260.
- Foller, M., Bobbala, D., Koka, S., Huber, S. M., Gulbins, E., & Lang, F. (2009a). Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem*, 24(3-4), 133-140.
- Foller, M., Braun, M., Qadri, S. M., Lang, E., Mahmud, H., & Lang, F. (2010a). Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. *Eur J Clin Invest*, 40(6), 534-540.
- Foller, M., Mahmud, H., Qadri, S. M., Gu, S., Braun, M., Bobbala, D., . . . Lang, F. (2010b). Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death. *FASEB J*, 24(9), 3351-3359.
- Foller, M., Sopjani, M., Koka, S., Gu, S., Mahmud, H., Wang, K., . . . Lang, F. (2009b). Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *FASEB J*, 23(4), 1072-1080.
- French, L. E., & Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*, 10(1), 117-123.
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmelewskij, W., & Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*, 14(4), 584-596.
- Friesen, C., Fulda, S., & Debatin, K. M. (1997). Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia*, 11(11), 1833-1841.
- Fukuda, S., & Pelus, L. M. (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*, 5(5), 1087-1098.
- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*, 273(49), 32608-32613.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3), 493-501.
- Gerschenson, L. E., & Geske, F. J. (2001). Virchow and apoptosis. *Am J Pathol*, 158(4), 1543.

- Ghashghaieinia, M., Cluitmans, J. C., Akel, A., Dreischer, P., Toulany, M., Koberle, M., . . . Bosman, G. J. (2012). The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br J Haematol*, *157*(5), 606-614.
- Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., . . . Hayden, M. R. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet*, *13*(4), 442-449.
- Gottardi, D., Bukvicki, D., Prasad, S., & Tyagi, A. K. (2016). Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Front Microbiol*, *7*, 1394.
- Grantham-McGregor, S., & Ani, C. (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr*, *131*(2S-2), 649S-666S; discussion 666S-668S.
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, *281*(5381), 1309-1312.
- Grimsley, C., & Ravichandran, K. S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol*, *13*(12), 648-656.
- Gronowicz, G., Swift, H., & Steck, T. L. (1984). Maturation of the reticulocyte in vitro. *J Cell Sci*, *71*, 177-197.
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J*, *23*(6), 1625-1637.
- Haanen, C., & Vermes, I. (1996). Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *64*(1), 129-133.
- Haendeler, J., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (1999). Nitric oxide and apoptosis. *Vitam Horm*, *57*, 49-77.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., & Fadok, V. A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(8), 627-633.
- Hughes, M. A., Powley, I. R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., . . . MacFarlane, M. (2016). Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Mol Cell*, *61*(6), 834-849.
- Huwiler, A., & Zangemeister-Wittke, U. (2007). Targeting the conversion of ceramide to sphingosine 1-phosphate as a novel strategy for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, *63*(2), 150-159.

- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 277-288.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., . . . Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388(6638), 190-195.
- Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Nakahara, T., Yamanaka, K., Hatashita, E., . . . Nakagawa, K. (2008). Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 14(20), 6496-6504.
- Jelkmann, W. (2007). Blut. In R. F. Schmidt & F. Lang (Eds.), *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie* (pp. 523-549). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Jiang, M., & Milner, J. (2003). Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Dev*, 17(7), 832-837.
- Kayalar, C., Ord, T., Testa, M. P., Zhong, L. T., & Bredesen, D. E. (1996). Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(5), 2234-2238.
- Kayashima, T., & Matsubara, K. (2012). Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76(1), 115-119.
- Kempe, D. S., Akel, A., Lang, P. A., Hermle, T., Biswas, R., Muresanu, J., . . . Lang, F. (2007). Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)*, 85(3), 273-281.
- Kempe, D. S., Lang, P. A., Durantoni, C., Akel, A., Lang, K. S., Huber, S. M., . . . Lang, F. (2006). Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J*, 20(2), 368-370.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., & Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8), 2013-2026.
- 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.
- Khanna, R., Chang, S. H., Andrabi, S., Azam, M., Kim, A., Rivera, A., . . . Chishti, A. H. (2002). Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 6637-6642.

