

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

Neue Regulatoren der Eryptose

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

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

vorgelegt von

Fink, Madeline

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Ullrich

Tag der Disputation: 22.06.2021

*In tiefster Liebe und Dankbarkeit
meinem Papa*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Erythrozyten.....	3
1.1.1 Erythrozytenentstehung	3
1.1.2 Erythrozytenmorphologie.....	4
1.1.3 Erythrozytenanzahl	5
1.1.4 Erythrozytenfunktion	5
1.1.5 Erythrozytenlebensdauer	6
1.2 Apoptose.....	9
1.2.1 Definition der Apoptose.....	10
1.2.2 Morphologische Charakteristika der Apoptose.....	10
1.2.3 Molekularer Ablauf der Apoptose.....	12
1.2.4 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Apoptose ..	17
1.3 Eryptose.....	19
1.3.1 Definition der Eryptose.....	19
1.3.2 Trigger der Eryptose	20
1.3.3 Signalwege der Eryptose	20
1.3.4 Entfernung der eryptotischen Zellen aus der Zirkulation	28
1.3.5 Inhibitoren der Eryptose.....	28
1.3.6 Physiologische Bedeutung der Eryptose	31
1.3.7 Pathophysiologische Bedeutung der Eryptose.....	33
1.4 Testsubstanzen.....	37
1.4.1 Costunolid	37
1.4.2 Phenoxodiol	40
1.4.3 Raloxifen	44
1.4.4 Taurolidin	48
1.5 Zielsetzung der Dissertation	51
2 Materialien und Methoden.....	53
2.1 Erythrozyten.....	53
2.2 Lösungen	54
2.2.1 Ringer-Lösung	54
2.2.2 Kalzium-freie Ringer-Lösung.....	55
2.2.3 Annexin-Waschpuffer.....	55
2.2.4 PBS-BSA-Lösung	56
2.3 Substanzen.....	57
2.3.1 Costunolid	57
2.3.2 Phenoxodiol	57
2.3.3 Raloxifen	57

2.3.4	Taurolidin	58
2.3.5	Annexin V-FITC	58
2.3.6	Fluo-3-AM	59
2.3.7	DCFDA.....	59
2.3.8	Antikörper zur Bestimmung der Ceramidhäufigkeit.....	60
2.3.9	DMSO	60
2.4	Durchflusszytometrie	61
2.5	Versuchsaufbau	61
2.5.1	Durchflusszytometrische Analyse	63
2.5.2	Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC	65
2.5.3	Zellgröße - Forward Scatter	66
2.5.4	Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM	66
2.5.5	Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC	66
2.5.6	Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA	67
2.5.7	Ceramidhäufigkeit - Primär- und Sekundärantikörper	67
2.5.8	Statistik	68
3	Ergebnisse	69
3.1	Einfluss von Costunolid auf die Eryptose	69
3.1.1	Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC	69
3.1.2	Zellgröße - Forward Scatter	70
3.1.3	Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM	72
3.1.4	Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC	73
3.1.5	Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA	74
3.1.6	Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper	75
3.2	Einfluss von Phenoxodiol auf die Eryptose	76
3.2.1	Phosphatidylserinexposition – Annexin V-FITC	77
3.2.2	Zellgröße - Forward Scatter	78
3.2.3	Intrazelluläre Kalziumkonzentration - Fluo-3-AM	79
3.2.4	Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC	80
3.2.5	Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA	82
3.2.6	Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper	83
3.3	Einfluss von Raloxifen auf die Eryptose	84
3.3.1	Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC	85
3.3.2	Zellgröße - Forward Scatter	86
3.3.3	Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM	87
3.3.4	Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC	88
3.3.5	Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA	90
3.3.6	Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper	91
3.4	Einfluss von Taurolidin auf die Eryptose	92
3.4.1	Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC	92
3.4.2	Zellgröße - Forward Scatter	93
3.4.3	Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM	95
3.4.4	Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC	96
3.4.5	Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA	98

