

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung für Vegetative und Klinische Physiologie

**Stimulation der Eryptose durch Anidulafungin und
Caspofungin**

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

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

vorgelegt von

Peter, Thomas

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

- 1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. F. Lang
- 2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder
- 3. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. Dr. M. André
- 4. Berichterstatter: Professorin Dr. A. Garcia-Sáez

Tag der Disputation: 19.02.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Erythrozyten.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion.....	1
1.1.2 Morphologisch veränderte Erythrozyten	3
1.1.3 Erkrankungen der Erythrozyten	4
1.2 Die Apoptose.....	5
1.3 Morphologische Kennzeichen der Apoptose	6
1.4 Abgrenzung zur Nekrose.....	7
1.5 Bedeutung der Apoptose	7
1.6 Die Eryptose.....	7
1.6.1 Definition und Abgrenzung zur Apoptose.....	7
1.6.2 Begünstigende Faktoren und morphologische Merkmale	8
1.6.3 Signalwege	9
1.6.4 Bedeutung der Eryptose	11
1.7 Anidulafungin und Caspofungin	12
1.7.1 Allgemeines	12
1.7.2 Wirkungsmechanismus.....	13
1.7.3 Indikationen	15
1.8 Wichtige verwendete Substanzen	15
1.8.1 Acetylcystein.....	15

1.8.2 D4476	15
1.8.3 Nitroprussid-Natrium	15
1.8.4 SB203580	16
1.8.5 Staurosporin	16
1.8.6 z-VAD	16
1.9 Fragestellung	16
2. Materialien und Methoden	18
2.1 Verwendete Materialien	18
2.1.1 Verwendete Geräte	18
2.1.2 Zellen	18
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Verwendete Lösungen	20
2.2 Methoden	24
2.2.1 Die FACS-Analyse	24
2.2.2 Vorbereitung der Zellen	24
2.2.3 Inkubation der Zellen	24
2.2.4 Annexin und Forward Scatter Messung	25
2.2.5 Fluo-3 Fluoreszenz	26
2.2.6 Ceramid abhängige Fluoreszenz	26
2.2.7 ROS abhängige Fluoreszenz	27
2.2.8 Messung der Hämolyse	28
2.2.9 Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Stimulation der Eryptose durch Anidulafungin	29
3.1.1 Annexin V Bindung	29
3.1.2 Forward Scatter	29

3.1.3 Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration	31
3.1.4 Fluo-3 Fluoreszenz	33
3.1.5 Calciumentzug	33
3.1.6 Hämolyse.....	35
3.1.7 Einfluss von SB203580 auf die Phosphatidylserinexposition	36
3.1.8 Einfluss von Nitroprussid auf die Phosphatidylserinexposition	37
3.1.9 Einfluss von Staurosporin auf die Phosphatidylserinexposition	38
3.1.10 Einfluss von ZVAD auf die Phosphatidylserinexposition	39
3.1.11 Einfluss von D4476 auf die Phosphatidylserinexposition	40
3.1.12 Ceramid Bildung	41
3.1.13 ROS Aktivität.....	42
3.1.14 Einfluss von Acetylcystein auf die Phosphatidylserinexposition.....	42
3.2 Stimulation der Eryptose durch Caspofungin	44
3.2.1 Annexin V Bindung	44
3.2.2 Forward Scatter	44
3.2.3 Fluo-3 Fluoreszenz	46
3.2.4 Calciumentzug	47
3.2.5 Hämolyse.....	48
3.2.6 Einfluss von SB203580 auf die Phosphatidylserinexposition.....	48
3.2.7 Einfluss von Staurosporin auf die Phosphatidylserinexposition	50
3.2.8 Einfluss von ZVAD auf die Phosphatidylserinexposition	51
3.2.9 Einfluss von D4476 auf die Phosphatidylserinexposition	52
3.2.10 Ceramid Bildung	53
3.2.11 ROS Aktivität.....	54
3.2.12 Einfluss von Acetylcystein auf die Phosphatidylserinexposition.....	54
4. Diskussion	56

5. Zusammenfassung	58
6. Liste der Veröffentlichungen	60
7. Literaturverzeichnis	61
8. Eigenanteilserklärung	67
9. Danksagung	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Anidulafungin (Commons Wikimedia)...	14
Abbildung 2: Chemische Struktur von Caspofungin (Commons Wikimedia)	14
Abbildung 3: Effekt von Anidulafungin auf die Phosphatidylserinexposition (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	29
Abbildung 4: Effekt von Anidulafungin auf den Forward Scatter der Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	30
Abbildung 5: Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf Annexin V Bindung, Forward Scatter und Hämolyse der Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	32
Abbildung 6: Effekt von Anidulafungin auf die zytosolische Calcium- Konzentration (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	33
Abbildung 7: Effekt des Calciumentzuges auf die durch Anidulafungin ausgelöste Phosphatidylserinexposition. (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	34
Abbildung 8: Effekt von Anidulafungin auf die Hämolyse (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	35
Abbildung 9: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit SB203580 und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	36
Abbildung 10: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Nitroprussid und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	37
Abbildung 11: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Staurosporin und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	38
Abbildung 12: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit ZVAD und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	39
Abbildung 13: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit D4476 und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	41
Abbildung 14: Einfluss von Anidulafungin auf die Ceramid Bildung in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	41
Abbildung 15: Einfluss von Anidulafungin auf die ROS Aktivität in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))	42

Abbildung 16: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Acetylcystein und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b)).....	43
Abbildung 17: Effekt von Caspofungin auf die Phosphatidylserinexposition (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	44
Abbildung 18: Effekt von Caspofungin auf den Forward Scatter der Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	45
Abbildung 19: Effekt von Caspofungin auf die zytosolische Calcium-Konzentration (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	46
Abbildung 20: Effekt des Calciumentzuges auf die durch Caspofungin ausgelöste Phosphatidylserinexposition (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	47
Abbildung 21: Effekt von Caspofungin auf die Hämolyse (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	48
Abbildung 22: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit SB203580 und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	49
Abbildung 23: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Staurosporin und Caspofungin. (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	50
Abbildung 24: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit ZVAD und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	51
Abbildung 25: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit D4476 und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	52
Abbildung 26: Einfluss von Caspofungin auf die Ceramid Bildung in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	53
Abbildung 27: Einfluss von Caspofungin auf die ROS Aktivität in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	54
Abbildung 28: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Acetylcystein und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ringerlösung.....	20
Tabelle 2: Calciumfreie Ringerlösung.....	21
Tabelle 3: Ringerlösung mit 60mM Kaliumkonzentration	21
Tabelle 4: Ringerlösung mit 120mM Kaliumkonzentration.....	22
Tabelle 5: Annexin-Waschpuffer	22

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
Bak	BCL2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	bovine serum albumin (Rinderalbumin)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caspase	cysteine-dependent aspartate-specific protease
CD47	Cluster of Differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCFDA	2',7' –dichlorofluorescein diacetate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
et al.	et alii/aliae, und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	fibroblast associated
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fluo-3/AM	Fluo-3/acetoxymethyl Fluoreszenzindikator für intrazelluläres Calcium

FSC	Forward Scatter
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GMP	Guanosinmonophosphat
GPDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G Proteine
IgM	Immunglobulin M Proteine
K	Kaliumatom
K ⁺	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	nikotinamide adenine dinucleotide phosphate
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Austauschpumpe
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p	engl. für Wahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandin E2

pH	pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SGK1	serum and glucocorticoid-regulated kinase 1
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SSC	side-scatter
tBID	truncated Bid
TGF-alpha	Transforming growth factor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UDP-Glucose	Uridindiphosphat-Glucose
z. B.	zum Beispiel
zVAD	Pancaspase Inhibitor
zVAD-FMK	N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone

1. Einleitung

1.1 Erythrozyten

1.1.1 Aufbau und Funktion

Erythrozyten besitzen weder einen Zellkern noch Mitochondrien. Sie haben eine bikonkave Form und können sich verformen, während sie in der Mikrozirkulation die Kapillaren passieren. Ihr Durchmesser beträgt 7,5-8,7µm und sie sind 1,7-2,2µm dick (Diez-Silva et al., 2010). Durch ihre Form haben sie ein optimales Oberflächen- zu Volumenverhältnis, können optimal die Kapillaren passieren, aber auch mehr Sauerstoff aufnehmen und Kohlenstoffdioxid abgeben (Svetina, 2012).

Die Plasmamembran der Erythrozyten besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht. An der Zusammensetzung beteiligt sind Kohlenhydrate (8%), Proteine (52%) und Lipide (40%) (Jones et al., 2014). Während die äußere Schicht aus cholinhaltigen Phospholipiden besteht (Sphingomyelin, Phosphatidylcholin), besteht die innere Schicht aus cholinfreien Phospholipiden (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin). An der Außenseite befindet sich die Glykokalix (Püschel et al., 2011).

Die Glykokalix setzt sich aus Kohlenhydraten zusammen und ist an Lipide oder Proteine der Erythrozytenmembran gebunden. Durch die Glykolipide der Glykokalix wird die Blutgruppenzugehörigkeit definiert (Yazdanbakhsh et al., 2000, Frame et al., 2007).

In die Plasmamembran der Erythrozyten eingelagerte Membranproteine sind mit dem darunterliegenden Spektrin Netzwerk verknüpft. Zwei wichtige Membranproteine sind das Glykophorin, über das übrigens der Malariaerreger Plasmodium falciparum in die Zelle eintreten kann, und das Bande-3-Protein. Glykophorin ist über Aktin und Bande-4.1-Protein mit dem Spektrin Netzwerk verknüpft, Bande-3-Protein über Ankyrin. Das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin hat verschiedene Aufgaben. Zum einen dient es zum Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidtransport zum anderen zur Pufferung des Blutes (Heinrich et al., 2014).

Das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin besteht aus vier Globinketten, wobei jede ein Häm-Molekül besitzt. Das Häm ist eine Komplexverbindung aus

einem Porphyrinmolekül und einem Eisen-Ion. Es existieren verschiedene Hämoglobintypen. Das adulte Hämoglobin besteht zu 98% aus zwei alpha und zwei beta Ketten (HbA₁) und zu 2% aus zwei alpha und zwei delta Ketten (HbA₂). Das fetale Hämoglobin besteht hingegen aus zwei alpha und zwei gamma Ketten (Marengo-Rowe, 2006, Schmidt et al., 2010).

Frauen haben etwa 4,5, Männer etwa 5 Millionen Erythrozyten pro μl Blut. Beim Erwachsenen erfolgt die Bildung der Erythrozyten im Knochenmark der zentralen Knochen (Loken et al., 1987), während in der Ontogenese drei Phasen der Erythropoese unterschieden werden können: Die embryonale Phase mit der Blutbildung im Dottersack, die hepato lienale Phase mit der Blutbildung in Leber und Milz (Dzierzak and Philipsen, 2013, Sharkis, 1984) und letztlich die medulläre Phase. Die Bildung der Erythrozyten erfolgt Erythropoietin abhängig ausgehend von einer Stammzelle über verschiedene Vorstufen bis hin zu den Retikulozyten, die ihren Zellkern bereits verloren haben und sich dann zu reifen Erythrozyten entwickeln (Dzierzak and Philipsen, 2013).

Die Erythrozyten gewinnen ihre Energie in Form von ATP über die anaerobe Glykolyse. Sie benötigen diese Energie hauptsächlich für den Betrieb der Na⁺/K⁺-ATPase. In Erythrozyten existiert ein Nebenweg in der Glykolyse über die Bildung von 2,3-Bisphosphoglycerat. Durch die Umgehung der 3-Phosphoglycerat-Kinase wird in einem Durchgang der Glykolyse zwar ein Mol ATP weniger generiert, dafür besitzt der Erythrozyt mit dem 2,3-Bisphosphoglycerat allerdings die Möglichkeit, die Sauerstoffaffinität des Hämoglobin zu reduzieren. Dadurch kann in Geweben mit Sauerstoffmangel überhaupt erst die Freisetzung von Sauerstoff gewährleistet werden, da reines Hämoglobin eine hohe Sauerstoffaffinität besitzt. Über den Pentosephosphatweg kann in den Erythrozyten NADPH/H⁺ generiert werden, das für die Reduktion des Glutathiondisulfids zu Glutathion benötigt wird. Das Glutathion, das im Zytosol unter ATP-Verbrauch hergestellt wird, fungiert als Antioxidans und schützt den Erythrozyten vor Sauerstoffradikalen und Wasserstoffperoxid. Weitere zellschützende Enzyme sind die Katalase und die Superoxid-Dismutase. Erythrozyten erreichen eine Lebensdauer von ca. 120 Tagen und werden im retikuloendothelialen System aus dem Blutkreislauf entfernt (Horn, 2012).

Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobin kann durch drei Faktoren beeinflusst werden: Durch den pH-Wert (Bohr-Effekt) (Jensen, 2004), den CO₂-Partialdruck und 2,3-Bisphosphoglycerat. Kohlenstoffdioxid wird im Blut zu 5% gebunden an Hämoglobin transportiert. Zum größten Teil wird es allerdings in Form von Bikarbonat transportiert. Dieses entsteht in Erythrozyten aus Kohlenstoffdioxid und Wasser. Diese Reaktion wird durch das Enzym Carboanhydrase katalysiert. Hämoglobin besteht aus vier Proteinketten. Jede Proteinkette besitzt eine Hämgruppe, welche ein Porphyrinringsystem darstellt, in deren Mitte ein zweiwertiges Eisenatom gebunden ist. Jedes Eisenatom kann ein Sauerstoffmolekül binden (Rassow et al., 2012).

Wichtig für die Erythrozyten ist auch der sogenannte Salvage-Pathway, in dem aus Adenosin, Inosin, Adenin und Hypoxanthin ATP neu hergestellt wird, um einem ATP-Mangel vorzubeugen, da Erythrozyten kein ATP selbst herstellen können (Püschel et al., 2011).

1.1.2 Morphologisch veränderte Erythrozyten

Man kann folgende morphologische Varianten der Erythrozyten unterscheiden:

- Akanthozyten: Ausläufer auf der Oberfläche
- Anisozytose: unterschiedlich große Erythrozyten
- Echinozyten: kugelförmige Form mit spitzen Ausläufern
- Schistozyten: auch Fragmentozyten genannt, Erythrozyten erscheinen fragmentiert, haben eine dreieckförmige oder abgewinkelte Form, Vorkommen z.B. bei Herzklappen oder mikroangiopathischer hämolytischer Anämie
- Sichelzellen: sichelförmige Erythrozyten, Vorkommen bei der Sichelzellanämie
- Sphärozyten: Kugelform
- Targetzellen: Hämoglobin im Zentrum und Randbereich der Erythrozyten mit einem hellen Saum dazwischen, Vorkommen z.B. bei Thalassämie (Ford, 2013).

1.1.3 Erkrankungen der Erythrozyten

- Die Anämie ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Hämoglobinkonzentration, der Erythrozytenzahl oder des Hämatokrits. Man unterscheidet zwischen mikrozytärer hypochromer, normozytärer normochromer und makrozytärer hyperchromer Anämie. Bei der mikrozytären hypochromen Anämie handelt es sich meistens um eine Eisenmangelanämie oder um eine Thalassämie. Der Eisenmangel ist der häufigste Grund für eine Anämie. Die Ursache liegt meistens in einem Eisenverlust. Der normozytären normochromen Anämie liegt meistens eine Blutungsanämie oder hämolytische Anämie zugrunde, aber auch renale Ursachen oder Störungen im Knochenmark können ursächlich sein. Bei der makrozytären hyperchromen Anämie liegt meist ein Vitamin B12- oder Folsäuremangel vor (Herold, 2016).
- Die Kugelzellanämie ist eine Form der hämolytischen Anämie. Hier liegt am häufigsten ein Defekt im Ankyrin vor, der zu einer erhöhten Permeabilität der Erythrozytenmembran führt. Daraus resultiert eine Kugelform der Erythrozyten (Herold, 2016).
- Eine Veränderung im Hämoglobin führt zur Bildung von HbS. Daraus resultiert die Sichelzellanämie, eine autosomal rezessive Erkrankung, die bei Sauerstoffmangel zu einer Sichelzellform der Erythrozyten führt. Heterozygote Träger sind vor den schweren Malariaverlaufsformen geschützt (Herold, 2016).
- Bei der Thalassämie kommt es genetisch bedingt zu einer verminderten Bildung bestimmter Hämoglobinketten, was zu einem veränderten Hämoglobin führt. Auch die Thalassämie schützt vor einer Infektion mit Malaria (Herold, 2016).
- Malaria ist eine Infektionskrankheit, die mit Fieber einhergeht. Die Parasiten, von denen sie ausgelöst wird, werden Plasmodien genannt und werden durch den Stich der Anopheles Mücke übertragen. Während in der Anopheles Mücke die geschlechtliche Vermehrung der Parasiten stattfindet, vermehren sie sich im Menschen ungeschlechtlich. Man unterscheidet die exoerythrozytäre Phase, in der die Vermehrung in den

Leberzellen stattfindet und die erythrozytäre Phase, bei der die aus den Leberzellen freigesetzten Merozoiten letztlich in die Erythrozyten eindringen. Leitsymptom der Erkrankung ist das Fieber. Bei Zerstörung der Erythrozyten kommt es zu einer Anämie. Begleitet werden kann das Krankheitsbild bei der Malaria tropica von einer Beteiligung der Organe wie Gehirn, Niere, Herz und Lunge (Herold, 2016, Arastéh et al., 2012).

1.2 Die Apoptose

Die Apoptose ist ein Synonym für den programmierten Zelltod. Dabei werden nicht mehr benötigte oder geschädigte Zellen durch den Ablauf einer typischen Signalkaskade entfernt. Dies kann zum einen der Anpassung an neue Umweltbedingungen dienen als auch zum Schutz von benachbartem Gewebe, da bei der Apoptose keine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird.

Viele Stimuli können die Apoptose einleiten, wie z.B. Krankheiten und Medikamente. Die Apoptose ereignet sich aber auch physiologisch, z.B. bei der Embryogenese oder ständig im Laufe des Lebens, um die Zellzahl in bestimmten Geweben konstant zu halten. Die Apoptose ist durch verschiedene morphologische Korrelate gekennzeichnet. In der frühen Phase der Apoptose, kommt es zur Zellschrumpfung und Karyopyknose (Schrumpfung des Zellkerns und Verdichtung des Chromatins), gefolgt von Bläschenbildung an der Membran, Karyorrhesis und Ausbildung sogenannter Apoptosekörper, membranumhüllte Zellfragmente, die von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden können. Ferner muss neben der Apoptose auch die Nekrose erwähnt werden, bei der durch Schädigung der Zellen diese absterben und zerfallen. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zu Zellschwellung und Zerfall der Zellorganellen. Durch den Verlust der Membranintegrität wird der Inhalt der Zelle in die Umgebung freigesetzt, was zu einer Entzündungsreaktion führt (Elmore, 2007).

Man kann die Apoptose in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg einteilen:

Beim extrinsischen Weg werden durch Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren (TNFR-1, FAS, TRAIL-Rezeptoren) die Procaspasen 8 und 10 aktiviert (Ichim and Tait, 2016).

Die Caspasen 8 und 10 aktivieren dann die Caspasen 3, 6 und 7, welche die Apoptose einleiten und auch Effektorcaspasen genannt werden (Rassow et al., 2012).

Beim intrinsischen Weg kommt es nach der Aktivierung von Bax und Bad, deren proapoptotische Wirkung die antiapoptotische Wirkung des bcl-2 nun übersteigt, durch Zellstressoren zur Freisetzung von Cytochrom c und SMAC aus den Mitochondrien ins Zytosol. Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) und aktiviert dieses in Anwesenheit von dATP oder ATP. Sieben dieser Apaf-1/cytochrom c Komplexe lagern sich zusammen und bilden das Apoptosom. Das Apoptosom bindet Procaspase 9, aktiviert diese und die Caspase 9 aktiviert daraufhin Caspase 3, 6 und 7. SMAC hingegen blockiert XIAP, welches wiederum die Caspasen 3, 7 und 9 blockiert. Zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg gibt es über BID und tBID eine Verbindung. Die über den Todesrezeptor aktivierte Caspase 8 spaltet Bid zu tBid, welches über Bax und Bak zum intrinsischen Weg führt (Ichim and Tait, 2016, Kim et al., 2005).

Ferner kann Bad durch die Proteinkinase B phosphoryliert und inaktiviert werden, während sowohl Proteinkinase B als auch SGK1 Caspase 9 hemmen (Silbernagl and Lang, 2013).

1.3 Morphologische Kennzeichen der Apoptose

Folgende Merkmale sind kennzeichnend für eine apoptotische Zelle:

Während die Zellmembran und Zellorganellen weiterhin erhalten bleiben und die Zelle schrumpft, kommt es zu einer Kondensation von Zellkern und Zytoplasma. Die DNS wird durch Endonukleasen abgebaut. Schließlich entstehen sogenannte apoptotische Körperchen. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt das Nachbargewebe unbeschädigt (Fahlke, 2008).

1.4 Abgrenzung zur Nekrose

Die Nekrose ist eine weitere Möglichkeit des Zelluntergangs. Sie ist im Gegensatz zur Apoptose gekennzeichnet durch eine Zellschwellung. Die Zellorganellen werden im Gegensatz zur Apoptose beschädigt und die Membranintegrität bleibt im Gegensatz zur Apoptose nicht erhalten. Das Nachbargewebe wird geschädigt (Fahlke, 2008).