- Kim, Y. M., Talanian, R. V., & Billiar, T. R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 272(49), 31138-31148.
- Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S., Niemoeller, O. M., Akel, A., Sobiesiak, M., . . . Lang, F. (2006). Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(1), C244-253.
- Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, 270(5233), 96-99.
- Koch, C., Brumme, B., & Müller, S. (2013). Mikrobielle Gemeinschaften im Visier der Durchflusszytometrie. *BIOspektrum*, 19(4), 396-400.
- Kodicek, M., Suttner, J., Mircevova, L., & Marik, T. (1990). Red blood cells under mechanical stress. *Gen Physiol Biophys*, 9(3), 291-299.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805), 789-795.
- Kuroda, J., Kimura, S., Strasser, A., Andreeff, M., O'Reilly, L. A., Ashihara, E., . . . Maekawa, T. (2007). Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Differ*, 14(9), 1667-1677.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, 17(4), 525-535.
- Kuwana, T., & Newmeyer, D. D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), 691-699.
- Lang, E., & Lang, F. (2015). Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int*, 2015, 513518.
- Lang, F. (2007). Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*, 26(5 Suppl), 613S-623S.
- 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.

- Lang, F., & Qadri, S. M. (2012). Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif*, 33(1-3), 125-130.
- Lang, K. S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., . . . Huber, S. M. (2003). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 10(2), 249-256.
- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M., & Lang, F. (2005a). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 15(5), 195-202.
- Lang, K. S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P. A., Berchtold, S., . . . Wieder, T. (2004a). Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 11(2), 231-243.
- Lang, K. S., Myssina, S., Lang, P. A., Tanneur, V., Kempe, D. S., Mack, A. F., . . . Duranton, C. (2004b). Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(6), F1046-1053.
- Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., Hermle, T., . . . Lang, F. (2006b). Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 84(5), 378-388.
- Lang, P. A., Kasinathan, R. S., Brand, V. B., Duranton, C., Lang, C., Koka, S., . . . Huber, S. M. (2009). Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem*, 24(5-6), 415-428.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Akel, A., Klarl, B. A., Eisele, K., Podolski, M., . . . Duranton, C. (2005b). Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372(3), 228-235.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Tanneur, V., Eisele, K., Klarl, B. A., Myssina, S., . . . Wieder, T. (2005c). Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*, 118(Pt 6), 1233-1243.
- Lang, P. A., Schenck, M., Nicolay, J. P., Becker, J. U., Kempe, D. S., Lupescu, A., . . . Lang, F. (2007). Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med*, 13(2), 164-170.
- Lee, H., Rotolo, J. A., Mesicek, J., Penate-Medina, T., Rimner, A., Liao, W. C., . . . Kolesnick, R. (2011). Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS One*, 6(6), e19783.
- Li, F., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., . . . Altieri, D. C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis

- induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol*, 1(8), 461-466.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., . . . et al. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(22), 7580-7584.
- Linde, H. (1964). Ein neues Diterpen aus *Salvia officinalis* L. und eine Notiz zur Konstitution von Pikrosalvin. *Helvetica Chimica Acta*, 47(5), 1234-1239.
- Liu, J., Beckman, B. S., & Foroozesh, M. (2013). A review of ceramide analogs as potential anticancer agents. *Future Med Chem*, 5(12), 1405-1421.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481-490.
- Lux, S. E. t. (2016). Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*, 127(2), 187-199.
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1), 3-15.
- Manning, L. R., Russell, J. E., Popowicz, A. M., Manning, R. S., Padovan, J. C., & Manning, J. M. (2009). Energetic differences at the subunit interfaces of normal human hemoglobins correlate with their developmental profile. *Biochemistry*, 48(32), 7568-7574.
- Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, 21(1), 92-101.
- McEvoy, M. T., & Shander, A. (2013). Anemia, bleeding, and blood transfusion in the intensive care unit: causes, risks, costs, and new strategies. *Am J Crit Care*, 22(6 Suppl), eS1-13; quiz eS14.
- McLean, E., Cogswell, M., Egli, I., Wojdyla, D., & de Benoist, B. (2009). Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr*, 12(4), 444-454.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 16(10), 2794-2804.
- Melki, J. (1997). Spinal muscular atrophy. *Curr Opin Neurol*, 10(5), 381-385.

- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., & Pittman, R. N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*, 140(3), 627-636.
- Nagatomo, S., Nagai, Y., Aki, Y., Sakurai, H., Imai, K., Mizusawa, N., . . . Nagai, M. (2015). An Origin of Cooperative Oxygen Binding of Human Adult Hemoglobin: Different Roles of the alpha and beta Subunits in the alpha2beta2 Tetramer. *PLoS One*, 10(8), e0135080.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765), 98-103.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M. C., . . . et al. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science*, 261(5128), 1584-1588.
- Nguyen-Lefebvre, A. T., & Horuzsko, A. (2015). Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab*, 1(1).
- Nicolay, J. P., Liebig, G., Niemoeller, O. M., Koka, S., Ghashghaieina, M., Wieder, T., . . . Lang, F. (2008). Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch*, 456(2), 293-305.
- Niemoeller, O. M., Bentzen, P. J., Lang, E., & Lang, F. (2007). Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. *Pflugers Arch*, 454(3), 427-439.
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., . . . Yoshikawa, M. (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(8), 1943-1946.
- Oberle, V., Soßdorf, M., & Lösche, W. (2010). Durchflusszytometrie. In B. Pötzsch & K. Madlener (Eds.), *Hämostaseologie* (pp. 935-939). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Offord, E. A., Mace, K., Ruffieux, C., Malnoe, A., & Pfeifer, A. M. (1995). Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*, 16(9), 2057-2062.
- Oh, J., Yu, T., Choi, S. J., Yang, Y., Baek, H. S., An, S. A., . . . Cho, J. Y. (2012). Syk/Src pathway-targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. *Mediators Inflamm*, 2012, 781375.
- Oonishi, T., Sakashita, K., Ishioka, N., Suematsu, N., Shio, H., & Uyesaka, N. (1998). Production of prostaglandins E1 and E2 by adult human red blood cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 56(2-3), 89-101.

- Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4), 631-644.
- Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C., & Milon, A. (1996). Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Virol*, 70(9), 5860-5866.
- Pickup, D. J., Ink, B. S., Hu, W., Ray, C. A., & Joklik, W. K. (1986). Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(20), 7698-7702.
- Plescia, J., Salz, W., Xia, F., Pennati, M., Zaffaroni, N., Daidone, M. G., . . . Altieri, D. C. (2005). Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell*, 7(5), 457-468.
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., & Salvesen, G. S. (2006). The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell*, 22(2), 269-275.
- Qian, Q., Nath, K. A., Wu, Y., Daoud, T. M., & Sethi, S. (2010). Hemolysis and acute kidney failure. *Am J Kidney Dis*, 56(4), 780-784.
- Rajasekaran, D., Manoharan, S., Silvan, S., Vasudevan, K., Baskaran, N., & Palanimuthu, D. (2012). Proapoptotic, anti-cell proliferative, anti-inflammatory and anti-angiogenic potential of carnosic acid during 7,12 dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10(1), 102-112.
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., . . . Nicholson, D. W. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, 5(4), 271-288.
- Rohn, T. T. (2010). The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis*, 15(11), 1403-1409.
- Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., . . . et al. (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 80(1), 167-178.
- Rubartelli, A., Poggi, A., & Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol*, 27(8), 1893-1900.