3.4.6 Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper	99
4 Diskussion.....	100
5 Zusammenfassung	117
Literaturverzeichnis	119
Erklärung zum Eigenanteil	137
Veröffentlichungen.....	139
Danksagungen.....	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Charakteristika der Apoptose	11
Abbildung 2: Extrinsischer Signalweg	14
Abbildung 3: Intrinsischer Signalweg.....	16
Abbildung 4: Aktivierung des Enzyms Phospholipid-Scramblase und Hemmung des Enzyms Phospholipid-Translokase	23
Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der eryptotischen Zellschrumpfung	24
Abbildung 6: Chemische Struktur des Sesquiterpenlactons Costunolid	38
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Reaktion von Costunolid mit Reaktionspartnern	38
Abbildung 8: Chemische Struktur des Isoflavons Phenoxodiol	41
Abbildung 9: Molekulare Wirkweise des Isoflavons Phenoxodiol	43
Abbildung 10: Chemische Struktur des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators Raloxifen.....	45
Abbildung 11: Chemische Struktur des Taurinderivates Taurolidin	48
Abbildung 12: Effekt von Costunolid auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten.....	70
Abbildung 13: Effekt von Costunolid auf die Zellgröße der Erythrozyten.....	71
Abbildung 14: Effekt von Costunolid auf die zytosolischen Kalziumionen	72
Abbildung 15: Kalziumsensitivität der Costunolid-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	74
Abbildung 16: Einfluss von Costunolid auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten.....	75
Abbildung 17: Effekt von Costunolid auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche	76
Abbildung 18: Effekt von Phenoxodiol auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten.....	78
Abbildung 19: Effekt von Phenoxodiol auf die Zellgröße der Erythrozyten.....	79
Abbildung 20: Effekt von Phenoxodiol auf die zytosolischen Kalziumionen	80
Abbildung 21: Kalziumsensitivität der Phenoxodiol-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	82
Abbildung 22: Einfluss von Phenoxodiol auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten.....	83
Abbildung 23: Effekt von Phenoxodiol auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche	84

Abbildung 24: Effekt von Raloxifen auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten.....	85
Abbildung 25: Effekt von Raloxifen auf die Zellgröße der Erythrozyten.....	86
Abbildung 26: Effekt von Raloxifen auf die zytosolischen Kalziumionen	88
Abbildung 27: Kalziumsensitivität der Raloxifen-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	89
Abbildung 28: Einfluss von Raloxifen auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten.....	91
Abbildung 29: Effekt von Raloxifen auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche	92
Abbildung 30: Effekt von Taurolidin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten.....	93
Abbildung 31: Effekt von Taurolidin auf die Zellgröße der Erythrozyten.....	94
Abbildung 32: Effekt von Taurolidin auf die zytosolischen Kalziumionen	96
Abbildung 33: Kalziumsensitivität der Taurolidin-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	97
Abbildung 34: Einfluss von Taurolidin auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten.....	98
Abbildung 35: Effekt von Taurolidin auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberflächen	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exogene Xenobiotika und endogene Moleküle mit Funktion als Eryptosetrigger	20
Tabelle 2: Pharmakologische Hemmstoffe der Eryptose.....	30
Tabelle 3: Zytostatika mit fördernder Wirkung auf die Eryptoseauslösung.....	37
Tabelle 4: Zusammensetzung der Ringer-Lösung.....	54
Tabelle 5: Zusammensetzung der Kalzium-freien Ringer-Lösung.....	55
Tabelle 6: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers	56
Tabelle 7: Zusammensetzung der PBS-BSA-Lösung.....	56