1.5 Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose ist für eine normale Funktion des menschlichen Körpers unerlässlich:

Sie ist während der Embryogenese wichtig für die Organentwicklung. Außerdem kann die Konstanz von Zellzahl und Zellgröße im Gewebe gewährleistet werden. Potenziell maligne Zellen können durch die Einleitung der Apoptose beseitigt werden. Darüber hinaus hat die Apoptose eine wichtige Bedeutung in der Funktion des Immunsystems, denn durch sie werden nicht benötigte oder möglicherweise schädliche Zellen aussortiert. Auch für die Entwicklung des zentralen Nervensystems ist die Apoptose unerlässlich und sorgt für die lebenslange Anpassungsfähigkeit des Gehirns an äußere Faktoren (Fahlke, 2008).

1.6 Die Eryptose

1.6.1 Definition und Abgrenzung zur Apoptose

Die Eryptose beschreibt den suizidalen Zelltod der Erythrozyten, dessen Ablauf man von der Apoptose anderer kernhaltiger Zellen unterscheiden muss, da Erythrozyten keine Zellorganellen wie einen Zellkern oder Mitochondrien mehr besitzen. Da aber der mitochondriale Signalweg der Apoptose in Erythrozyten nicht möglich ist, müssen andere Signalwege den Zelltod herbeiführen.

Die Eryptose führt zu einer Beseitigung der Erythrozyten, bevor sie hämolytisch werden.

Im Gegensatz dazu gibt es den Begriff der Erythrozyten-Seneszenz. Der Alterungsprozess der Erythrozyten unterliegt einigen strukturellen Veränderungen:

- Es kommt zur Bindung von IgG-Autoantikörpern, wodurch die alten Erythrozyten durch Makrophagen erkannt und abgebaut werden können (Bosman et al., 2005).
- Es kommt zur Externalisation von Phosphatidylserin, was als Phagozytosesignal fungiert (Daugas et al., 2001).
- Das Oberflächenprotein CD47 wirkt der Funktion des Phosphatidylserins entgegen, indem es die Phagozytose durch Makrophagen inhibiert (Burger et al., 2012).

Ein weiterer Begriff ist die Neozytolyse. Hierbei spielt Erythropoietin eine Rolle. Endothelzellen reagieren auf eine sinkende Konzentration dieses Hormons mit der Sekretion von Zytokinen (dazu gehört auch TGF- α). Diese Zytokine signalisieren den retikuloendothelialen Zellen, junge Erythrozyten (Neozyten) zu vernichten (Alfrey and Fishbane, 2007).

1.6.2 Begünstigende Faktoren und morphologische Merkmale

Es existieren verschiedene Auslöser der Eryptose wie z.B. osmotischer Stress (Lang et al., 2003a), oxidativer Stress (Duranton et al., 2002), Ceramid, Prostaglandin E₂ (Lang et al., 2005a), Plättchenaktivierender Faktor (Föller et al., 2008), extrazelluläres Chlorid (Huber et al., 2001), Glucoseentzug (Klarl et al., 2006) und verschiedene am Menschen angewendete Medikamente wie Paclitaxel, Chlorpromazin, Cyclosporin, Valinomycin (Föller et al., 2008).

Die Eryptose begünstigende Krankheiten sind Sepsis (Föller et al., 2008), Malaria (Föller et al., 2008), Sichelzellanämie (Lang et al., 2002), beta-Thalassämie (Lang et al., 2002), Eisenmangel (Kempe et al., 2006), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Lang et al., 2002), hämolytisch urämisches Syndrom (Föller et al., 2008), Niereninsuffizienz, Malaria (Föller et al., 2008) und die Wilson Krankheit (Föller et al., 2008) und Phosphatmangel (Birka et al., 2004).

Über eine Hemmung der Calcium permeablen Kationenkanäle sind Erythropoietin (Wieder et al., 2006), aber auch, wie Föller et al. berichten, die Katecholamine Dopamin, Isoproterenol und Epinephrin in der Lage, die Eryptose zu hemmen (Föller et al., 2008). Weitere Substanzen, die die Eryptose inhibieren, sind Amilorid, Adenosin und Nitroxid (Föller et al., 2008). Nitroxid vermittelt seine

Wirkung zum Teil über die Aktivierung von cGMP abhängigen Proteinkinasen (Nicolay et al., 2008a).

Nach Lang et al. wird die Eryptose durch die AMP-aktivierte Kinase, durch die cGMP-abhängige Proteinkinase, die Janus-aktivierte Kinase 3, durch die casein Kinase 1alpha, durch die p38 Kinase und die p21-aktivierte Kinase 2 reguliert. Die Eryptose wird durch Erythropoietin, Antioxidantien und weitere Substanzen inhibiert (Lang et al., 2014).

Zudem regulieren die Erythrozyten die Nitroxidbildung über die Oxygenierung und Desoxygenierung von Hämoglobin. Oxygeniertes Hämoglobin bindet und desoxygeniertes Hämoglobin setzt NO frei, welches zu einer Vasodilatation beiträgt und die Eryptose inhibiert (Föller et al., 2008).

Die Eryptose ist gekennzeichnet durch eine Zellschrumpfung, Bildung von Membranbläschen und die Exposition von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche (Föller et al., 2008).

Wie Lang et al. bereits 2003 berichteten, können verschiedene äußere Stimuli zu Eryptose führen, wie z.B. osmotischer Schock oder oxidativer Stress. Dieser Effekt sei zumindest teilweise auf eine Aktivierung Calcium permeabler Kationenkanäle zurückzuführen (Lang et al., 2003a)

Im Anschluss soll nun eingehender auf Signalwege der Eryptose eingegangen werden.

1.6.3 Signalwege

Wie Lang et al. und Föller et al. berichten, existieren verschiedene Signalwege, die zur Eryptose führen:

- Caspase Aktivierung nach oxidativem Stress (Lang et al., 2006a)
- Bildung von Prostaglandin E₂, welches Ca²⁺ permeable Kationenkanäle aktiviert (Lang et al., 2006a, Föller et al., 2008)
- Durch Phospholipase A₂ ausgelöste Freisetzung von PAF (Plättchenaktivierender Faktor), welcher eine Sphingomyelinase aktiviert, die zur Bildung von Ceramid führt (Lang et al., 2006a, Föller et al., 2008).

Diese Signalwege führen zum einen über den Anstieg des intrazellulären Calciums und zum anderen über die Ceramid Bildung zur Exposition von

Phosphatidylserin an die Zelloberfläche. Makrophagen bauen die so markierten Erythrozyten in der Folge ab (Lang et al., 2006a).

Das Calcium tritt durch nichtselektive Kationenkanäle in die Zelle ein. Diese Kanäle werden durch hyperosmotischen Schock, oxidativen Stress und Chloridmangel stimuliert. Aktiviert werden sie durch PGE₂. Bei osmotischem Schock kommt es zur Aktivierung der Phospholipase A₂, die wiederum PAF aktiviert. PAF aktiviert eine Sphingomyelinase, die Ceramid produziert (Lang et al., 2006a, Lang et al., 2005b).

Ceramid erhöht das Ansprechen der Erythrozyten auf erhöhte Calciumspiegel und verstärkt so die Eryptose (Lang et al., 2012a, Lang et al., 2006a, Lang et al., 2010).

Die erhöhte Calcium Konzentration führt wiederum zu einer Aktivierung Calciumempfindlicher Kationenkanäle, durch die die Erythrozyten Kalium verlieren. Diese Kanäle werden auch als Gardos Kanäle bezeichnet. Sie werden durch Calcium aktiviert und sind für den Ausstrom von Kalium aus der Zelle verantwortlich. Dieser Kaliumverlust hyperpolarisiert die Zellmembran, was zu einem Austritt von Chlorid aus der Zelle führt. Dieser Verlust an KCl mit osmotisch bedingtem Verlust an Wasser führt konsekutiv zu einer Zellschrumpfung (Föller et al., 2008, Lang et al., 2008, Lang et al., 2003c)

Es konnte von Myssina et al. gezeigt werden, dass durch die Blockade von Chlorid Kanälen mit NPPB und Nifluminsäure der Effekt einer erhöhten zytosolischen Calcium Konzentration und von oxidativem Stress auf die Eryptose aufgehoben werden kann (Myssina et al., 2004).

Zudem stimuliert Calcium die Protease Calpain, eine Cystein Endopeptidase. Dies führt zum Abbau des Zytoskeletts (Pompeo et al., 2010, Lang et al., 2008, Lang et al., 2015).

Wie Lang et al. berichten, können die Phosphatidylserinexposition und die Zellschrumpfung durch Entzug von extrazellulärem Calcium, durch Zugabe von Kaliumkanalinhibitoren wie Amilorid und Ethylisopropylamilorid, durch erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration oder durch Anwesenheit des Gardoskanal Inhibitors Clotrimazol aufgehoben werden (Lang et al., 2004a, Lang et al., 2003b).

In die durch Energiemangel ausgelöste Eryptose ist die Aktivierung der Proteinkinase C involviert und eine PKC abhängige Phosphorylierung von Zellmembranproteinen, was den Calciumeintritt erlaubt und zur Phosphatidylserinexposition führt. Stressoren wie z.B. Glucoseentzug führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, welche dann durch Phosphorylierung Kationenkanäle aktiviert. Der darauffolgende Eintritt von Calcium aktiviert die Calcium sensitive Scramblase, die zu einer Aufhebung der Zellmembranasymmetrie führt und damit zur Eryptose (Repsold and Joubert, 2018, Klarl et al., 2006).

1.6.4 Bedeutung der Eryptose

Die Eryptose ist für eine Vielzahl an Funktionen im menschlichen Körper unerlässlich:

- Verhinderung der Hämolyse: Dadurch, dass die Eryptose vor der Hämolyse eintritt, werden schädliche Wirkungen durch die Hämolyse auf den Körper verhindert (Lang et al., 2012b, Lang et al., 2006b, Lang et al., 2012a). Durch den Eintritt der Hämolyse kann das frei gewordene Hämoglobin durch die renalen Glomeruli gefiltert werden und in den renalen Tubuli präzipitieren (Lang et al., 2015).

Wie Lang et al. berichten, kann durch das Enzym Hämolysin von *Vibrio parahämolyticus* die Eryptose ausgelöst werden. Aufgehoben werden kann dieser Effekt durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration und durch den Kaliumkanalblocker Clotrimazol. Es lässt sich schlussfolgern, dass die durch dieses Hämolysin ausgelöste Eryptose zumindest teilweise abhängig ist von einem zellulären Kaliumverlust (Lang et al., 2004d).

- Umstellung von fetalem auf adultes Hämoglobin: Fetale Erythrozyten haben eine deutlich kürzere Überlebenszeit als adulte Erythrozyten. (Pearson, 1967) Nach Beginn der Atmung über die Lunge werden die fetalen Erythrozyten hohem oxidativen Stress ausgesetzt, was zur Eryptose führt (Hermle et al., 2006, Bracci et al., 2002).

- Pathophysiologie: Erythrozyten, die Phosphatidylserin an der Oberfläche exprimieren, können an der Gefäßwand oder an Thrombozyten hängen bleiben und so einen negativen Einfluss auf die Mikrozirkulation haben (Lang et al., 2015).
- Lang et al. berichten von einer Studie über den Einfluss von NaCl und Urea auf die erythrozytäre Phosphatidylserinexposition. Sie kommen zu dem Schluss, dass Chlorid seinen Effekt über die Membranleitfähigkeit für Kationen ausübt, während Urea über eine Inhibition der Sphingomyelinase wirkt und damit die Bildung von Ceramid verhindert. Aus dieser Erkenntnis lassen sich Schlussfolgerungen über die Wirkung der Umgebungsbedingungen bei Passage der Erythrozyten durch die Niere ziehen. Denn auch hier sind die Erythrozyten einer erhöhten Menge an Harnstoff und osmotischem Stress ausgesetzt (Lang et al., 2004c).
- Eryptose bei Malaria: Wie Lang et al. berichten, führt eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* zu einer Aktivierung verschiedener Anionen Kanäle und Calcium permeabler Kationenkanäle. Dies sei eine Folge des durch den Erreger ausgelösten oxidativen Stresses. Das eintretende Calcium aktiviert eine in den Erythrozyten gelegene Scramblase, welche zu einem Zusammenbruch der Zellmembranasymmetrie führt. Es kommt zu einer Externalisation von Phosphatidylserin und zu einer Erkennung und Phagozytose durch Makrophagen (Lang et al., 2004b).

1.7 Anidulafungin und Caspofungin

1.7.1 Allgemeines

Anidulafungin und Caspofungin gehören wie Micafungin zu den Echinocandinen, die bei Pilzinfektionen zur Anwendung kommen.

Die Hauptstütze in der Behandlung von Pilzinfektionen sind Amphotericin B und die Azolderivate Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol. Allerdings sind sie mit schwerwiegenden Nebenwirkungen und Limitierungen bei der Behandlung assoziiert wie z.B. Nephrotoxizität, Toxizität gegenüber Erythrozyten und Arrhythmien bei Amphotericin B. Hepatotoxizität ist vor allem mit Fluconazol assoziiert, Kardiotoxizität und gastrointestinale Nebenwirkungen mit

Itraconazol. Voriconazol besitzt eine neurologische und hepatische Toxizität, Posaconazol ebenfalls eine hepatische Toxizität (Patil and Majumdar, 2017).

Durch den Beginn des klinischen Einsatzes von Echinocandinen wurden einige Herausforderungen des Einsatzes der oben genannten Medikamente umgangen: Die Echinocandine haben eine hohe Wirksamkeit gegen Pilze, weniger Interaktionen mit anderen Medikamenten und eine geringere Rate an Resistenzentwicklungen (Patil and Majumdar, 2017).

1.7.2 Wirkungsmechanismus

Die β -(1,3)-d-glucan Synthase ist ein heteromerer Glycosyltransferase Enzymkomplex in der Zellmembran von Pilzzellen. Dieser Komplex polymerisiert UDP-Glucose zu β -(1,3)-d-glucan, welches nach extrazellulär freigesetzt und in die Zellwand eingebaut wird. Die Zellwand besteht zu ca. 30-60% aus β -(1,3)-d-glucan. Dies ist für die strukturelle Integrität und Stärke der Zellwand wichtig (Patil and Majumdar, 2017).

Echinocandine entfalten ihre Wirksamkeit gegen Pilze durch eine nicht kompetitive Bindung an eine Untereinheit dieses Enzymkomplexes und Blockierung der β -(1,3)-d-glucan Synthase. Dies führt dazu, dass die Zellwand permeabel wird und konsekutiv zu einer Zellzerstörung (Patil and Majumdar, 2017).

Die Echinocandine haben einen fungiziden Effekt auf *Candida* und *Saccharomyces species* und einen fungistatischen Effekt auf *Aspergillus species* (Patil and Majumdar, 2017).

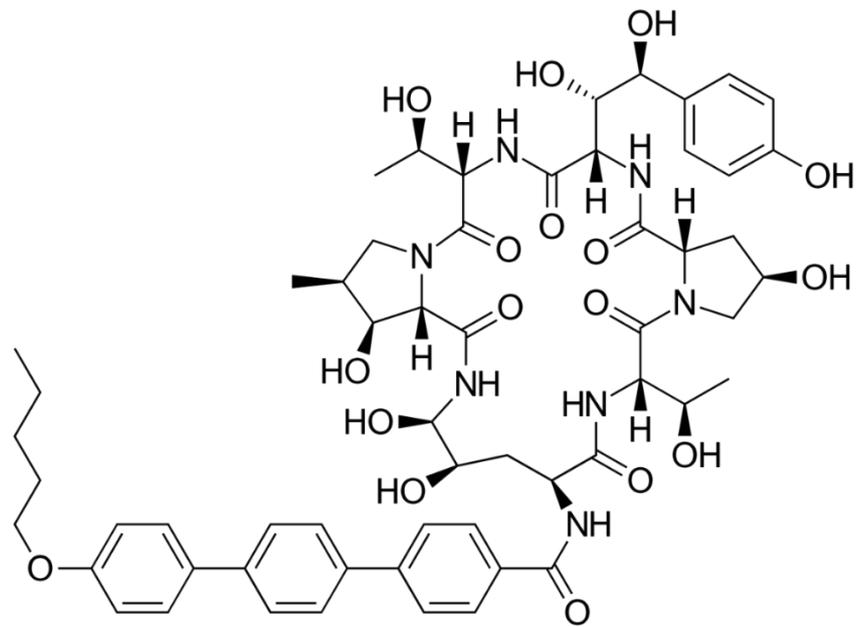


Abbildung 1: Chemische Struktur von Anidulafungin (Commons Wikimedia)

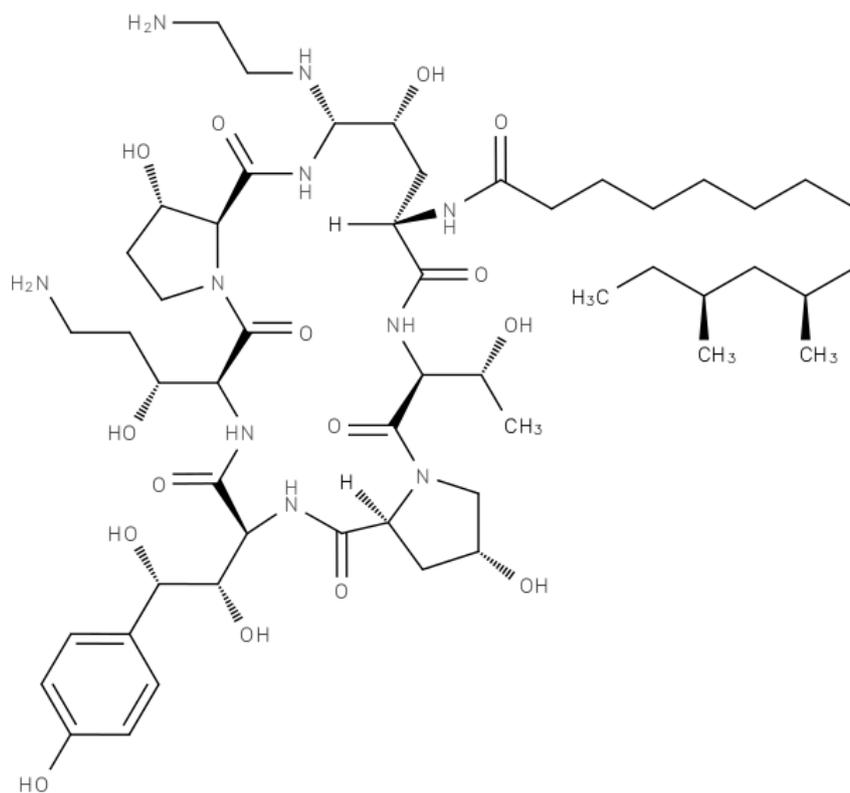


Abbildung 2: Chemische Struktur von Caspofungin (Commons Wikimedia)

1.7.3 Indikationen

1.7.3.1 Anidulafungin

Laut Fachinfo ist Anidulafungin „zur Behandlung von invasiver Candidiasis bei erwachsenen Patienten“ indiziert (Fachinfo).

1.7.3.2 Caspofungin

Folgende Indikationen gelten laut Fachinfo für Caspofungin:

- „Behandlung von invasiver Candidiasis bei erwachsenen oder pädiatrischen Patienten“ (Fachinfo)
- „Behandlung von invasiver Aspergillose bei erwachsenen oder pädiatrischen Patienten, die auf Therapien mit Amphotericin B, Lipidformulierungen von Amphotericin B und/oder Itraconazol nicht ansprechen oder diese nicht vertragen“ (Fachinfo)
- „Empirische Therapie bei Verdacht auf Infektionen durch Pilze (wie Candida oder Aspergillus) bei erwachsenen oder pädiatrischen Patienten mit Fieber und Neutropenie“ (Fachinfo).

1.8 Wichtige verwendete Substanzen

1.8.1 Acetylcystein

Bei Acetylcystein handelt es sich um ein Antioxidans, das eventuellen oxidativen Stress zu antagonisieren vermag (Al Mamun Bhuyan et al., 2017a, Lang and Lang, 2015b).

1.8.2 D4476

D4476 ist ein Inhibitor der Casein Kinase 1, die eine Rolle bei der Eryptose spielt (Al Mamun Bhuyan et al., 2016, Lang and Lang, 2015a).

1.8.3 Nitroprussid-Natrium

Nitroprussid-Natrium ist ein NO Donor. Wie Lang et al. zeigen konnten, wird durch die Zugabe von Nitroprussid-Natrium die Externalisation von Phosphatidylserin vermindert oder sogar fast aufgehoben. Dies ist nachweisbar im Bereich von Konzentrationen, die bei kernhaltigen Zellen effektiv sind.

Exzessive Konzentrationen stimulieren hingegen die Eryptose (Nicolay et al., 2008b).

1.8.4 SB203580

SB203580 ist ein p38 Kinase Inhibitor. (Al Mamun Bhuyan et al., 2017b) Diese Kinase ist ebenfalls an der Eryptose beteiligt (Al Mamun Bhuyan et al., 2016).

1.8.5 Staurosporin

Bei Staurosporin handelt es sich um einen Proteinkinase C Inhibitor. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Eryptose zu einem Anstieg der Proteinkinase C kommt (Al Mamun Bhuyan et al., 2016).