- Rusia, U., Madan, N., Agarwal, N., Sikka, M., & Sood, S. K. (1995). Effect of maternal iron deficiency anaemia on foetal outcome. *Indian J Pathol Microbiol*, 38(3), 273-279.
- Samantaray, S., Knaryan, V. H., Guyton, M. K., Matzelle, D. D., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2007). The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience*, 146(2), 741-755.
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3460-3470.
- Sartorius, U., Schmitz, I., & Krammer, P. H. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*, 2(1), 20-29.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., & Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14(3), 131-136.
- Setty, B. N., Kulkarni, S., Rao, A. K., & Stuart, M. J. (2000). Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood*, 96(3), 1119-1124.
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a008714.
- Shimizu, S., Narita, M., & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399(6735), 483-487.
- Shin, H. B., Choi, M. S., Ryu, B., Lee, N. R., Kim, H. I., Choi, H. E., . . . Inn, K. S. (2013). Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virology*, 453(2), 303-310.
- Singletary, K., MacDonald, C., & Wallig, M. (1996). Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett*, 104(1), 43-48.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., . . . Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 144(2), 281-292.
- Smith, J. E. (1987). Erythrocyte membrane: structure, function, and pathophysiology. *Vet Pathol*, 24(6), 471-476.

- Spivak, J. L. (1994). Cancer-related anemia: its causes and characteristics. *Semin Oncol*, 21(2 Suppl 3), 3-8.
- Steer, P. J. (2000). Maternal hemoglobin concentration and birth weight. *Am J Clin Nutr*, 71(5 Suppl), 1285S-1287S.
- Stocker, R., Hunt, N. H., Buffinton, G. D., Weidemann, M. J., Lewis-Hughes, P. H., & Clark, I. A. (1985). Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to Plasmodium vinckei load. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(2), 548-551.
- Stockinger, K., Bissinger, R., Bouguerra, G., Abbes, S., & Lang, F. (2015). Enhanced Eryptosis Following Exposure to Carnosic Acid. *Cell Physiol Biochem*, 37(5), 1779-1791.
- Stroh, C., & Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 5(12), 997-1000.
- Svetina, S. (2012). Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. *Cell Mol Biol Lett*, 17(2), 171-181.
- Theoduloz, C., Pertino, M. W., & Schmeda-Hirschmann, G. (2014). Gastroprotective mechanisms of action of semisynthetic carnosic acid derivatives in human cells. *Molecules*, 19(1), 581-594.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., . . . Tschopp, J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 386(6624), 517-521.
- Tsai, C. W., Lin, C. Y., Lin, H. H., & Chen, J. H. (2011). Carnosic acid, a rosemary phenolic compound, induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated p38 activation in human neuroblastoma IMR-32 cells. *Neurochem Res*, 36(12), 2442-2451.
- Tsai, C. W., Liu, K. L., Lin, Y. R., & Kuo, W. C. (2014). The mechanisms of carnosic acid attenuates tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res*, 58(4), 654-664.
- Valone, F. H., & Johnson, B. (1987). Modulation of platelet-activating-factor-induced calcium influx and intracellular calcium release in platelets by phorbol esters. *Biochem J*, 247(3), 669-674.
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1-9.

- Vazquez, N. M., Fiorilli, G., Caceres Guido, P. A., & Moreno, S. (2016). Carnosic acid acts synergistically with gentamicin in killing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Phytomedicine*, 23(12), 1337-1343.
- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75(2), 229-240.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390(6658), 350-351.
- Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem*, 39, 53-71.
- Wang, L., Yang, J. K., Kabaleeswaran, V., Rice, A. J., Cruz, A. C., Park, A. Y., . . . Wu, H. (2010). The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat Struct Mol Biol*, 17(11), 1324-1329.
- Wang, S., & El-Deiry, W. S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22(53), 8628-8633.
- Wautier, M. P., Heron, E., Picot, J., Colin, Y., Hermine, O., & Wautier, J. L. (2011). Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost*, 9(5), 1049-1055.
- Wellwood, C. R., & Cole, R. A. (2004). Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J Agric Food Chem*, 52(20), 6101-6107.
- Wolfgang, D. D., & Wolfgang, G. D. (1971). Automatisches Mess- und Zaehlgeraet fuer die Teilchen einer Dispersion: Google Patents.
- Wood, B. L., Gibson, D. F., & Tait, J. F. (1996). Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood*, 88(5), 1873-1880.
- Woollard, K. J., Sturgeon, S., Chin-Dusting, J. P., Salem, H. H., & Jackson, S. P. (2009). Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. *J Biol Chem*, 284(19), 13110-13118.