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis inducing factor
AKT	Proteinkinase B
AM	Acetoxymethylester
ANOVA	Analysis of Variance, einfaktorielle Varianzanalyse
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BH3	Bcl-2 homology domain 3
Bid	BH3 interacting domain agonist
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CARD	Caspase recrutement domain
CdK	Cyclin-dependent Kinase
CdK2	Cyclin-dependent Kinase 2
C _{max}	Maximale Plasmakonzentration
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered Saline
DR	Death receptor
E-Cadherin	Epithelial Cadherin
EPO	Erythropoietin
FADD	Fas-associating death domain-containing protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
FLICE	FADD-like interleukin-1-converting enzyme; Caspase-8
FLIP	FLICE inhibitory Protein
FSC	Forward-Scatter
g	Gramm
G1-Phase	Gap-1-Phase des Zellzyklus
GSH	Glutathion
H ₂ O	Wasser
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IAP	Inhibitors of apoptosis; Apoptoseinhibitoren
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-17	Interleukin-17
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
LDL	Low-Density-Lipoprotein
M	Molar
M1	Marker
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MCV	Mean Corpuscular Volume
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
n	Anzahl
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSC	Nicht-selektiver Kationenkanal
p	Wahrscheinlichkeit
PAF	Platelet Activating Factor, Plättchenaktivierender Faktor
PBS-BSA-Lösung	Phosphate buffered Saline-Bovine Serum Albumin-Lösung
PGE	Prostaglandin E
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RCF	Relative Centrifugal Force
ROS	reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies
RPM	Revolutions per Minute
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SERM	selective estrogen receptor modulator
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SSC	Side-Scatter; Seitwärtsstreulicht
tBid	truncated BH3-interacting domain agonis; truncated Bid

TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β
TNF- α	Tumor-Necrosis-Factor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

Das Blut stellt ein funktionell bedeutsames Organ dar und verbindet sämtliche weitere Organe innerhalb eines Organismus miteinander [39] [166]. Zugleich ist jene Körperflüssigkeit Ausgangspunkt vieler und epidemiologisch relevanter Erkrankungen [164] [251]: Sowohl die Anämie, von welcher weltweit etwa jeder vierte Mensch betroffen ist, als auch hämatologische Neoplasien, von welchen Untergruppen zu den zehn häufigsten Krebsarten in Europa zählen, nehmen ihren Ursprung in den Blutzellen [164] [251]. Ebenso werden Gerinnungsstörungen und deren Folgen wie Thrombosen oder Embolien durch ein Ungleichgewicht der Zusammensetzung sowie durch funktionelle Störungen des Blutes bedingt [164] [251] [330]. Auch genetische Blutkrankheiten wie die Sichelzellanämie oder die Thalassämien und infektiöse Erkrankungen wie etwa die Malaria betreffen eine Vielzahl an Menschen [112] [164] [200].

Um die Funktionalität des Blutes über die gesamte Lebensspanne eines Organismus aufrecht zu erhalten, durchlaufen die Blutzellen als wichtige Komponente des Blutes beständig eine Abfolge von Proliferation, Differenzierung, eventuellen Reparaturvorgängen und letztlich ihrer Entfernung aus der Zirkulation [97] [166]. Dabei gilt die „Apoptose“, also der programmierte Tod Organellen-haltiger Zellen, als ein bedeutender Mechanismus der Zellausscheidung [97] [187]. Erforscht wurde diese Art des Zellsterbens initial von Kerr et al., welche ihre Entdeckungen im Jahre 1972 veröffentlichten [187]. Rasch wurde ausgemacht, dass das Vorhandensein von Zellorganellen, insbesondere der Zellkerne und der Mitochondrien, als wesentliche Voraussetzung für den Ablauf der Apoptose gilt [138] [140] [225] [263].

Den ausgereiften roten Blutkörperchen als Hauptanteil des korpuskulären Blutes mangelt es in Folge ihrer ausgeprägten Differenzierung sowohl an Zellkernen als auch an Mitochondrien [47] [166]. Über eine lange Zeitspanne hinweg wurde jenen Zellen vor diesem Hintergrund die Fähigkeit zu einem programmierten,