1.8.6 z-VAD

Bei zVAD handelt es sich um einen zellpermeablen Pancaspaseinhibitor, der eingesetzt werden kann, um die Beteiligung von Caspasen am Zelltod zu untersuchen (Sakurada et al., 2002).

1.9 Fragestellung

Durch bestimmte Medikamente ausgelöste Anämien sind in der Medizin häufig ein therapielimitierendes Problem. Da bekannt ist, dass Anidulafungin und Caspofungin Anämie auslösen können (Aguilar-Zapata et al., 2015), sollte in dieser Studie überprüft werden, ob diese Anämie durch Eryptose bedingt ist und welche Signalwege dabei eventuell eine Rolle spielen könnten. In der Folge könnten Medikamente entwickelt werden, die diese Anämie abschwächen oder verhindern.

Darüber hinaus könnte eine Eryptose auslösende Substanz auch als Therapiemöglichkeit bei Malaria dienen, da z.B. die Sichelzellanämie ein protektiver Faktor bei Malaria ist und bei dieser Erkrankung ebenfalls eine erhöhte Umsatzrate an Erythrozyten beobachtet wird (Föller et al., 2008).

Um Eryptose nachzuweisen, sollten durchflusszytometrisch einige Eryptose typischen Werte bestimmt werden: Zum einen sollte die Bindung von Annexin V an das externalisierte Phosphatidylserin nachgewiesen werden, zum anderen

wurde die Zellgröße der unbehandelten Erythrozyten im Vergleich zu den behandelten Erythrozyten durch Messung des Forward Scatter bestimmt. Ferner wurde die Menge an intrazellulärem Calcium mithilfe von Fluo-3 bestimmt. Um zu bestätigen, dass die durch Anidulafungin und Caspofungin ausgelöste Eryptose Calcium abhängig abläuft, wurden auch Versuche in Calcium haltiger versus Calcium freier Ansätze durchgeführt. Um die Beteiligung möglicher intrazellulärer Signalwege aufzuzeigen, wurden einige bekannte Inhibitoren der Eryptose getestet, die im vorhergehenden Kapitel eingeführt wurden wie z.B. Acetylcystein, D4476, Nitroprussid-Natrium, SB203580, Staurosporin und z-VAD. Auch die Bildung von Ceramid und reaktiver Sauerstoffspezies sollte durchflusszytometrisch unter Zuhilfenahme fluoreszierender Antikörper nachgewiesen werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Verwendete Geräte

- FACS Calibur (BD, Heidelberg, Deutschland)
- Zwei Zentrifugen
- Photometer

2.1.2 Zellen

Als Untersuchungsmaterial wurden Erythrozyten von gesunden Probanden benutzt. Das Lithium-Heparin-Blut stammte von der Blutbank der Universität Tübingen. Eine Genehmigung der Ethikkommission lag vor (Genehmigungsnummer 184/2003V).

2.1.3 Chemikalien

- Acetylcystein (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
Lagerung bei 8°C
- Anidulafungin (Selleckchem, München, Deutschland)
Lagerung bei -20°C
- Annexin V-FITC (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland)
Lagerung bei 8°C
- BSA
Lagerung bei 4°C
- Calciumchlorid (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
wurde bei Raumtemperatur gelagert
- Caspofungin (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
Lagerung bei -20°C
- Ceramid-Antikörper
 - o Antikörper 1: clone MID 15B4; Alexis, Grünberg, Deutschland
Lagerung bei 8°C
 - o Antikörper 2: polyklonale Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-
konjugierte Ziegen anti-Maus IgG und IgM spezifische
Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland)

Lagerung bei 8°C

- D-(+)-Glucose (Sigma Life Science)
Lagerung bei Raumtemperatur
- D4476 (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
Lagerung bei 8°C
- DMSO (Roth)
Lagerung unter Lichtschutz bei Raumtemperatur
- EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
(Sigma Life Science)
Lagerung bei Raumtemperatur
- Fluo-3/AM (Biotium, Hayward, CA, USA)
Lagerung bei -20°C
- HEPES (Roth)
Lagerung bei Raumtemperatur
- Kaliumchlorid (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
Lagerung bei Raumtemperatur
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Roth)
Lagerung bei Raumtemperatur
- Natriumchlorid (Sigma-Aldrich)
wurde bei Raumtemperatur gelagert
- Natriumhydroxid (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
Lagerung bei Raumtemperatur
- Natrium-Nitroprussid (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
Lagerung bei Raumtemperatur
- PBS
Lagerung bei Raumtemperatur
- ROS Antikörper DCFDA (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany)
Lagerung bei -20°C
- SB203580 (Tocris bioscience, Bristol, UK)
Lagerung bei 4°C
- Staurosporin (Tocris bioscience, Bristol, UK)
Lagerung bei 4°C

- Steriles Wasser
Lagerung bei Raumtemperatur
- Z-VAD-FMK (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland)
Lagerung bei -20°C

2.1.4 Verwendete Lösungen

Die Ringerlösung, die calciumfreie Ringerlösung und der Annexin-Waschpuffer wurden nach dem Ansetzen steril filtriert und danach bei 4°C gelagert.

2.1.4.1 Ringerlösung

Tabelle 1: Ringerlösung

Substanz	mM	Gramm für 1 Liter
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,37275
MgSO ₄	1,2	0,295776
HEPES	32,2	7,673562
Glucose	5	0,901
CaCl ₂	1	0,11099
NaOH	Einstellung auf pH=7,4	0,541089109

2.1.4.2 Calciumfreie Ringerlösung

Tabelle 2: Calciumfreie Ringerlösung

Substanz	mM	Gramm für 500ml
NaCl	125	3,6525
KCl	5	0,186375
MgSO ₄	1,2	0,147888
HEPES	32,2	3,836791
Glucose	5	0,4505
EGTA	1	0,1901
NaOH	Einstellung auf pH=7,4	0,270544554

2.1.4.3 Ringerlösung mit 60mM Kaliumkonzentration

Tabelle 3: Ringerlösung mit 60mM Kaliumkonzentration

Substanz	mM	Gramm für 1 Liter
NaCl	70	4,0908
KCl	60	4,473
MgSO ₄	1,2	0,147888
HEPES	32,2	3,836791
Glucose	5	0,4505
EGTA	1	0,1901
NaOH	Einstellung auf pH=7,4	0,270544554

2.1.4.4 Ringerlösung mit 120mM Kaliumkonzentration

Tabelle 4: Ringerlösung mit 120mM Kaliumkonzentration

Substanz	mM	Gramm für 1 Liter
NaCl	10	0,5844
KCl	120	8,946
MgSO ₄	1,2	0,147888
HEPES	32,2	3,836791
Glucose	5	0,4505
EGTA	1	0,1901
NaOH	Einstellung auf pH=7,4	0,270544554

2.1.4.5 Annexin-Waschpuffer

Tabelle 5: Annexin-Waschpuffer

Substanz	mM	Gramm für 500ml
NaCl	125	3,6525
HEPES	10	1,19155
CaCl ₂	5	0,277475
NaOH	Einstellung auf pH=7,4	0,084

2.1.4.6 Acetylcystein

Acetylcystein (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurde vor jedem Versuch neu hergestellt, und zwar in einer Konzentration von 500mM in Wasser.

2.1.4.7 Anidulafungin

Anidulafungin (Selleckchem, München, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 25mg/ml in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.4.8 Caspofungin

Caspofungin (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.4.9 D4476

D4476 (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 10mM in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.4.10 Fluo-3

Fluo-3/AM (Biotium, Hayward, CA, USA) wurde in einer Konzentration von 1mM in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.4.11 Natrium-Nitroprussid

Natrium-Nitroprussid (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurde vor jedem Versuch neu hergestellt in einer Konzentration von 1mM in Wasser.

2.1.4.12 ROS Antikörper

Der ROS Antikörper DCFDA (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) wurde in einer Konzentration von 100mM in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

2.1.4.13 SB203580

SB203580 (Tocris bioscience, Bristol, UK) wurde in einer Konzentration von 20mM in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

2.1.4.14 Staurosporin

Staurosporin (Tocris bioscience, Bristol, UK) wurde in einer Konzentration von 10mM in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

2.1.4.15 Z-VAD-FMK

Z-VAD-FMK (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 10mM in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Die FACS-Analyse

Das FACS-Gerät, mit dem die Analysen durchgeführt wurden, besitzt einen Argon-Laser (Emission bei 488nm) und einen 525nm band pass Filter (Zhang et al., 2012). Weiterhin besitzt es eine Messkammer und verschiedene Detektoren. Das Probengemisch wird durch die Messkammer geschickt, wo der Laserstrahl auf die einzelnen Zellen trifft. Um dafür zu sorgen, dass die Erythrozyten die sogenannte Flusszelle, die Messkammer, einzeln hintereinander passieren und der Laserstrahl immer nur auf eine einzelne Zelle trifft, wird durch die Flusszelle nicht nur ein Strom aus der Probensuspension geschickt, sondern auch ein Strom aus sogenanntem sheath fluid, ein Flüssigkeitsstrom, der die Probenflüssigkeit beim Durchströmen der Flusszelle wie ein Mantel umgibt. Dies wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet (Givan, 2011).

Der Laserstrahl wird durch die passierende Zelle abgelenkt. Der Detektor für den sogenannten Forward Scatter befindet sich in Strahlungsrichtung des Lasers. Das dort registrierte Signal ist ein Maß für die Zellgröße. Der Detektor für den Side-Scatter befindet sich im 90° Winkel zu der Strahlungsrichtung des Lasers. Das dort registrierte Signal ist ein Maß für die Komplexität einer Zelle (Tzur et al., 2011).

2.2.2 Vorbereitung der Zellen

Das Lithium-Heparin-Blut wurde jeweils von jedem Probanden 1:4 mit Ringerlösung verdünnt und dann mit 120g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und auf Eppendorf Cups verteilt. Diese wurden dann für maximal zwei Tage bei 4°C gelagert.

2.2.3 Inkubation der Zellen

Die Inkubation der Erythrozyten fand in Eppendorf Cups bei 37°C für 48h in Ringerlösung statt. Dazu wurde die im vorangehenden Schritt gewonnene Erythrozytensuspension 1:500 in Ringerlösung verdünnt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Chemikalien in entsprechender Konzentration zur Behandlung

der Zellen zugegeben. Nach der Inkubationszeit konnten dann verschiedene Messungen durchgeführt werden, die im Folgenden erläutert werden.

2.2.4 Annexin und Forward Scatter Messung

Da die Externalisation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Erythrozytenmembran ein Kennzeichen der Eryptose ist (Lang et al., 2006a), wurde mithilfe von Annexin V FITC die Fluoreszenz sowohl von mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen als auch von mit aufsteigenden Konzentrationen behandelten Erythrozytensuspensionen gemessen. Annexin V weist eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin auf und ist mit dem fluoreszierenden Stoff FITC konjugiert und eignet sich daher gut. Da die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin Calcium abhängig ist (Wrobel et al., 2014), wurden vor der Messung die Erythrozyten in einem stärker Calcium-haltigen Waschpuffer suspendiert. Die Messung des Forward Scatter kann ohne Zugabe eines fluoreszierenden Stoffes erfolgen. Hierzu wurde ein Plot mit den Achsen Forward Scatter und Side Scatter erstellt und das geometrische Mittel bestimmt. Der Forward Scatter ist ein Maß für die Zellgröße und kann ebenfalls als Zeichen für Eryptose angesehen werden, da es bei der Eryptose zu einer Zellschrumpfung kommt (Lang et al., 2006a). Es folgt das Procedere für diese Art von Messung:

Von der inkubierten Erythrozytensuspension wurden jeweils 150µl auf eine 96-well Platte überführt. Diese wurde für drei Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Im Anschluss wurde der Annexin Antikörper 1:200 in Annexin Waschpuffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 100µl zu den abzentrifugierten Proben hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C unter Lichtschutz wurden die Zellen in der zugegebenen Lösung mit einer Pipette suspendiert und zur Messung in FACS Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden durchflusszytometrisch die Annexin Bindung mit einer Exzitationswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm im FL1 Kanal und der Forward Scatter bestimmt.

2.2.5 Fluo-3 Fluoreszenz

Die Zellschrumpfung der Erythrozyten ist bedingt durch einen osmotisch bedingten Wasserausstrom. Das Wasser folgt dabei dem KCl. Durch ansteigende intrazelluläre Calciumkonzentrationen kommt es zu einer Aktivierung Calcium-sensitiver Kationenkanäle, durch die die Zelle Kalium verliert. Durch die Hyperpolarisation der Zellmembran kommt es gleichzeitig zu einem Ausstrom von Chlorid (Browning et al., 2006). Die steigende intrazelluläre Calciumkonzentration kann durchflusszytometrisch mithilfe von Fluo-3 nachgewiesen werden. Es existieren drei verschiedene chemische Formen von Calcium Indikatoren: Salze, Dextran-Konjugate oder Acetoxymethyl (AM) Ester. Fluo-3 gehört zu letzteren. Es ist hydrophob und kann die Zellmembran passieren. Intrazellulär wird die AM-Gruppe durch Esterasen abgespalten und der Farbstoff so in der Zelle gefangen (Paredes et al., 2008).

Das Procedere dieser Messung ist folgendes: Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 150µl der Erythrozytensuspension auf eine 96-well Platte überführt. Diese wurde für drei Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Im Anschluss wurde der Fluo-3 Antikörper 1:200 in Annexin Waschpuffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 100µl zu den abzentrifugierten Proben hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C unter Lichtschutz wurden die Zellen in der zugegebenen Lösung mit einer Pipette suspendiert und zur Messung in FACS Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden durchflusszytometrisch die Fluo-3 Fluoreszenz mit einer Exzitationswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm im FL1 Kanal bestimmt. In der Auswertung wurde das geometrische Mittel der Fluo-3 Fluoreszenz bestimmt.

2.2.6 Ceramid abhängige Fluoreszenz

Zur Messung der Ceramid abhängigen Fluoreszenz wurde nach der Inkubationszeit von 48h von jeder Probe 100µl auf eine 96-well Platte überführt. Die Platte wurde für drei Minuten bei 1600rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der erste Antikörper (clone MID 15B4) wurde nun 1:10 in einer 1%-igen PBS-BSA Lösung verdünnt. Zu jeder Probe wurden

davon 100µl zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C unter Lichtschutz wurde die Platte für drei Minuten bei 1600rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Proben wurden im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurde der zweite Antikörper (polyklonale Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Ziegen anti-Maus IgG und IgM spezifische Antikörper) 1:50 in einer 1%-igen PBS-BSA Lösung verdünnt. Zu jeder Probe wurden davon 50µl zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde die Platte wieder für drei Minuten bei 1600rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Proben im Anschluss zweimal mit PBS-BSA gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 200µl PBS-BSA resuspendiert und in FACS Röhren überführt. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch mit einer Exzitationswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm im FL1 Kanal. In der Auswertung wurde das geometrische Mittel der Ceramid abhängigen Fluoreszenz bestimmt.

2.2.7 ROS abhängige Fluoreszenz

Um die ROS abhängige Fluoreszenz zu messen, wurde nach der Inkubationszeit von 48h von jeder Probe 150µl in eine 96-well Platte überführt. Die Platte wurde für drei Minuten bei 1600rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden im Anschluss in Ringerlösung mit DCFDA für 30 Minuten unter Lichtschutz bei 37°C gefärbt. Die Ringerlösung enthielt DCFDA in einer Konzentration von 10µM. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurde die Platte für drei Minuten bei 1600rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Proben im Anschluss zweimal mit Ringerlösung gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 200µl PBS-BSA resuspendiert und in FACS Röhren überführt. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch mit einer Exzitationswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm im FL1 Kanal. In der Auswertung wurde das geometrische Mittel der DCFDA abhängigen Fluoreszenz bestimmt.

2.2.8 Messung der Hämolyse

Zur Messung der Hämolyse wurden die Ansätze nach der 48-stündigen Inkubationszeit für frei Minuten bei 1600rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. 100µl des Überstandes wurden in eine 96-well Platte überführt. Zusätzlich wurde auf dieser Platte eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden während der 48-stündigen Inkubationszeit zusätzlich Erythrozyten in destilliertem Wasser inkubiert. Die Hämolyse dieser unverdünnten Erythrozytensuspension wurde als 100% definiert. Die Menge an freigesetztem Hämoglobin im Überstand wurde dann fotometrisch bei 405nm bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit einer Standardkurve verglichen, die aus der Verdünnungsreihe resultierte.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die gemessenen Daten wurden graphisch dargestellt als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler. Zudem wurde der ANOVA Test im Anschluss durchgeführt. Die Anzahl (n) der Messungen entspricht der Anzahl der Patientenproben. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Stimulation der Eryptose durch Anidulafungin

3.1.1 Annexin V Bindung

In diesem Versuch sollte die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation mit 6µg/ml Anidulafungin anhand der Annexin V-FITC Fluoreszenz gemessen werden. In Abbildung 3 erkennt man, dass der Prozentsatz der Annexin bindenden Zellen in der Anwesenheit von Anidulafungin ab einer Konzentration von 3µg/ml signifikant ansteigt. Bei einer Konzentration des Anidulafungin von 0µg/ml beträgt der Prozentsatz der Annexin bindenden Zellen $1,24 \pm 0,88\%$ und steigt bei einer Konzentration des Anidulafungin von 6µg/ml auf $23,24 \pm 1,65\%$ an (Peter et al., 2016b).

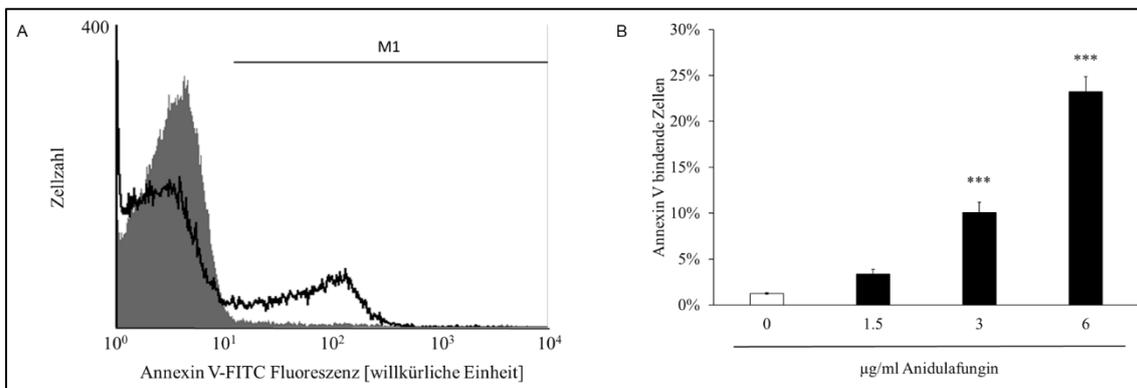


Abbildung 3: Effekt von Anidulafungin auf die Phosphatidylserinexposition (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

(A) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin (Peter et al., 2016b).

(B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=12) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Anidulafungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.2 Forward Scatter

Eine weitere Messung sollte den Forward Scatter erfassen. Hier lässt sich erkennen, dass der Forward Scatter schon ab einer Konzentration von 1,5µg/ml

Anidulafungin signifikant abfällt. Der Forward Scatter liegt bei einer Konzentration des Anidulafungin von 0µg/ml bei $510,50 \pm 10,79$ und fällt bei einer Konzentration des Anidulafungin von 6µg/ml auf $279,20 \pm 13,24$ ab (Peter et al., 2016b).

Die Schaubilder C und D der Abbildung 4 zeigen den Anteil der Zellen mit einem FSC < 200 (C) und einem FSC > 800 (D). Hier sieht man, dass der Anteil der Zellen mit FSC < 200 ab einer Anidulafungin Konzentration von 3µg/ml signifikant ansteigt, während der Anteil der Zellen mit einem FSC > 800 bereits ab einer Konzentration von 1,5µg/ml signifikant ansteigt (Peter et al., 2016b).