- Wright, M. E., Han, D. K., & Hockenbery, D. M. (2000). Caspase-3 and inhibitor of apoptosis protein(s) interactions in *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *FEBS Lett*, *481*(1), 13-18.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., & Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, *83*(1), 59-67.
- Yellen, S. B., Cella, D. F., Webster, K., Blendowski, C., & Kaplan, E. (1997). Measuring fatigue and other anemia-related symptoms with the Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT) measurement system. *J Pain Symptom Manage*, *13*(2), 63-74.
- Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., & Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr*, *65*(2), 158-163.
- Zhou, Q., Krebs, J. F., Snipas, S. J., Price, A., Alnemri, E. S., Tomaselli, K. J., & Salvesen, G. S. (1998). Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry*, *37*(30), 10757-10765.
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, *19*, 124-128.

10 Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Stockinger, K., Bissinger, R., Bouguerra, G., Abbes, S., & Lang, F. (2015).
Enhanced Eryptosis Following Exposure to Carnosic Acid. *Cell Physiol
Biochem*, 37(5), 1779-1791.

11 Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie erfolgte am physiologischen Institut der Universität Tübingen und wurde von Professor Dr. med. Dr. h.c. Florian Lang betreut.

Die Konzeption der Studie erfolgte ebenfalls durch Professor Dr. Lang. Er verfasste und korrigierte die in Kapitel 10 genannte Publikation.

Frau Dr. Bissinger gab bei Problemen Hilfestellung und war bei Fragen meine Ansprechpartnerin. Sie gab mir Einweisungen in das wissenschaftliche Arbeiten und die Versuche und erklärte mir die Geräte und Programme. Sie führte einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 8, 9, 10 und 11 dargestellt sind, durch.

Frau Bouguerra hat einen Teil der Versuche, die in Abbildung 14 dargestellt sind, durchgeführt.

Professor Salem Abbès korrigierte die Publikation.

Ich habe die Versuche, die in den Abbildungen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 und 13 und einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 8, 9, 10, 11 und 14 dargestellt sind, durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Anleitung von Dr. Bissinger durch mich.

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

Tübingen, den 22.09.17

Katja Jane Stockinger

12 Danksagungen

Ohne die Unterstützung vieler Menschen wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen. Ihnen möchte ich hier noch einmal meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Besonders möchte ich Prof. Dr. med. Dr. h.c. Florian Lang danken. Durch Ihr Angebot auf einen Doktorantenplatz am Physiologischen Institut, Ihre fortwährende Betreuung und großes Wissen lernte ich jeden Tag am Institut etwas Neues. Ihre Begeisterung für Forschung ist ansteckend und für die Geduld und den Rat, welche Sie mir bei Fragen und Problemen entgegenbrachten, möchte ich Ihnen herzlich danken.

Dr. Rosi Bissinger möchte ich ebenfalls danken. Du hast Dir immerzu Zeit für mich genommen und warst bei Problemen sofort zur Stelle. Mit Dir haben sowohl die Recherche als auch die Versuche immer Spaß gemacht.

Mein Dank gilt ebenso dem ganzen Eryptose-Team. Ihr wart immerzu aufgeschlossen und hilfsbereit und mit Euch war im Labor immer eine harmonische Atmosphäre. Ich danke Euch dafür, wie herzlich Ihr mich aufgenommen habt.

Zu guter letzt möchte ich meiner Familie danken. Meine Eltern und Geschwister haben mich mein Leben lang mit Liebe und Rat unterstützt. In schwierigen Situationen wart Ihr immer an meiner Seite. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen.

Aus diesem Grund widme ich diese Dissertation meiner Familie.