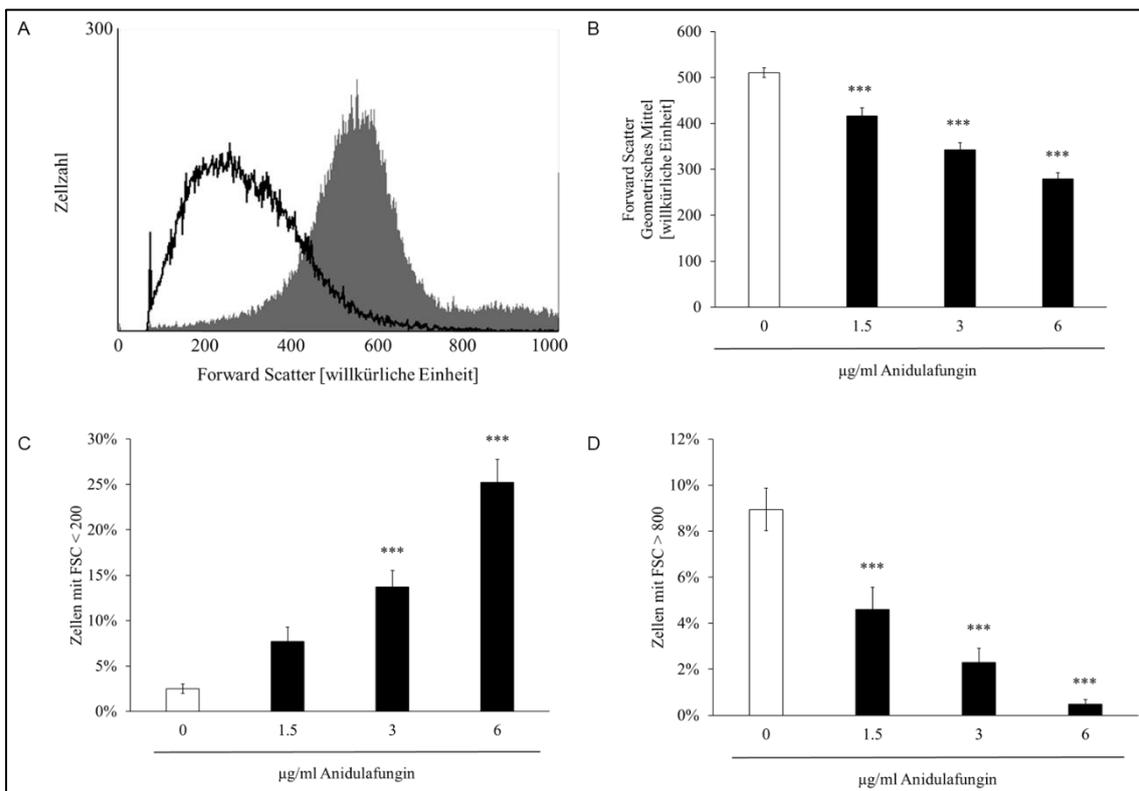


Abbildung 4: Effekt von Anidulafungin auf den Forward Scatter der Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A) Histogramm des Forward Scatter der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin (Peter et al., 2016b).
- (B) Arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler (n=12) des Forward Scatter der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Anidulafungin.

***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler ($n=12$) des Prozentsatzes der Erythrozyten mit Forward Scatter < 200 nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Anidulafungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

(D) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler ($n=12$) des Prozentsatzes der Erythrozyten mit Forward Scatter > 800 nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Anidulafungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.3 Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration

In einem weiteren Versuch wurde die Kaliumkonzentration der Ringerlösung, in der die Inkubation stattfand, variiert. Es wurden zwei Kontrollproben mit 5 und 120mM Kalium ohne Anidulafungin und drei Proben mit 5, 60 und 120mM Kalium, in denen die Inkubation mit Anidulafungin stattfand, angesetzt. Es wurden sowohl die Phosphatidylserinexposition als auch der Forward Scatter und die Hämolyse gemessen. Während der Prozentsatz der Annexin bindenden Zellen keine Veränderung zeigte, stieg der Forward Scatter ab einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 60mM an. Die Hämolyse war rückläufig und zwar ab einer Kaliumkonzentration von 120mM. Der Forward Scatter betrug in der Anwesenheit von Anidulafungin bei einer Kaliumkonzentration von 5mM $276,60 \pm 7,11$, bei einer Kaliumkonzentration von 120mM $430,90 \pm 6,50$ (Peter et al., 2016b).

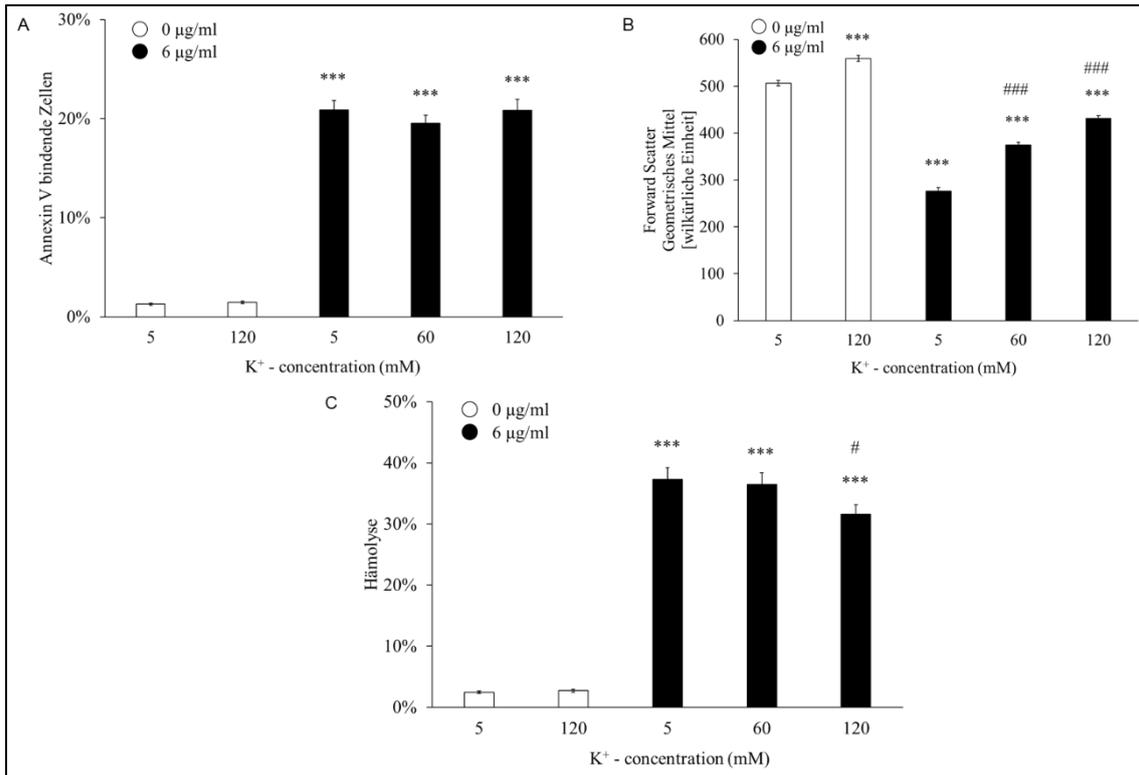


Abbildung 5: Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf Annexin V Bindung, Forward Scatter und Hämolyse der Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=20) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6 µg/ml Anidulafungin bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5, 60 und 120mM. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin bei 5mM Kalium (ANOVA) (Peter et al., 2016b).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=20) des Forward Scatter der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6 µg/ml Anidulafungin bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5, 60 und 120mM. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin bei 5mM Kalium, ###($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen mit Anidulafungin bei 5mM Kalium. (ANOVA) (Peter et al., 2016b).
- (C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=20) der Hämolyse der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6 µg/ml Anidulafungin bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5, 60 und 120mM. ***($p < 0,001$)

bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin bei 5mM Kalium, #($p < 0,05$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen mit Anidulafungin bei 5mM Kalium. (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.4 Fluo-3 Fluoreszenz

Als Maß für die zytosolische Calcium-Konzentration wurde die Fluo-3 Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen. Dabei zeigte sich ein leichter, aber signifikanter Anstieg der Fluo-3 Fluoreszenz ab einer Konzentration des Anidulafungin von 6µg/ml auf insgesamt $23,83 \pm 0,91$. In der Kontrolle lag der Wert bei $20,11 \pm 0,57$ (Peter et al., 2016b).

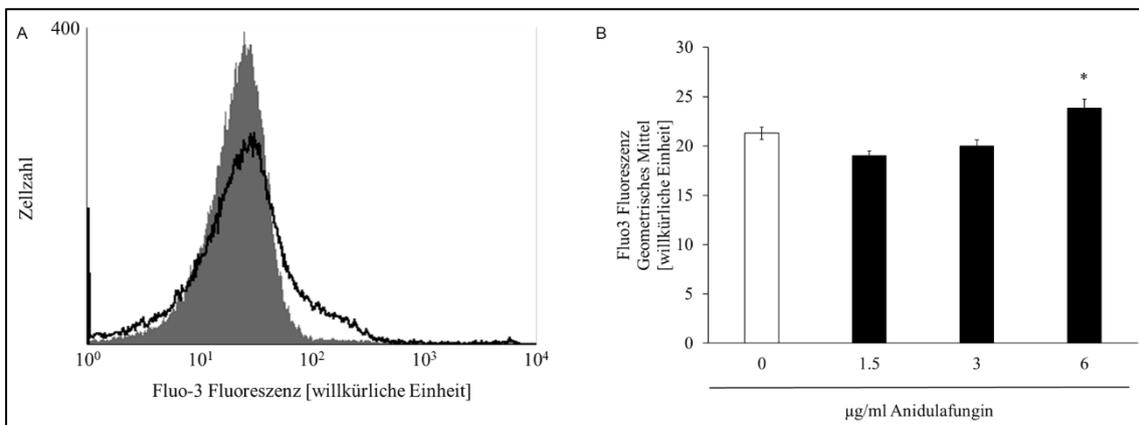


Abbildung 6: Effekt von Anidulafungin auf die zytosolische Calcium-Konzentration (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A) Histogramm der Fluo-3 Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin (Peter et al., 2016b).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler ($n=12$) der Fluo-3 Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Anidulafungin. * ($p < 0,05$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.5 Calciumentzug

Zusätzlich zur Fluo-3 Fluoreszenzmessung wurde in einem zusätzlichen Versuch ein Ansatz mit Calcium und ein Ansatz ohne Calcium in der zur Inkubation benutzten Ringerlösung hergestellt. Hier lässt sich erkennen, dass bei einer

Behandlung der Erythrozyten mit 6µg/ml Anidulafungin für 48 Stunden der Prozentsatz der Annexin bindenden Zellen von $32,65 \pm 0,70\%$ auf $30,56 \pm 0,71\%$ signifikant abfällt (Peter et al., 2016b).

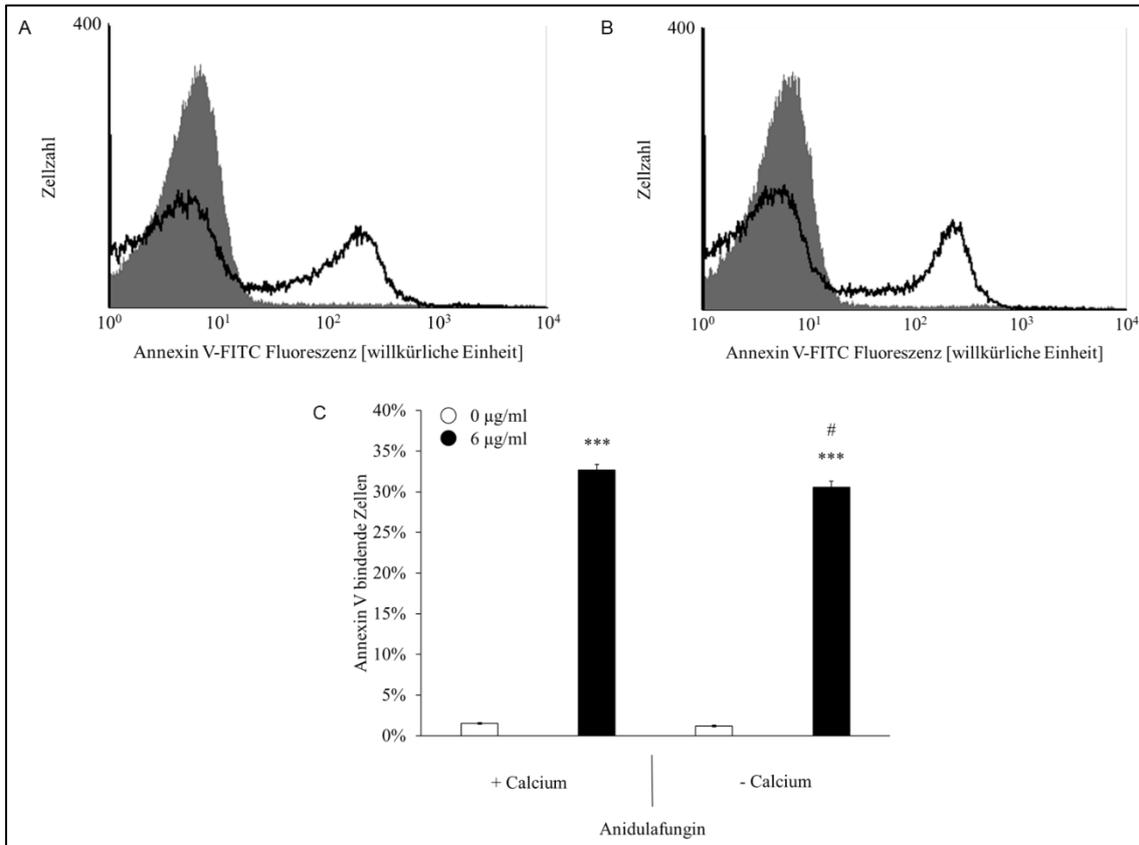


Abbildung 7: Effekt des Calciumentzuges auf die durch Anidulafungin ausgelöste Phosphatidylserinexposition. (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von Calcium (Peter et al., 2016b).
- (C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=11) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin in der Anwesenheit (linke Balken) und Abwesenheit (rechte Balken) von Calcium. *** (p<0,001) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin, # (p<0,05) bedeutet einen signifikanten

Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen mit Calcium (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.6 Hämolyse

Des Weiteren wurde photometrisch die Hämolyse der Erythrozyten gemessen. In Abbildung 8 kann man erkennen, dass die Hämolyse in der Kontrolle $1,11 \pm 0,20\%$ beträgt und bei Behandlung mit $6 \mu\text{g/ml}$ Anidulafungin auf $39,46 \pm 4,84\%$ ansteigt (Peter et al., 2016b).

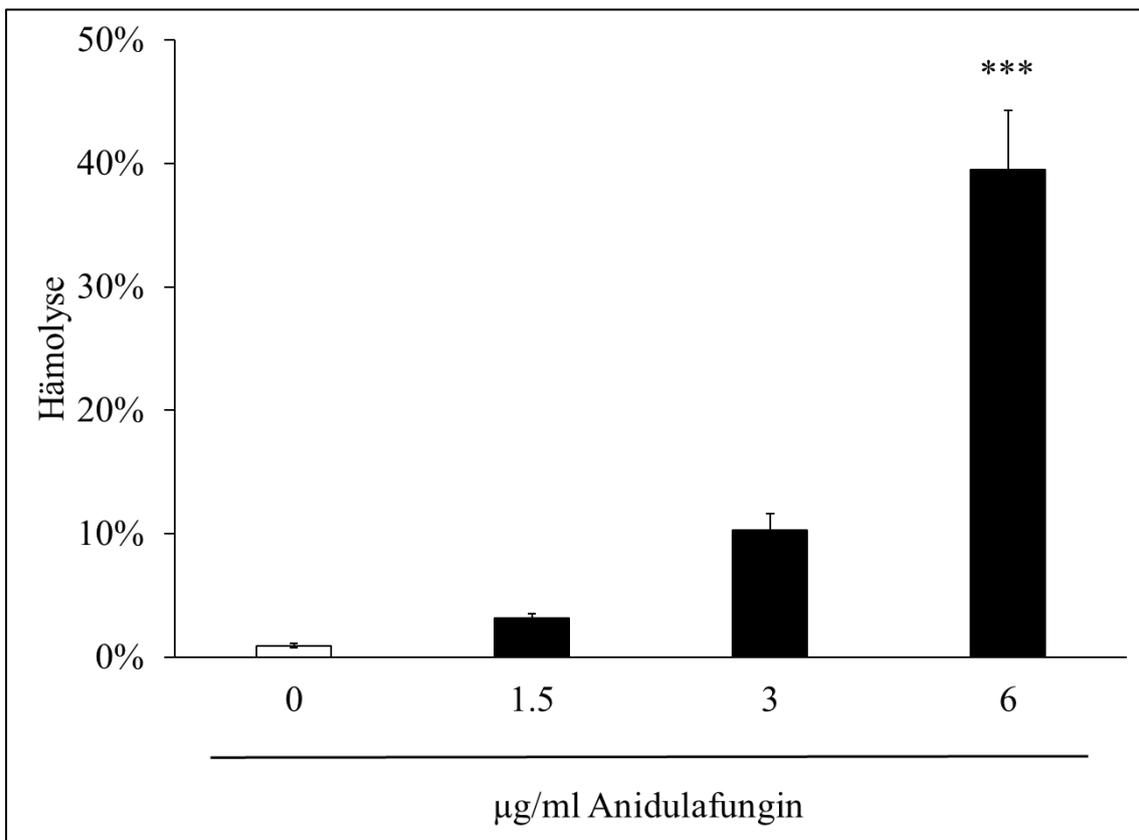


Abbildung 8: Effekt von Anidulafungin auf die Hämolyse (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler ($n=8$) des Prozentsatzes der hämolytischen Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Anidulafungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.7 Einfluss von SB203580 auf die Phosphatidylserinexposition

Um den Einfluss von SB203580 auf die durch Anidulafungin ausgelöste Eryptose zu prüfen, wurde ein weiterer Versuch gestartet. Hier zeigte sich, dass in Anwesenheit von SB203580 der Prozentsatz der Annexin bindenden Zellen während einer Behandlung mit 6µg/ml Anidulafungin von $28,88 \pm 1,19$ auf $21,57 \pm 1,08$ abfällt (Peter et al., 2016b).

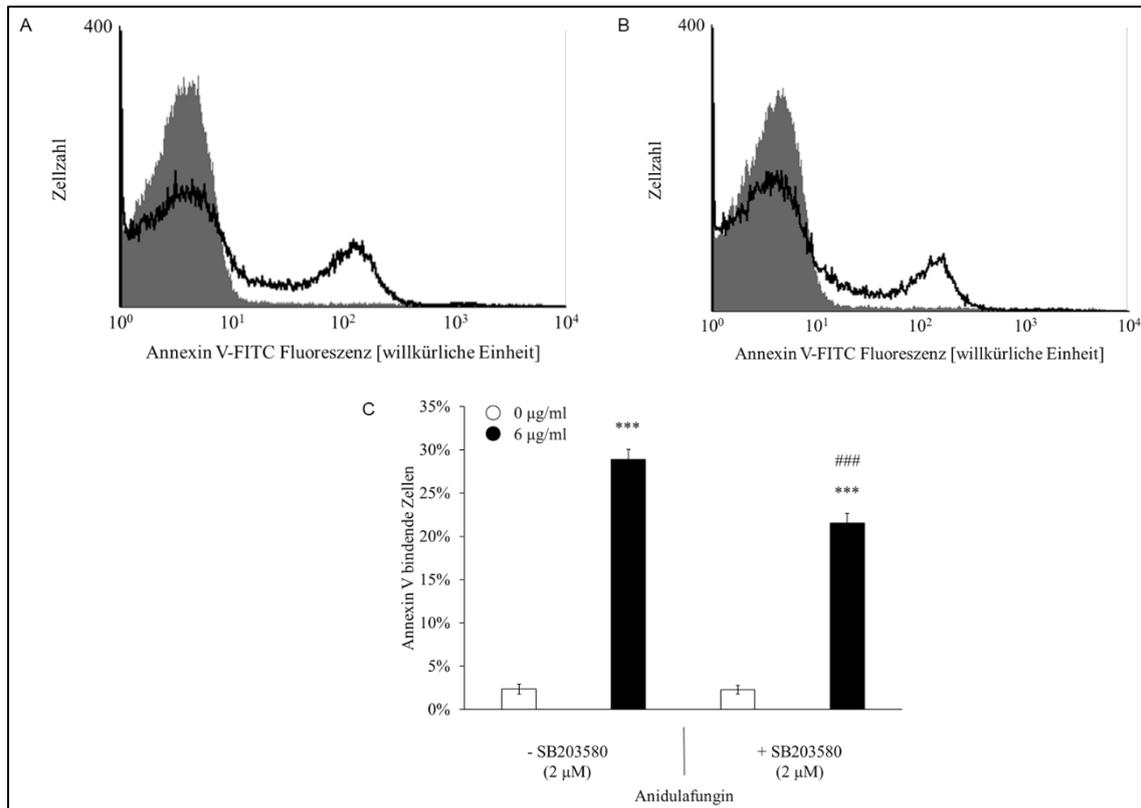


Abbildung 9: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit SB203580 und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 2µM SB203580 (Peter et al., 2016b).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 2µM SB203580. ***(p<0,001) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin, ###(p<0,001) bedeutet

einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne SB203580 (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.8 Einfluss von Nitroprussid auf die Phosphatidylserinexposition

In Abbildung 10 sieht man das Ergebnis eines Versuches, in dem der Einfluss von Nitroprussid auf die durch Anidulafungin ausgelöste Eryptose getestet wurde. Es lässt sich erkennen, dass unter dem Einfluss des Nitroprussid der Prozentsatz der Annexin bindenden Zellen während einer Behandlung mit Anidulafungin von $24,40 \pm 1,20$ auf $21,10 \pm 1,05$ abfällt (Peter et al., 2016b).

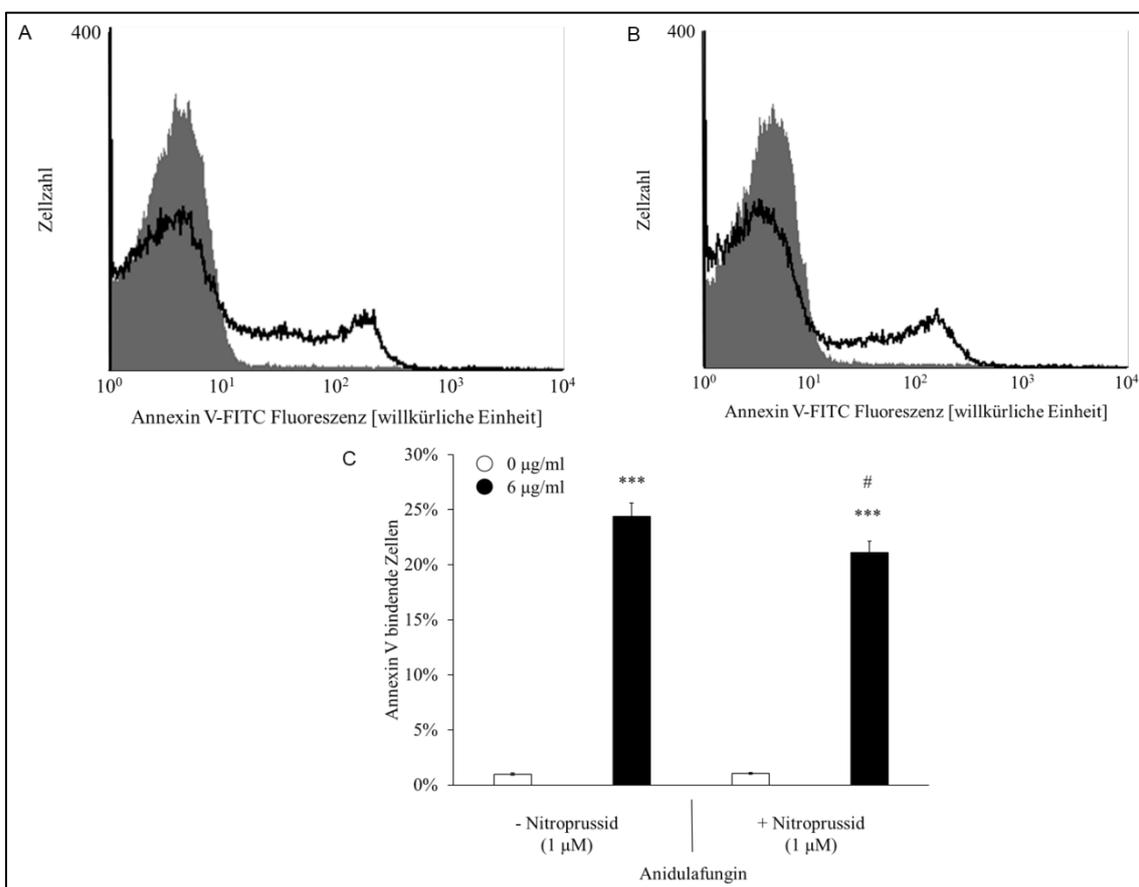


Abbildung 10: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Nitroprussid und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 1µM Nitroprussid (Peter et al., 2016b).

- (C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 1µM Nitroprussid. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin, #($p < 0,05$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Nitroprussid (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.9 Einfluss von Staurosporin auf die Phosphatidylserinexposition

Ein weiterer Stoff, dessen möglicherweise inhibitorische Wirkung auf die durch Anidulafungin ausgelöste Eryptose untersucht werden sollte, ist Staurosporin. In Abbildung 11 sieht man, dass Staurosporin zu keinem signifikanten Rückgang des Prozentsatzes der Annexin bindenden Zellen führte (Peter et al., 2016b).

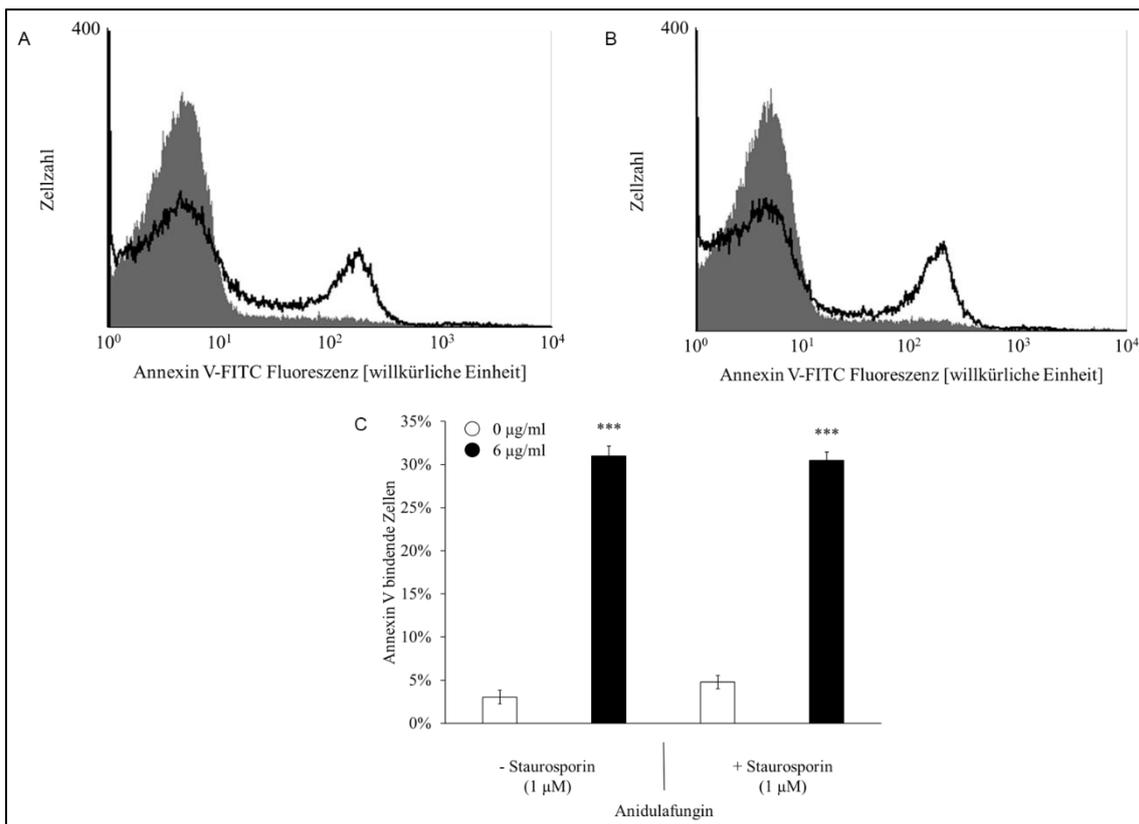


Abbildung 11: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Staurosporin und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie)

6µg/ml Anidulafungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 1µM Staurosporin (Peter et al., 2016b).

- (C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 1µM Staurosporin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Anidulafungin (Peter et al., 2016b).

3.1.10 Einfluss von ZVAD auf die Phosphatidylserinexposition

Nun sollte noch der Effekt von ZVAD auf die Phosphatidylserinexposition geprüft werden. Auch hier lässt sich keine signifikante Änderung der Annexin Bindung feststellen (Peter et al., 2016b).

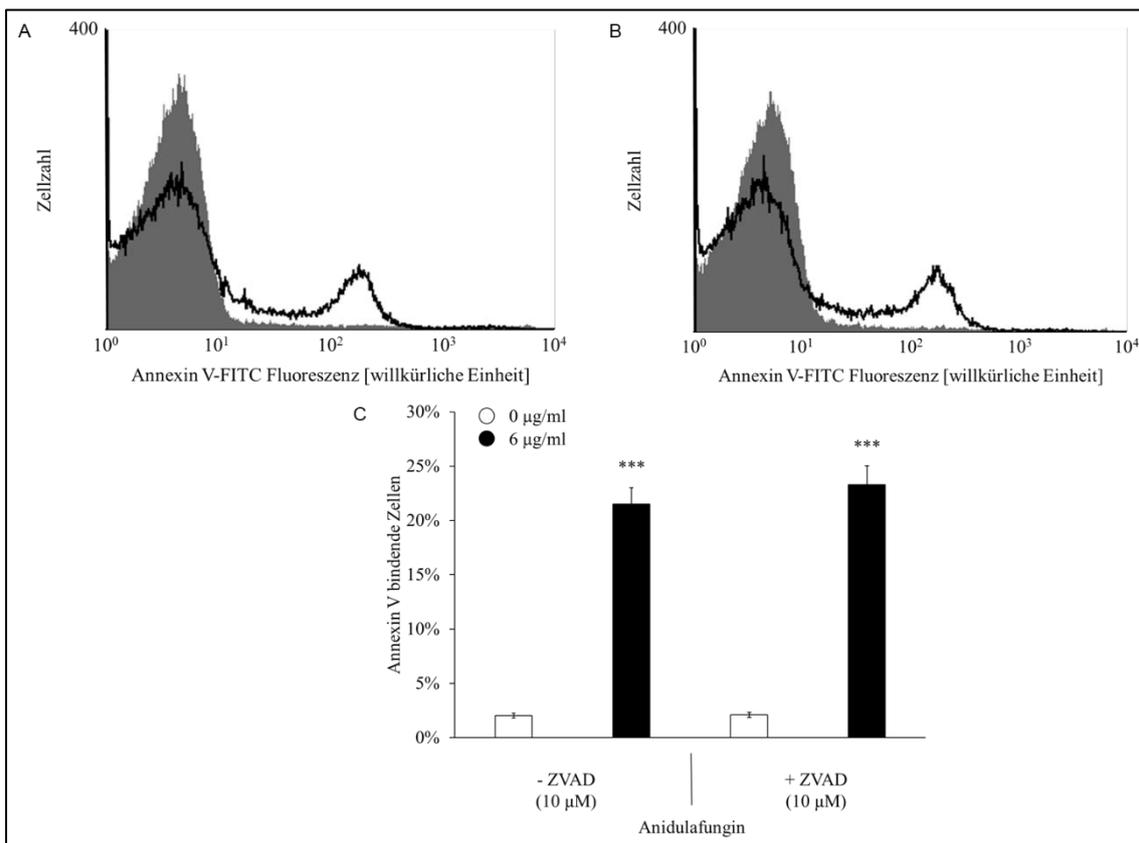


Abbildung 12: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit ZVAD und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10µM ZVAD (Peter et al., 2016b).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 10µM ZVAD. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Anidulafungin (Peter et al., 2016b).

3.1.11 Einfluss von D4476 auf die Phosphatidylserinexposition

Auch D4476 zeigte keine signifikante Änderung der Phosphatidylserinexposition (Peter et al., 2016b).

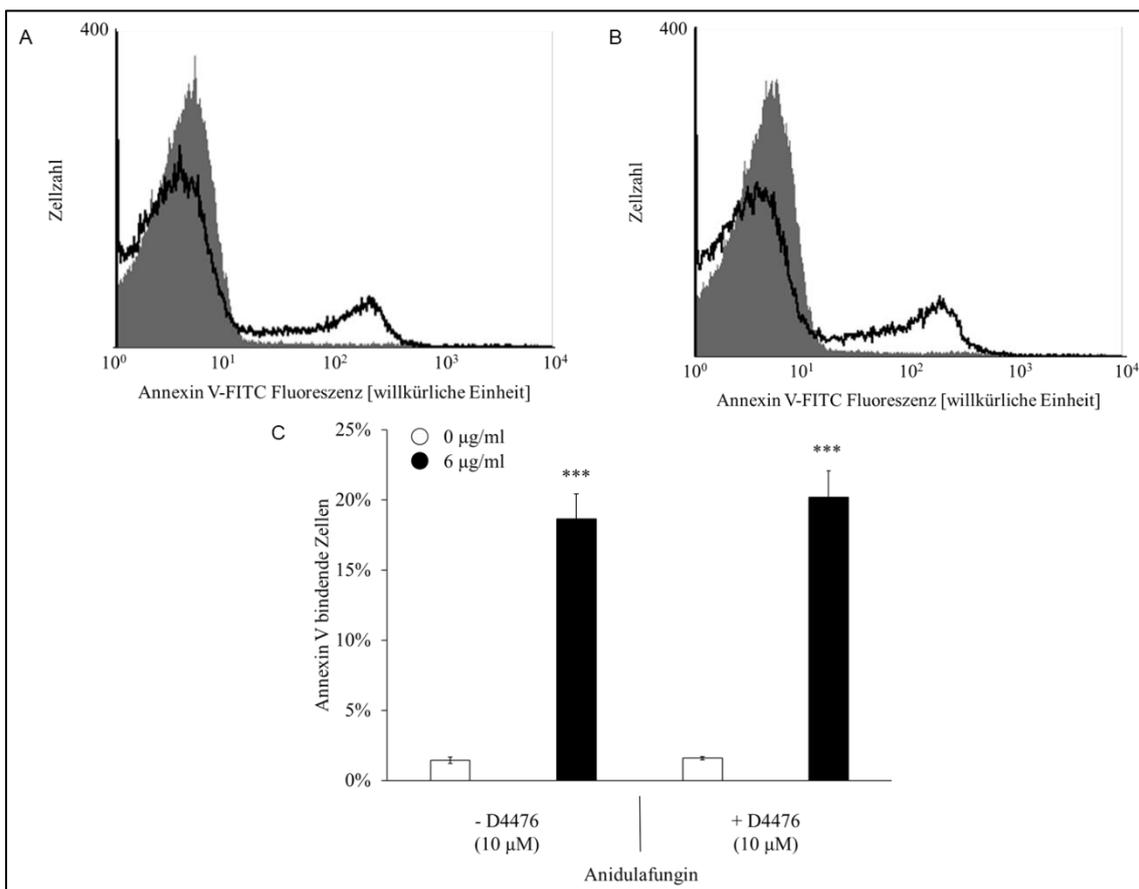


Abbildung 13: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit D4476 und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10µM D4476 (Peter et al., 2016b).
- (C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 10µM D4476. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Anidulafungin (Peter et al., 2016b).

3.1.12 Ceramid Bildung

Um den Effekt des Anidulafungin auf die Ceramid Bildung zu untersuchen, wurde ein weiterer Versuch unternommen. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Man kann sehen, dass Anidulafungin zu keiner signifikanten Änderung der Ceramid Bildung führte (Peter et al., 2016b).

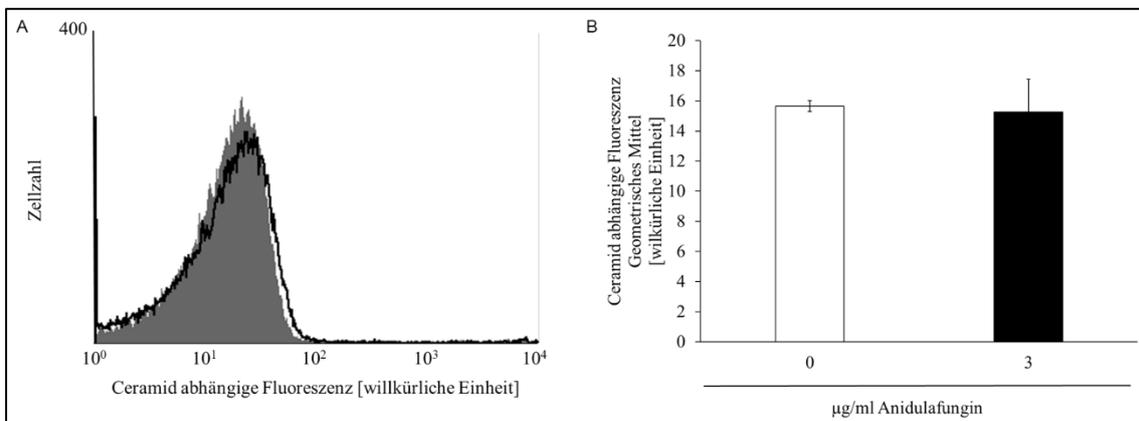


Abbildung 14: Einfluss von Anidulafungin auf die Ceramid Bildung in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A) Histogramm der Ceramid abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin (Peter et al., 2016b).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=5) der Ceramid abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in

Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin (Peter et al., 2016b).

3.1.13 ROS Aktivität

Bei der durchflusszytometrischen Überprüfung der Bildung von ROS zeigte sich wie in Abbildung 15 dargestellt ein signifikanter Rückgang von ROS ab einer Anidulafungin Konzentration von 3µg/ml. Während die DCFDA abhängige Fluoreszenz in der Kontrolle 15,79±0,48 betrug, fiel dieser Wert bei einer Anidulafungin Konzentration von 6µg/ml auf 12,11±0,69 ab (Peter et al., 2016b).

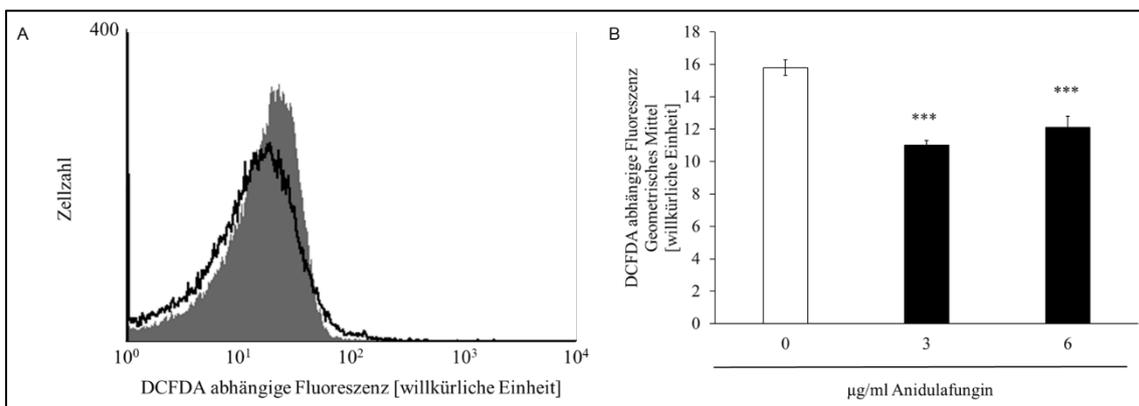


Abbildung 15: Einfluss von Anidulafungin auf die ROS Aktivität in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

- (A) Histogramm der DCFDA abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6µg/ml Anidulafungin (Peter et al., 2016b).
- (B) Arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler (n=8) der DCFDA abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6µg/ml Anidulafungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.1.14 Einfluss von Acetylcystein auf die Phosphatidylserinexposition

Als zusätzlicher Versuch zur Überprüfung ob bei der durch Anidulafungin ausgelösten Eryptose eventuell reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind, wurden die Erythrozyten in einem weiteren Versuch zusätzlich mit Acetylcystein inkubiert.

Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der Phosphatidylserinexposition (Peter et al., 2016b).

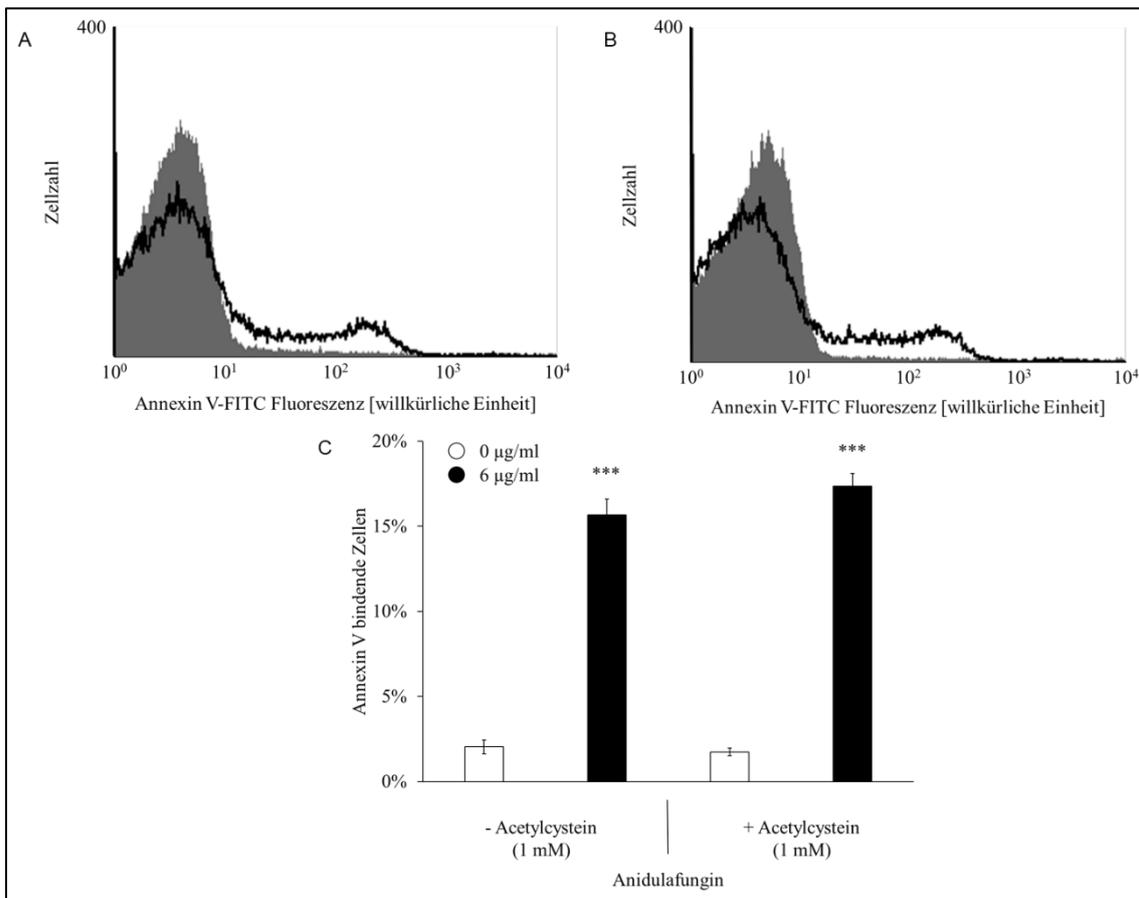


Abbildung 16: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Acetylcystein und Anidulafungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016b))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 6 $\mu\text{g/ml}$ Anidulafungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 1 mM AC (Peter et al., 2016b).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 6 $\mu\text{g/ml}$ Anidulafungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 1 mM AC. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016b).

3.2 Stimulation der Eryptose durch Caspofungin

3.2.1 Annexin V Bindung

Wie bereits bei dem Versuch mit Anidulafungin sollte auch hier die Phosphatidylserinexposition der mit Caspofungin behandelten Erythrozyten überprüft werden. In Abbildung 17 sieht man einen signifikanten Anstieg des Prozentsatzes der Annexin bindenden Zellen ab einer Konzentration des Caspofungin von 30µg/ml. Der Wert der Kontrolle beträgt $1,75 \pm 0,16\%$ und steigt bei einer Caspofungin Konzentration von 60µg/ml auf $10,68 \pm 0,38\%$ an (Peter et al., 2016a).

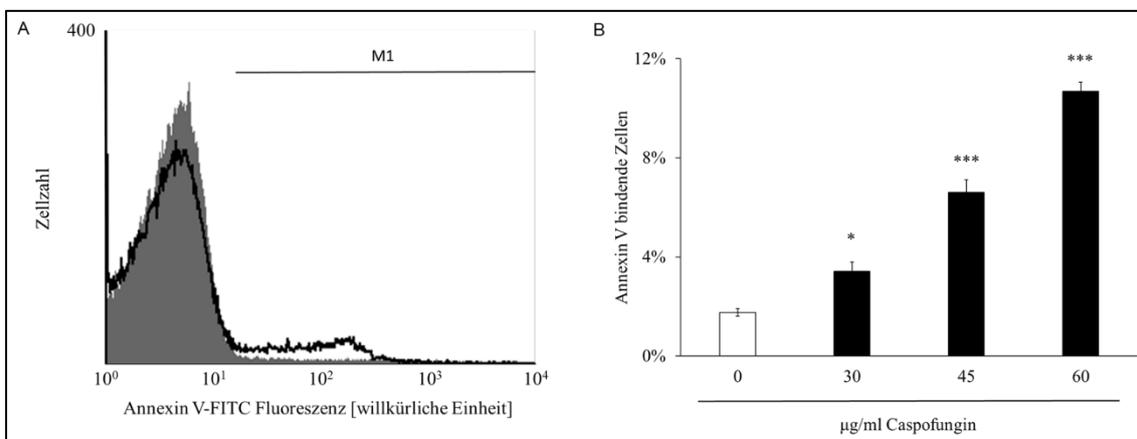


Abbildung 17: Effekt von Caspofungin auf die Phosphatidylserinexposition (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

- (A) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin (Peter et al., 2016a).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=21) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Caspofungin. *($p < 0,05$), ***($p < 0,001$) bedeuten einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Anidulafungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).

3.2.2 Forward Scatter

In Abbildung 18 sieht man den Forward Scatter der Erythrozyten. Ab einer Konzentration von 30µg/ml des Caspofungin fällt der Forward Scatter signifikant

ab und erreicht bei einer Konzentration von 60µg/ml einen Wert von $369,10 \pm 7,17$, während die Kontrolle einen Wert von $538,50 \pm 9,01$ hat (Peter et al., 2016a).

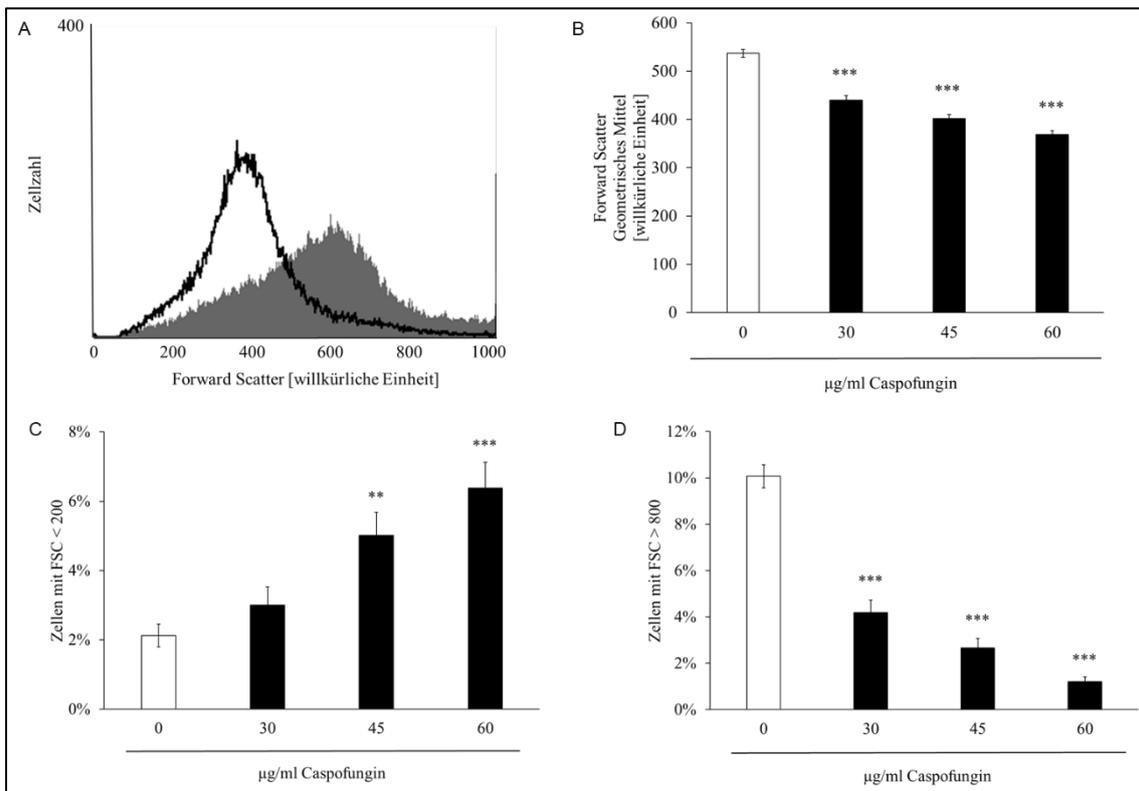


Abbildung 18: Effekt von Caspofungin auf den Forward Scatter der Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

- (A) Histogramm des Forward Scatter der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin (Peter et al., 2016a).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=21) des Forward Scatter der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Caspofungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Caspofungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).
- (C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=21) des Prozentsatzes der Erythrozyten mit Forward Scatter < 200 nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Caspofungin. **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) bedeuten einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Caspofungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).
- (D) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=21) des Prozentsatzes der Erythrozyten mit Forward Scatter > 800 nach einer 48-stündigen Inkubation bei

37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Caspofungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Caspofungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).

3.2.3 Fluo-3 Fluoreszenz

In Abbildung 19 erkennt man, dass sich bei Inkubation mit Caspofungin keine Veränderung der Fluo-3 Fluoreszenz zeigt (Peter et al., 2016a).

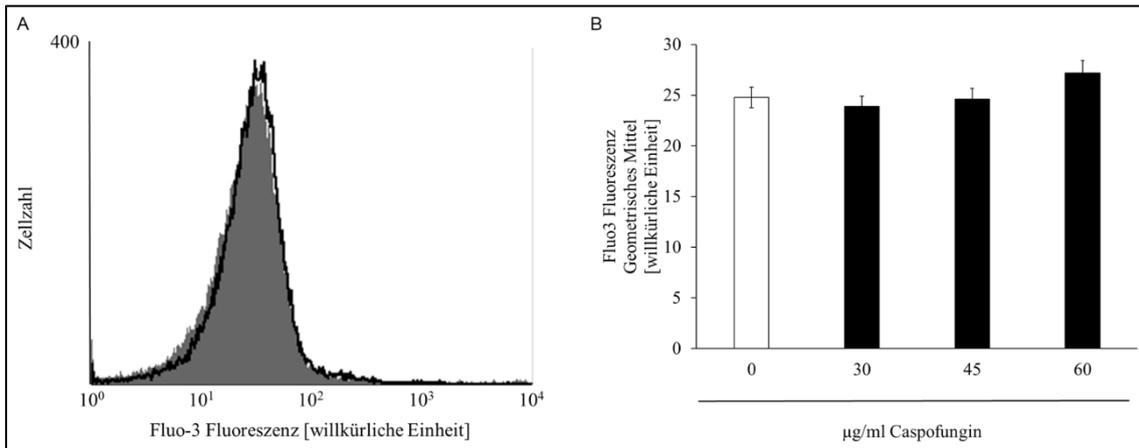


Abbildung 19: Effekt von Caspofungin auf die zytosolische Calcium-Konzentration (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

- (A) Histogramm der Fluo-3 Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin (Peter et al., 2016a).
- (B) Arithmetisches Mittelwert \pm Standardfehler ($n=21$) der Fluo-3 Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von Caspofungin (Peter et al., 2016a).

3.2.4 Calciumentzug

Auch bei Calciumentzug erkennt man keine signifikante Veränderung der Phosphatidylserinexposition. (Peter et al., 2016a)

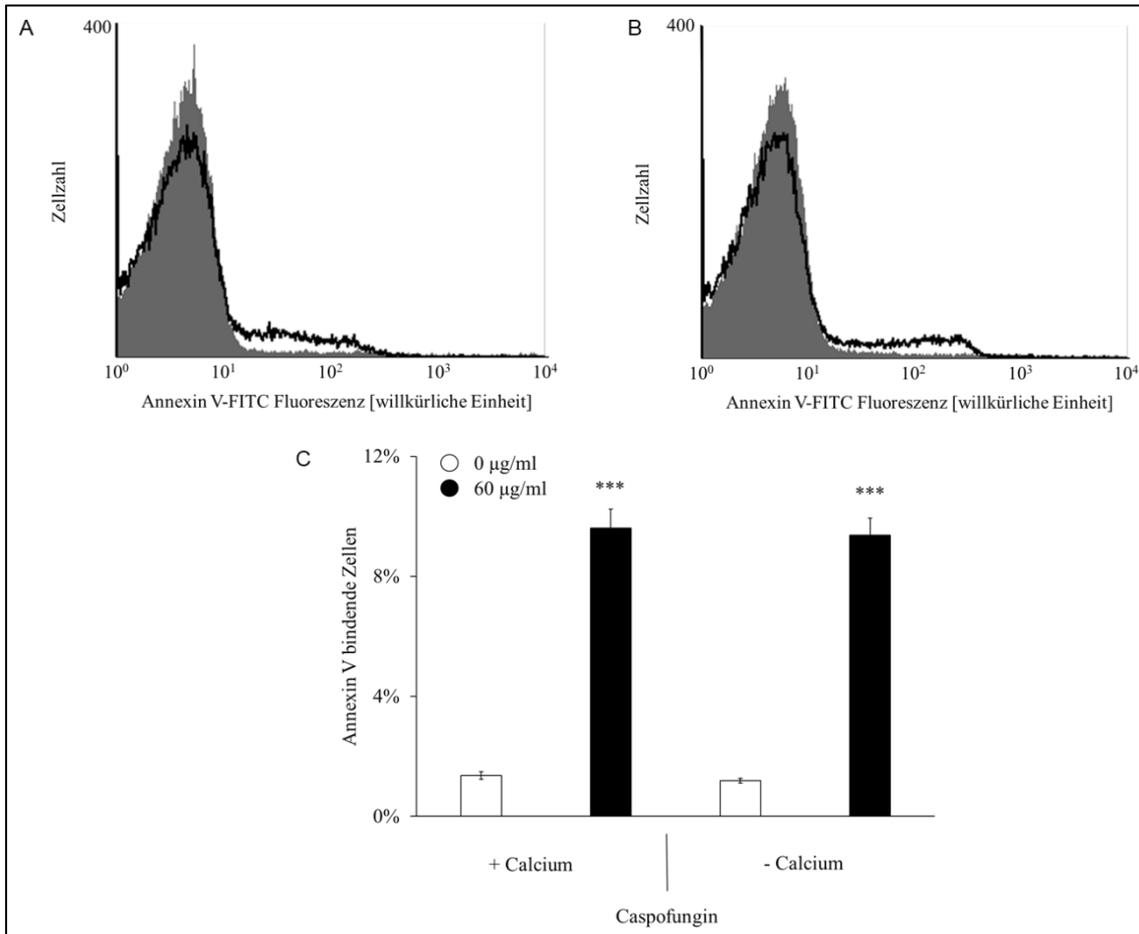


Abbildung 20: Effekt des Calciumentzuges auf die durch Caspofungin ausgelöste Phosphatidylserinexposition (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von Calcium (Peter et al., 2016a).

(C) Arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler (n=16) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 60µg/ml Caspofungin in der Anwesenheit (linke Balken) und Abwesenheit (rechte Balken) von Calcium. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Anidulafungin (Peter et al., 2016a).

3.2.5 Hämolyse

In Abbildung 21 sieht man, dass die Hämolyse der Erythrozyten ab einer Konzentration von 30 µg/ml signifikant ansteigt. Die Kontrolle liegt bei $0,71 \pm 0,31\%$, während bei einer Caspofungin Konzentration von 60 µg/ml der Wert schon $43,74 \pm 2,19\%$ beträgt (Peter et al., 2016a).

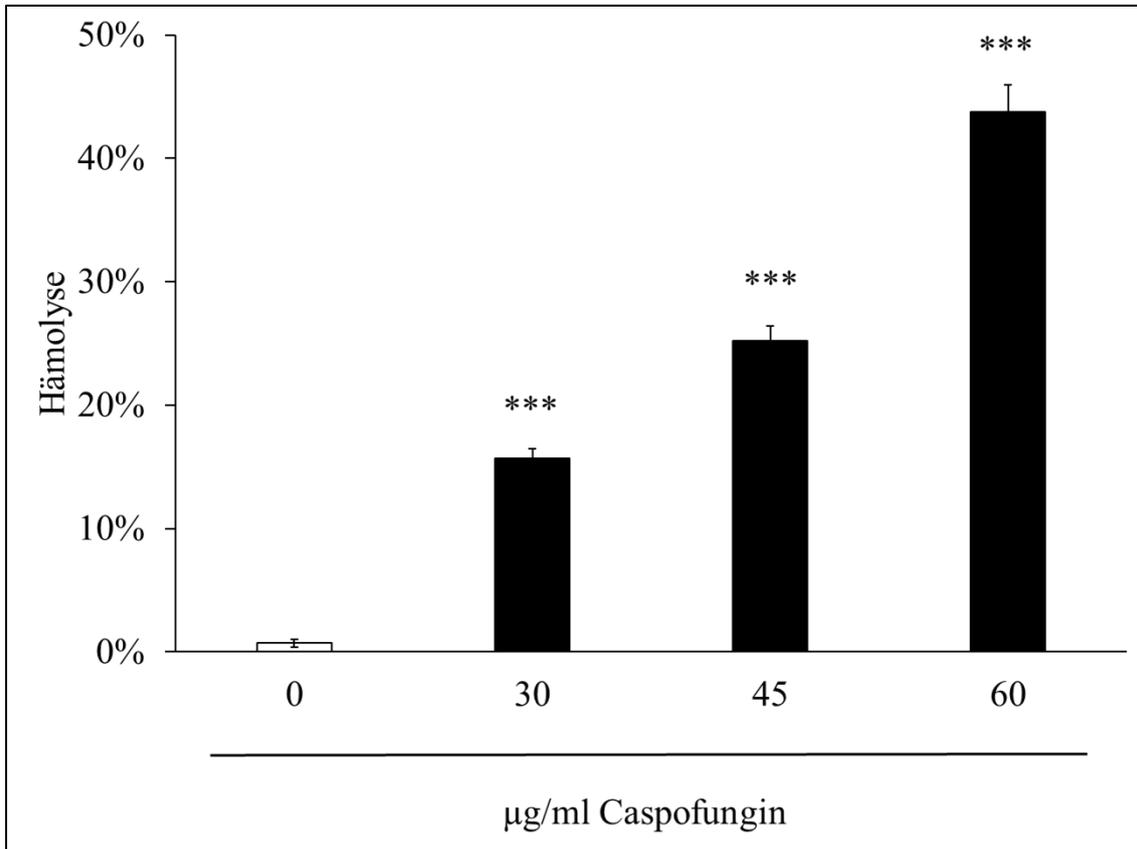


Abbildung 21: Effekt von Caspofungin auf die Hämolyse (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=21) des Prozentsatzes der hämolytischen Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Caspofungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Caspofungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).

3.2.6 Einfluss von SB203580 auf die Phosphatidylserinexposition

Auch beim Caspofungin sollte der Einfluss von SB203580 auf die Phosphatidylserinexposition untersucht werden. Man erkennt in Abbildung 22

keine signifikante Veränderung durch die Zugabe von SB203580 (Peter et al., 2016a).

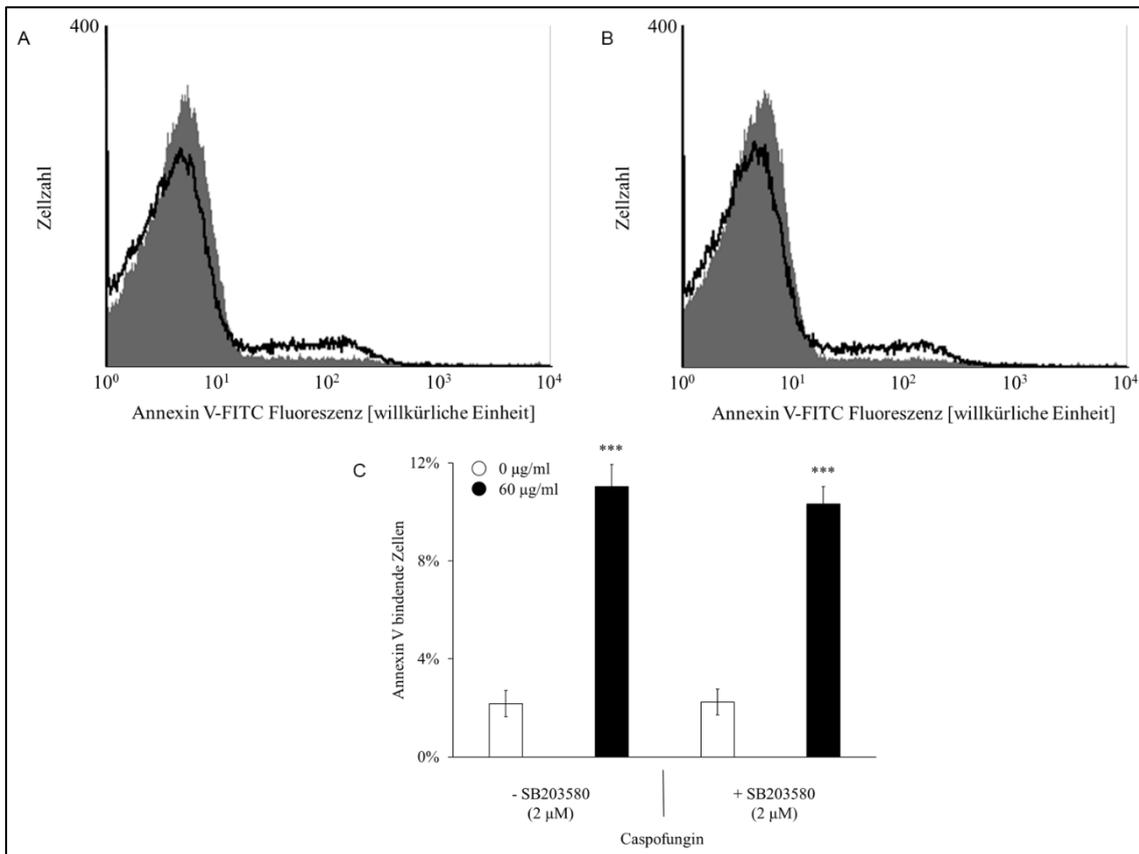


Abbildung 22: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit SB203580 und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

- (A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 2µM SB203580 (Peter et al., 2016a).
- (C) Arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 60µg/ml Caspofungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 2µM SB203580. ***(p<0,001) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Anidulafungin (Peter et al., 2016a).

3.2.7 Einfluss von Staurosporin auf die Phosphatidylserinexposition

Wie man in Abbildung 23 sieht, steigt durch Zugabe von Staurosporin der Prozentsatz an Annexin bindenden Zellen von $11,12 \pm 0,69\%$ auf $15,90 \pm 0,65\%$ (Peter et al., 2016a).

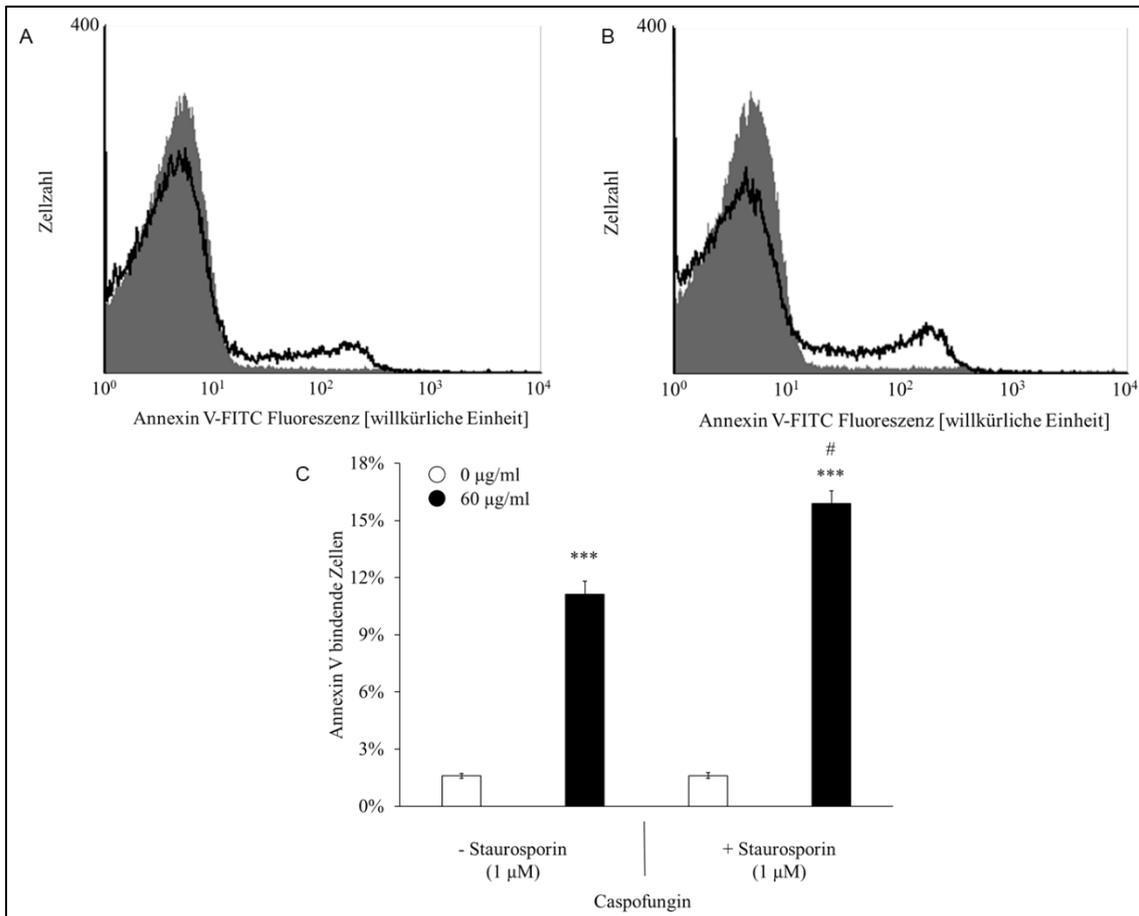


Abbildung 23: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Staurosporin und Caspofungin. (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 1µM Staurosporin (Peter et al., 2016a).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=16) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 60µg/ml Caspofungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 1µM Staurosporin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Anidulafungin, #($p < 0,05$) bedeutet einen

signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Staurosporin (Peter et al., 2016a).

3.2.8 Einfluss von ZVAD auf die Phosphatidylserinexposition

Auch ZVAD zeigt keine signifikante Auswirkung auf die durch Caspofungin ausgelöste Annexin Bindung. (Peter et al., 2016a)

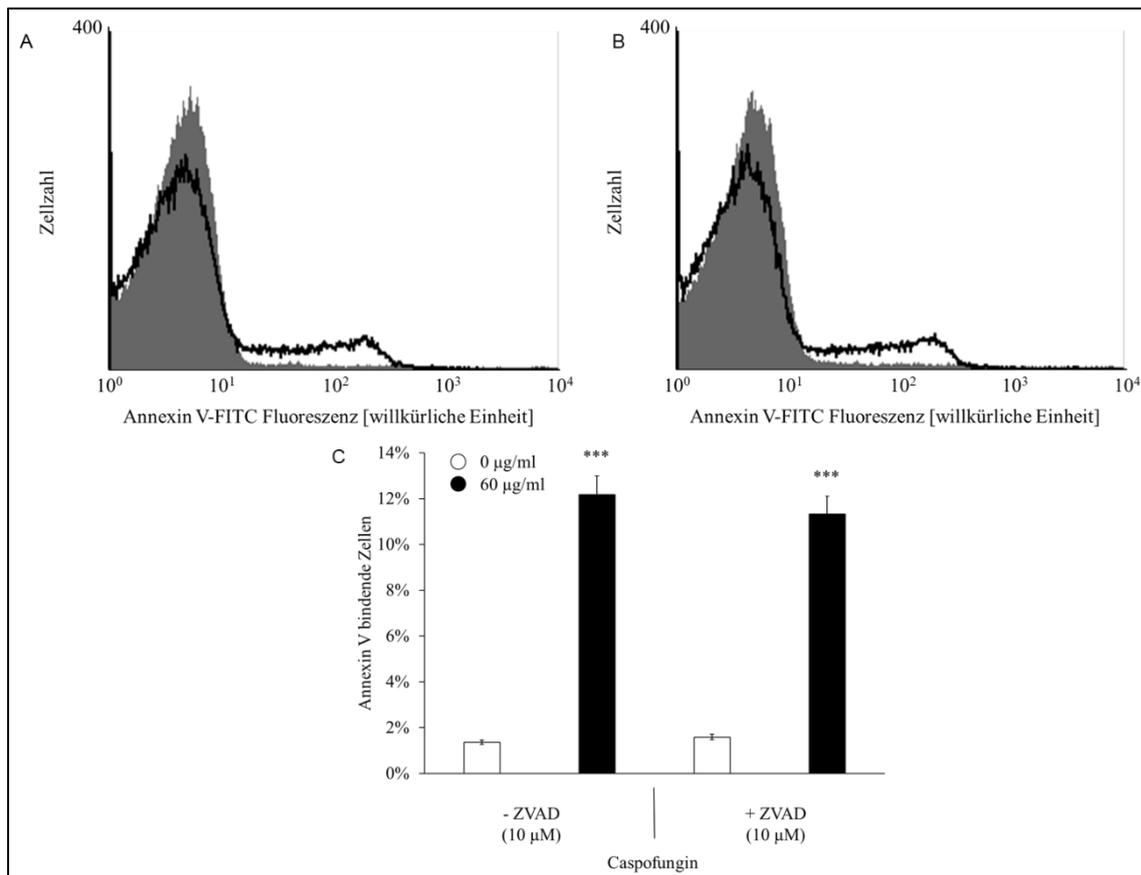


Abbildung 24: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit ZVAD und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10µM ZVAD (Peter et al., 2016a).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 60µg/ml Caspofungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 10µM ZVAD. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten

Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Caspofungin (Peter et al., 2016a).

3.2.9 Einfluss von D4476 auf die Phosphatidylserinexposition

Im Gegensatz zu den vorangehend genannten Stoffen zeigt D4476 einen Effekt auf die Phosphatidylserinexposition. Durch Zugabe von D4476 verringert sich der Anteil der Annexin bindenden Erythrozyten von $11,01 \pm 0,67\%$ auf $8,02 \pm 0,60\%$ (Peter et al., 2016a).

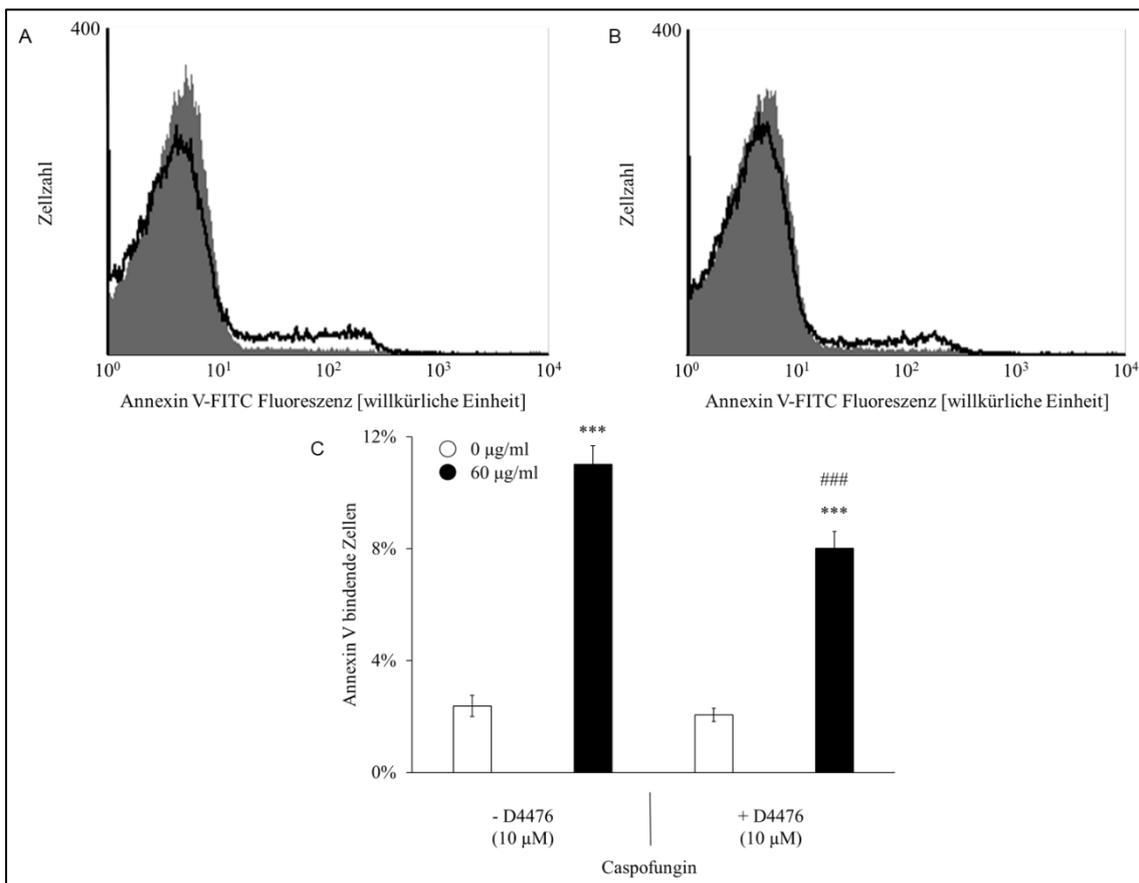


Abbildung 25: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit D4476 und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10µM D4476 (Peter et al., 2016a).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=16) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung

ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 60µg/ml Caspofungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 10µM D4476. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Caspofungin, ###($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne D4476 (Peter et al., 2016a).

3.2.10 Ceramid Bildung

Anders als Anidulafungin zeigt Caspofungin einen Effekt auf die Ceramid Bildung. Es ist ein signifikanter Abfall der Ceramid abhängigen Fluoreszenz von $16,05 \pm 0,69$ auf $14,06 \pm 0,37$ zu erkennen (Peter et al., 2016a).

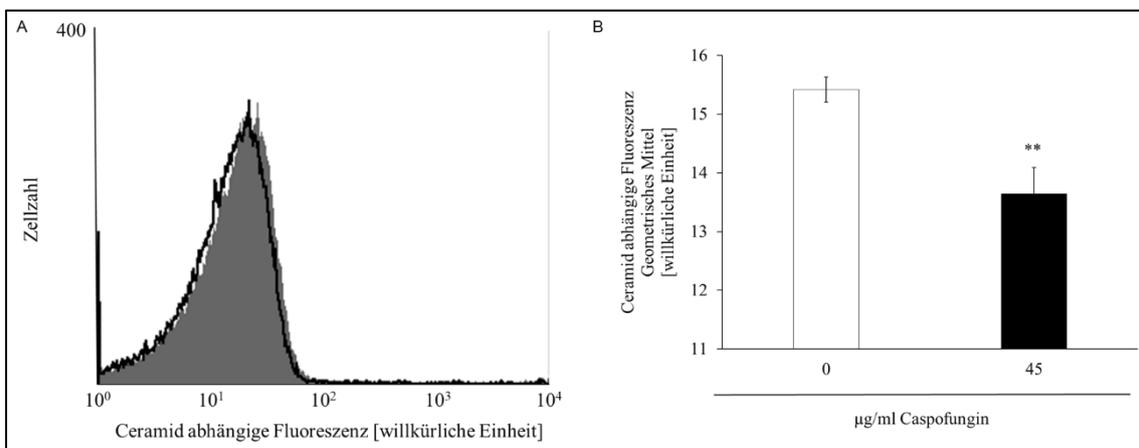


Abbildung 26: Einfluss von Caspofungin auf die Ceramid Bildung in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

- (A) Histogramm der Ceramid abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 45µg/ml Caspofungin (Peter et al., 2016a).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=5) der Ceramid abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 45µg/ml Caspofungin. **($p < 0,01$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Caspofungin (Peter et al., 2016a).

3.2.11 ROS Aktivität

Wie im vorangehenden Versuch zeigt auch die DCFDA abhängige Fluoreszenz durch Zugabe von Caspofungin einen Abfall von $15,41 \pm 0,26$ auf $10,04 \pm 0,30$. (Peter et al., 2016a).

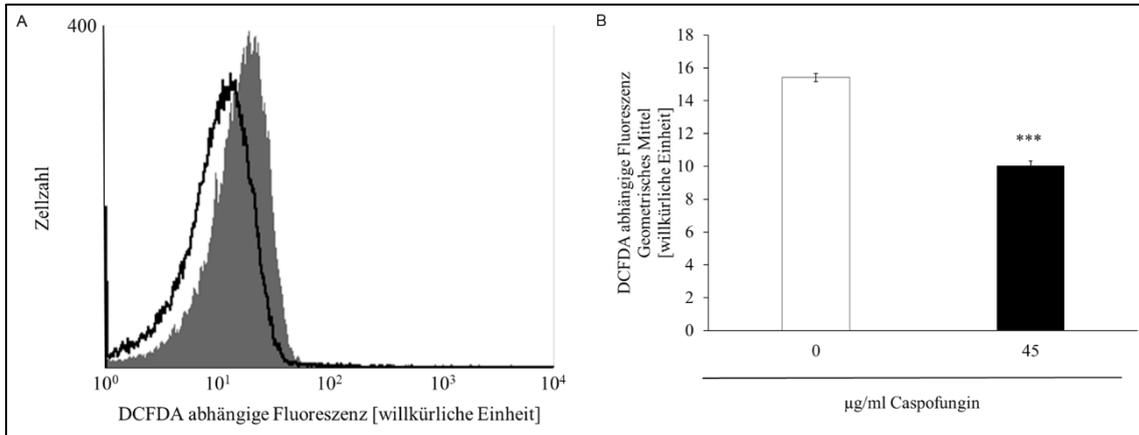


Abbildung 27: Einfluss von Caspofungin auf die ROS Aktivität in Erythrozyten (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

- (A) Histogramm der DCFDA abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 45µg/ml Caspofungin (Peter et al., 2016a).
- (B) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der DCFDA abhängigen Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 45µg/ml Caspofungin. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Caspofungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).

3.2.12 Einfluss von Acetylcystein auf die Phosphatidylserinexposition

Zuletzt folgte ein weiterer Versuch zur Abklärung der Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der durch Caspofungin ausgelösten Phosphatidylserinexposition. Hier ließ sich kein signifikanter Effekt durch Zugabe von Acetylcystein feststellen (Peter et al., 2016a).

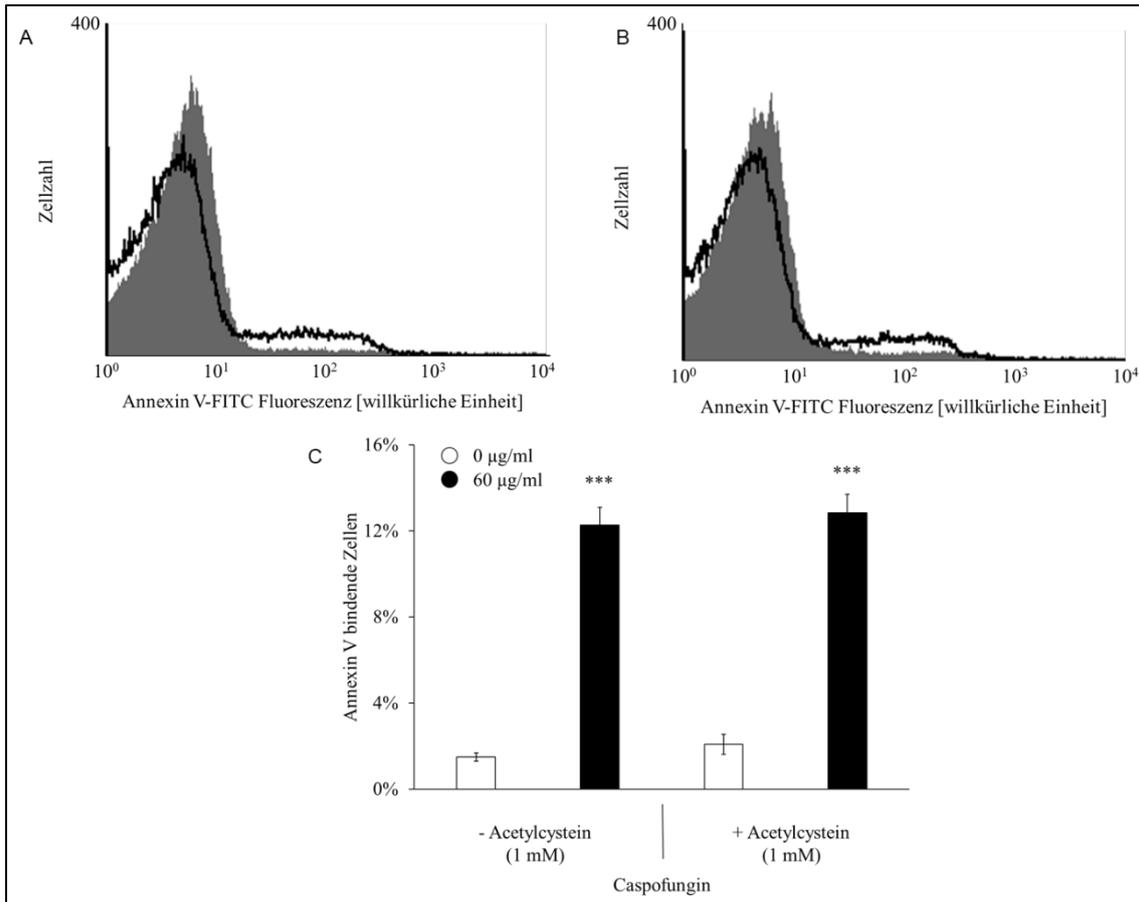


Abbildung 28: Effekt der Koinkubation der Erythrozyten mit Acetylcystein und Caspofungin (modifiziert nach (Peter et al., 2016a))

(A,B) Histogramm der Annexin V-FITC Fluoreszenz der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C ohne (grauer Bereich) und mit (schwarze Linie) 60µg/ml Caspofungin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 1mM AC (Peter et al., 2016a).

(C) Arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (n=8) der Annexin V Bindung der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C in Ringerlösung ohne (weißer Balken) und mit Zusatz (schwarze Balken) von 60µg/ml Caspofungin in der Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 1mM AC. ***($p < 0,001$) bedeutet einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Ansätzen ohne Caspofungin (ANOVA) (Peter et al., 2016a).

4. Diskussion

Die Echinocandine sind bekannt für ihr Potenzial, Anämien auszulösen (Aguilar-Zapata et al., 2015). Nach Behandlung humaner Erythrozyten mit einer Anidulafungin Konzentration von 6µg/ml waren typische Zeichen der Eryptose zu sehen wie eine Translokation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, eine Abnahme des Zellvolumens sowie eine Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration (Peter et al., 2016b).

Bei Behandlung der Erythrozyten mit Caspofungin in einer maximalen Konzentration von 60µg/ml konnte ebenfalls eine Schrumpfung der Zellen und eine Externalisation von Phosphatidylserin gemessen werden, allerdings keine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration (Peter et al., 2016a).

Das bei beiden Medikamenten externalisierte Phosphatidylserin dient als Marker für die Makrophagen, die die Erythrozyten abbauen. (Peter et al., 2016b)

Die verwendeten Konzentrationen von Anidulafungin und Caspofungin bei der Inkubation der Erythrozyten liegen in dem Bereich, der bei Behandlungen in vivo gemessen wird. (Liu et al., 2013, Wurthwein et al., 2013)

Wie oben angesprochen geht die Schrumpfung der Zellen beim Anidulafungin wahrscheinlich zurück auf die durch Calcium aktivierten Kationenkanäle, durch die die Zelle Kalium verliert. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle, zu einem Chloridverlust, osmotisch bedingt folgt Wasser nach und die Zelle schrumpft (Föller et al., 2008, Lang et al., 2008). Dafür spricht auch die Tatsache, dass bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration sowohl der Forward Scatter wieder ansteigt und die Hämolyse rückläufig ist (Peter et al., 2016b).

Da es bei Caspofungin nicht zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration kommt (Peter et al., 2016a), muss hier dem Volumenverlust eventuell ein anderer Mechanismus zugrunde liegen.

Obwohl Anidulafungin und Caspofungin typische Zeichen einer Eryptose zeigen, lösen beide Substanzen eine Hämolyse aus (Peter et al., 2016b, Peter et al., 2016a) In der Literatur findet sich auch eine milde Hämolyse als Nebenwirkung

einer Therapie mit Echinocandinen (Denning, 2003). Man könnte vermuten, dass die Zellschädigung derart stark vorstättengeht, dass die Eryptose nicht schnell genug ablaufen kann, um eine Hämolyse noch zu verhindern. Bei der Hämolyse wird durch Ruptur der Zellmembran Hämoglobin in den Blutkreislauf freigesetzt und kann im schlimmsten Fall die renalen Tubuli verstopfen (Lang et al., 2015).

Da bei Anidulafungin durch extrazellulären Calciumentzug die Eryptose leicht verringert, aber nicht beseitigt wird, muss ein weiterer Mechanismus angenommen werden. (Peter et al., 2016b) Dazu wurden weitere Messungen durchgeführt, u.a. mit den Stoffen SB203580 und Nitroprussid. Durch Zugabe dieser Stoffe bei der Inkubation der Erythrozyten mit Anidulafungin konnte für SB203580 und Nitroprussid jeweils ein inhibitorischer Effekt auf die Eryptose gemessen werden. (Peter et al., 2016b)

Für die durch SB203580 gehemmte Kinase p38 konnte von Gatidis et al. gezeigt werden, dass sie in Erythrozyten exprimiert wird und durch hyperosmotischen Schock aktiviert wird. Hemmt man diese Kinase, wird die Eryptose ebenfalls gemindert. (Gatidis et al., 2011). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass diese Kinase auch bei der durch Anidulafungin ausgelösten Eryptose eine Rolle spielt (Peter et al., 2016b).

Auch der NO Donor Nitroprussid greift in die durch Anidulafungin ausgelöste Eryptose inhibitorisch ein. (Peter et al., 2016b)

Wie Nicolay et al. zeigen konnten, wirkt Nitroprussid zumindest teilweise über cGMP und durch Nitrosylierung von Enzymen, die verantwortlich für die Phosphatidylserinexposition an die Außenseite der Erythrozytenmembran sind. (Nicolay et al., 2008a)

Da bei Inkubation mit Caspofungin keine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration festgestellt werden konnte, wurden weitere Signalwege in Betracht gezogen und weitere Wirkstoffe getestet. (Peter et al., 2016a)

Mit D4476 konnte hier ebenfalls ein inhibitorischer Effekt auf die Eryptose ausgelöst durch Caspofungin festgestellt werden. (Peter et al., 2016a)

Für die durch D4476 inhibierte Proteinkinase casein kinase 1 konnte von Zelenak et al. gezeigt werden, dass sie in Erythrozyten exprimiert wird. Sie ist dafür bekannt, die Anordnung von Proteinen des Zytoskeletts zu beeinflussen. Die membrangebundene Form der CK1 phosphoryliert das beta-Spektrin und vermindert so die mechanische Stabilität der Zellmembran. Eine Hemmung der CK1 durch D4476 konnte die durch Glucoseentzug und oxidativen Stress ausgelöste Eryptose vermindern (Zelenak et al., 2012).

Es lässt sich schlussfolgern, dass eine durch Anidulafungin oder Caspofungin bedingte Anämie zumindest teilweise durch Eryptose bedingt ist. Eventuell könnte ein Aufschlüsseln der Signalwege eine gezielte Behandlung der durch Eryptose bedingten Anämie ermöglichen.

Oder die Echinocandine könnten zur Therapie der Malaria verwendet werden, da hier – wie bei der Sichelzellanämie, die an sich protektiv wirkt – eine erhöhte Rate an Eryptose therapeutisch genutzt werden könnte.

5. Zusammenfassung

Die Echinocandine Anidulafungin und Caspofungin werden zur Behandlung der invasiven Candidiasis und der invasiven Aspergillose eingesetzt.

Die Eryptose zeichnet sich vor allem aus durch eine Externalisation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, eine Zellschrumpfung und eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration.

In dieser Studie wurde untersucht, ob die klinisch messbare Anämie, die unter Therapie mit Echinocandinen auftreten kann, durch Eryptose bedingt ist. Hierzu wurde durchflusszytometrisch das Volumen der Zellen, die Expression von Phosphatidylserin durch Bindung von Annexin V und die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Zugabe von Fluo-3 gemessen. Die Hämolyse wurde fotometrisch durch Messung des freien Hämoglobins bestimmt.

Zusätzlich wurden weitere Signalwege der Eryptose durch Zugabe von möglichen Inhibitoren wie z.B. SB203580, Nitroprussid, D4476, Staurosporin, z-VAD und Acetylcystein überprüft.

Weiterhin wurden zusätzliche Messungen durchgeführt, um eine Beteiligung von Ceramid und reaktiver Sauerstoffspezies an der durch Anidulafungin und Caspofungin ausgelösten Eryptose nachzuweisen.

Nach einer Inkubationszeit von 48h mit Anidulafungin konnte eine Volumenminderung und eine erhöhte Annexin V Bindung an die Zelloberfläche gemessen werden. Die zytosolische Calciumkonzentration blieb unverändert. Zudem konnte durch Zugabe von SB203580 und Nitroprussid eine Hemmung auf die Eryptose festgestellt werden, gemessen an der Bindung von Annexin V an die Erythrozytenoberfläche.

Nach einer Inkubationszeit von 48h mit Caspofungin konnte ebenfalls eine Volumenminderung und eine erhöhte Annexin V Bindung an die Zelloberfläche gemessen werden. Allerdings zeigte sich hier auch eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration. Weiterhin konnte mit D4476 eine Hemmung der durch Caspofungin ausgelösten Eryptose beobachtet werden.

Außerdem konnte auch eine deutliche Hämolyse nach 48-stündiger Inkubation mit beiden Stoffen gemessen werden.

Somit ist die klinisch beobachtbare Anämie nicht nur durch eine Eryptose bedingt, sondern auch durch Hämolyse.

Durch Aufdeckung von Signalwegen lassen sich möglicherweise Medikamente entwickeln, die die als Nebenwirkung einer Therapie mit Echinocandinen auftretende Anämie mindern können.

6. Liste der Veröffentlichungen

- PETER, T., BISSINGER, R. & LANG, F. 2016a. Stimulation of Eryptosis by Caspofungin. *Cell Physiol Biochem*, 39, 939-49.
(erschienen bei S. Karger AG, Basel)
- PETER, T., BISSINGER, R., LIU, G. & LANG, F. 2016b. Anidulafungin-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*, 38, 2272-84.
(erschienen bei S. Karger AG, Basel)

7. Literaturverzeichnis

- AGUILAR-ZAPATA, D., PETRAITIENE, R. & PETRAITIS, V. 2015. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. *Clin Infect Dis*, 61 Suppl 6, S604-11.
- AL MAMUN BHUYAN, A., BISSINGER, R., CAO, H. & LANG, F. 2017a. Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Exemestane. *Cell Physiol Biochem*, 42, 1-12.
- AL MAMUN BHUYAN, A., NUSSLE, S., CAO, H., ZHANG, S. & LANG, F. 2017b. Simvastatin, a Novel Stimulator of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*, 43, 492-506.
- AL MAMUN BHUYAN, A., SIGNORETTO, E., BISSINGER, R. & LANG, F. 2016. Enhanced Eryptosis Following Exposure to Dolutegravir. *Cell Physiol Biochem*, 39, 639-50.
- ALFREY, C. P. & FISHBANE, S. 2007. Implications of neocytolysis for optimal management of anaemia in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract*, 106, c149-56.
- ARASTÉH, K., BAENKLER, H. W., BIEBER, C., BRANDT, R. & CHATTERJEE, T. T. 2012. *Duale Reihe Innere Medizin*, Thieme.
- BIRKA, C., LANG, P. A., KEMPE, D. S., HOEFLING, L., TANNEUR, V., DURANTON, C., NAMMI, S., HENKE, G., MYSSINA, S., KRIKOV, M., HUBER, S. M., WIEDER, T. & LANG, F. 2004. Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch*, 448, 471-7.
- BOSMAN, G. J., WILLEKENS, F. L. & WERRE, J. M. 2005. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem*, 16, 1-8.
- BRACCI, R., PERRONE, S. & BUONOCORE, G. 2002. Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. *Acta Paediatr Suppl*, 91, 130-4.
- BROWNING, J. A., ELLORY, J. C. & GIBSON, J. S. 2006. Pathophysiology of red cell volume. *Contrib Nephrol*, 152, 241-68.
- BURGER, P., DE KORTE, D., VAN DEN BERG, T. K. & VAN BRUGGEN, R. 2012. CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance - the Dutch Point of View. *Transfus Med Hemother*, 39, 348-52.
- COMMONS WIKIMEDIA. *Anidulafungin Chemische Struktur* [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Anidulafungin#/media/File:Anidulafungin_structure.svg [Accessed 04.10.2019].
- COMMONS WIKIMEDIA. *Caspofungin Chemische Struktur* [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Caspofungin#/media/File:Caspofungin_chemical_structure.png [Accessed 04.10.2019].
- DAUGAS, E., CANDE, C. & KROEMER, G. 2001. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*, 8, 1131-3.
- DENNING, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362, 1142-51.
- DIEZ-SILVA, M., DAO, M., HAN, J., LIM, C. T. & SURESH, S. 2010. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull*, 35, 382-388.

- DURANTON, C., HUBER, S. M. & LANG, F. 2002. Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*, 539, 847-55.
- DZIERZAK, E. & PHILIPSEN, S. 2013. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, a011601.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- FACHINFO, A. *Anidulafungin Fachinfo* [Online].
 . Available:
https://www.pfizermed.de/fileadmin/produkt Datenbank/pdf/010608_freiga be.pdf [Accessed 18.05.2019].
- FACHINFO, C. *Caspofungin Fachinfo* [Online]. Available:
<https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/cancidas.pdf> [Accessed 18.05.2019].
- FAHLKE, C. 2008. *Taschenatlas Physiologie: mit 26 Tabellen*, Elsevier, Urban & Fischer.
- FÖLLER, M., HUBER, S. M. & LANG, F. 2008. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60, 661-8.
- FORD, J. 2013. Red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol*, 35, 351-7.
- FRAME, T., CARROLL, T., KORCHAGINA, E., BOVIN, N. & HENRY, S. 2007. Synthetic glycolipid modification of red blood cell membranes. *Transfusion*, 47, 876-82.
- GATIDIS, S., ZELENAK, C., FAJOL, A., LANG, E., JILANI, K., MICHAEL, D., QADRI, S. M. & LANG, F. 2011. p38 MAPK Activation and Function following Osmotic Shock of Erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28, 1279-1286.
- GIVAN, A. L. 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 699, 1-29.
- HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Berlin Heidelberg.
- HERMLE, T., SHUMILINA, E., ATTANASIO, P., AKEL, A., KEMPE, D. S., LANG, P. A., PODOLSKI, M., GATZ, S., BACHMANN, R., BACHMANN, C., ABELE, H., HUBER, S., WIEDER, T. & LANG, F. 2006. Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C710-7.
- HEROLD, G. 2016. *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*.
- HORN, F. 2012. *Biochemie des Menschen*, Stuttgart, Thieme.
- HUBER, S. M., GAMPER, N. & LANG, F. 2001. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch*, 441, 551-8.
- ICHIM, G. & TAIT, S. W. G. 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16, 539-548.
- JENSEN, F. B. 2004. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand*, 182, 215-27.

- JONES, C. M., BAKER-GROBERG, S. M., CIANCHETTI, F. A., GLYNN, J. J., HEALY, L. D., LAM, W. Y., NELSON, J. W., PARRISH, D. C., PHILLIPS, K. G., SCOTT-DRECHSEL, D. E., TAGGE, I. J., ZELAYA, J. E., HINDS, M. T. & MCCARTY, O. J. 2014. Measurement science in the circulatory system. *Cell Mol Bioeng*, 7, 1-14.
- KEMPE, D. S., LANG, P. A., DURANTON, C., AKEL, A., LANG, K. S., HUBER, S. M., WIEDER, T. & LANG, F. 2006. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *Faseb j*, 20, 368-70.
- KIM, H. E., DU, F., FANG, M. & WANG, X. 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17545-50.
- KLARL, B. A., LANG, P. A., KEMPE, D. S., NIEMOELLER, O. M., AKEL, A., SOBIESIAK, M., EISELE, K., PODOLSKI, M., HUBER, S. M., WIEDER, T. & LANG, F. 2006. Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290, C244-53.
- LANG, E., BISSINGER, R., GULBINS, E. & LANG, F. 2015. Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Apoptosis*, 20, 758-67.
- LANG, E. & LANG, F. 2015a. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol*, 39, 35-42.
- LANG, E. & LANG, F. 2015b. Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int*, 2015, 513518.
- LANG, E., QADRI, S. M. & LANG, F. 2012a. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1236-43.
- LANG, F., ABED, M., LANG, E. & FÖLLER, M. 2014. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal*, 21, 138-53.
- LANG, F., BIRKA, C., MYSSINA, S., LANG, K. S., LANG, P. A., TANNEUR, V., DURANTON, C., WIEDER, T. & HUBER, S. M. 2004a. Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 559, 211-7.
- LANG, F., GULBINS, E., LANG, P. A., ZAPPULLA, D. & FÖLLER, M. 2010. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 26, 21-8.
- LANG, F., GULBINS, E., LERCHE, H., HUBER, S. M., KEMPE, D. S. & FÖLLER, M. 2008. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem*, 22, 373-80.
- LANG, F., LANG, E. & FÖLLER, M. 2012b. Physiology and pathophysiology of eryptosis. *Transfus Med Hemother*, 39, 308-14.
- LANG, F., LANG, K. S., LANG, P. A., HUBER, S. M. & WIEDER, T. 2006a. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1183-92.
- LANG, F., LANG, P. A., LANG, K. S., BRAND, V., TANNEUR, V., DURANTON, C., WIEDER, T. & HUBER, S. M. 2004b. Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria. *Pflugers Arch*, 448, 319-24.

- LANG, K. S., DURANTON, C., POEHLMANN, H., MYSSINA, S., BAUER, C., LANG, F., WIEDER, T. & HUBER, S. M. 2003a. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 10, 249-56.
- LANG, K. S., MYSSINA, S., LANG, P. A., TANNEUR, V., KEMPE, D. S., MACK, A. F., HUBER, S. M., WIEDER, T., LANG, F. & DURANTON, C. 2004c. Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286, F1046-53.
- LANG, K. S., MYSSINA, S., TANNEUR, V., WIEDER, T., HUBER, S. M., LANG, F. & DURANTON, C. 2003b. Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367, 391-6.
- LANG, K. S., ROLL, B., MYSSINA, S., SCHITTENHELM, M., SCHEEL-WALTER, H. G., KANZ, L., FRITZ, J., LANG, F., HUBER, S. M. & WIEDER, T. 2002. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem*, 12, 365-72.
- LANG, P. A., BERINGER, O., NICOLAY, J. P., AMON, O., KEMPE, D. S., HERMLE, T., ATTANASIO, P., AKEL, A., SCHAFER, R., FRIEDRICH, B., RISLER, T., BAUR, M., OLBRICHT, C. J., ZIMMERHACKL, L. B., ZIPFEL, P. F., WIEDER, T. & LANG, F. 2006b. Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 84, 378-88.
- LANG, P. A., KAISER, S., MYSSINA, S., BIRKA, C., WEINSTOCK, C., NORTHOFF, H., WIEDER, T., LANG, F. & HUBER, S. M. 2004d. Effect of *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin on human erythrocytes. *Cell Microbiol*, 6, 391-400.
- LANG, P. A., KAISER, S., MYSSINA, S., WIEDER, T., LANG, F. & HUBER, S. M. 2003c. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285, C1553-60.
- LANG, P. A., KEMPE, D. S., MYSSINA, S., TANNEUR, V., BIRKA, C., LAUFER, S., LANG, F., WIEDER, T. & HUBER, S. M. 2005a. PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*, 12, 415-28.
- LANG, P. A., KEMPE, D. S., TANNEUR, V., EISELE, K., KLARL, B. A., MYSSINA, S., JENDROSSEK, V., ISHII, S., SHIMIZU, T., WAIDMANN, M., HESSLER, G., HUBER, S. M., LANG, F. & WIEDER, T. 2005b. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*, 118, 1233-43.
- LIU, P., RUHNKE, M., MEERSSEMAN, W., PAIVA, J. A., KANTECKI, M. & DAMLE, B. 2013. Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 1672-6.
- LOKEN, M. R., SHAH, V. O., DATTILIO, K. L. & CIVIN, C. I. 1987. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood*, 69, 255-63.
- MARENGO-ROWE, A. J. 2006. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 19, 239-45.

- MYSSINA, S., LANG, P. A., KEMPE, D. S., KAISER, S., HUBER, S. M., WIEDER, T. & LANG, F. 2004. Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca(2+)-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem*, 14, 241-8.
- NICOLAY, J. P., LIEBIG, G., NIEMOELLER, O. M., KOKA, S., GHASHGHAEGINIA, M., WIEDER, T., HAENDELER, J., BUSSE, R. & LANG, F. 2008a. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch*, 456, 293-305.
- NICOLAY, J. P., LIEBIG, G., NIEMOELLER, O. M., KOKA, S., GHASHGHAEGINIA, M., WIEDER, T., HAENDELER, J., BUSSE, R. & LANG, F. 2008b. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 456, 293-305.
- PAREDES, R. M., ETZLER, J. C., WATTS, L. T., ZHENG, W. & LECHLEITER, J. D. 2008. Chemical calcium indicators. *Methods*, 46, 143-51.
- PATIL, A. & MAJUMDAR, S. 2017. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol*, 69, 1635-1660.
- PEARSON, H. A. 1967. Life-span of the fetal red blood cell. *J Pediatr*, 70, 166-71.
- PETER, T., BISSINGER, R. & LANG, F. 2016a. Stimulation of Eryptosis by Caspofungin. *Cell Physiol Biochem*, 39, 939-49.
(erschienen bei S. Karger AG, Basel)
- PETER, T., BISSINGER, R., LIU, G. & LANG, F. 2016b. Anidulafungin-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*, 38, 2272-84.
(erschienen bei S. Karger AG, Basel)
- POMPEO, G., GIRASOLE, M., CRICENTI, A., BOUMIS, G., BELLELLI, A. & AMICONI, S. 2010. Erythrocyte death in vitro induced by starvation in the absence of Ca(2+). *Biochim Biophys Acta*, 1798, 1047-55.
- PÜSCHEL, G., KÜHN, H., KIETZMANN, T., HÖHNE, W., CHRIST, B., DOENECKE, D. & KOOLMAN, J. 2011. *Taschenlehrbuch Biochemie*, Thieme.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2012. *Biochemie: 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]*, Stuttgart, Thieme.
- REPSOLD, L. & JOUBERT, A. M. 2018. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *Biomed Res Int*, 2018, 9405617.
- SAKURADA, K., KITANAKA, C., KOKUBU, A., TOMIYAMA, A., SUNAYAMA, J., KAYAMA, T. & KUCHINO, Y. 2002. A cellular mechanism that reversibly inactivates pancaspase inhibitor zAsp-CH(2)-DCB: a potential pitfall causing discrepancy between in vitro and in vivo caspase assays. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 1022-30.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. 2010. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, Springer Berlin Heidelberg.
- SHARKIS, S. J. 1984. The role of the thymus in erythropoiesis. *Blood Cells*, 10, 223-31.
- SILBERNAGL, S. & LANG, F. 2013. *Taschenatlas der Pathophysiologie*, Thieme.

- 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, 171-81.
- TZUR, A., MOORE, J. K., JORGENSEN, P., SHAPIRO, H. M. & KIRSCHNER, M. W. 2011. Optimizing optical flow cytometry for cell volume-based sorting and analysis. *PLoS One*, 6, e16053.
- WIEDER, T., LANG, P. A., LANG, K. S., KEMPE, D. S., NIEMOELLER, O. M., DURANTON, C., GULBINS, E., HUBER, S. M. & LANG, F. 2006. *Studying Mechanisms of Eryptosis*, Cytotechnology. 2005 Oct;49(2-3):117-32. doi: 10.1007/s10616-006-6335-5. Epub 2006 Jun 12.
- WROBEL, A., BOBROWSKA-HAGERSTRAND, M., LINDQVIST, C. & HAGERSTRAND, H. 2014. Monitoring of membrane phospholipid scrambling in human erythrocytes and K562 cells with FM1-43 - a comparison with annexin V-FITC. *Cell Mol Biol Lett*, 19, 262-76.
- WURTHWEIN, G., CORNELLY, O. A., TRAME, M. N., VEHRESCHILD, J. J., VEHRESCHILD, M. J., FAROWSKI, F., MULLER, C., BOOS, J., HEMPEL, G., HALLEK, M. & GROLL, A. H. 2013. Population pharmacokinetics of escalating doses of caspofungin in a phase II study of patients with invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 1664-71.
- YAZDANBAKHSH, K., LOMAS-FRANCIS, C. & REID, M. E. 2000. Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane. *Transfus Med Rev*, 14, 364-74.
- ZELENAK, C., EBERHARD, M., JILANI, K., QADRI, S. M., MACEK, B. & LANG, F. 2012. Protein kinase CK1alpha regulates erythrocyte survival. *Cell Physiol Biochem*, 29, 171-80.
- ZHANG, Y., SHANG, X., LAI, S., ZHANG, G., LIANG, Y. & WEN, T. 2012. Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 78, 5831-8.

8. Eigenanteilerklärung

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

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

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch das Labormitglied Rosi Bissinger von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Rosi Bissinger durch mich.

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

Pforzheim, 26.11.2019

9. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Florian Lang bedanken. Danke auch an mein Labormitglied Rosi Bissinger, die mich eingearbeitet hat und immer ein offenes Ohr bei aufkommenden Fragen hatte.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mich in all der Zeit immer unterstützt haben.