suizidalen Sterbeprozess abgesprochen [50] [84] [224] und die alleinige, geregelte Aussonderung defekter oder gealterter Erythrozyten der Leber und der Milz zugeschrieben [45] [378]. Entgegen dieser Ansicht zeigten Bratosin et al., Berg et al. sowie Daugas et al. in ihren Veröffentlichungen im Jahr 2001 allerdings, dass auch die roten Blutkörperchen eine der Apoptose morphologisch ähnliche Reaktion in Folge einer Inkubation mit den Kalziumionophoren Calcimycin oder Ionomycin durchlaufen [31] [50] [84]. Die zuvor genannten Xenobiotika bewirken eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den behandelten Erythrozyten [50] [224], aus welcher sowohl (1) die Schrumpfung der letzteren Zellen, als auch (2) das Membranblebbing, also eine Ausstülpung und Bläschenbildung von Anteilen der Zellmembran, sowie (3) die Phosphatidylserinexposition auf der erythrozytären Membranoberfläche resultieren [50] [84] [224]. Da diese drei morphologischen Merkmale im Wesentlichen ebenso bei der Apoptose Kern- und Mitochondrien-haltiger Zellen als kennzeichnend gelten [31] [50] [84], wurde alsdann der gesteuerte, suizidale Zelltod der roten Blutkörperchen anerkannt [50] [84]. Weiterhin zeigten die damaligen Versuche das erythrozytäre, wenn auch inaktive, Vorhandensein der „Initiatorcaspase-8“ und der „Effektorcaspase-3“ bei gleichzeitigem Fehlen weiterer wichtiger Apoptosemediatoren wie dem „Cytochrom C“, dem „APAF-1“ (Apoptotic Protease Activating Factor 1) und der „Caspase-9“ auf [31] [50].

Die Entdeckung dieses suizidalen Erythrozytentodes erlangte nachfolgend ein bedeutendes Interesse innerhalb der Forschung und wurde seither sowohl bezüglich der beteiligten molekularen Mechanismen und Modulatoren, als auch hinsichtlich der klinischen Relevanz eingehend untersucht [223] [225]. Zur eindeutigen Abgrenzung des Organellen-unabhängigen, suizidalen Sterbens der Erythrozyten führten Lang et al. im Jahr 2005 schließlich den Begriff der „Eryptose“ ein und stellten diesen somit der Zellkern- und Mitochondrien-abhängigen Apoptose gegenüber [225]. Mittlerweile wurden mehrere grundlegende Signalwege der Eryptose definiert [223] [225], eine Vielzahl an Stimulatoren und Inhibitoren des programmierten Erythrozytentodes festgelegt [212] und Verknüpfungen der Eryptose zu Erkrankungen herausgefunden [223]. Aufgrund der denkbaren Möglichkeit einer pharmakologischen Intervention in den

Eryptoseprozess und den daraus resultierenden therapeutischen Aussichten besteht auch weiterhin das dringliche Bestreben, den programmierten erythrozytären Zelltod tiefergehend zu verstehen und weitere Modulatoren, sowohl stimulierend als auch inhibierend, herauszufinden [112] [212].

1.1 Erythrozyten

Der Begriff „Erythrozyt“ entstammt der griechischen Sprache („erythrós“ für rot und „kýtos“ für Höhlung) und bezeichnet das rote Blutkörperchen [166]. Mit dem in ihrem Zellinneren enthaltenen Blutfarbstoff Hämoglobin erhalten diese Zellen nicht nur selbst ihre namensgebende Färbung sondern bewirken auch das charakteristisch rote Erscheinungsbild des gesamten Blutes [166]. Aufgrund ihres auf das Notwendige beschränkten Aufbaus werden die roten Blutkörperchen unter anderem als ein „Sack gefüllt mit Hämoglobin“ betrachtet [47] [84]. Dass die letztere Ansicht über die Erythrozyten diesen Zellen nicht gerecht wird, leitet sich allein aus deren umfassenden Differenzierung sowie deren unabhkömmlichen Funktion innerhalb des Organismus ab [47].

1.1.1 Erythrozytenentstehung

Die Entstehung der roten Blutkörperchen wird als „Erythropoiese“ bezeichnet und findet postpartal hauptsächlich im roten Knochenmark der flachen Knochen und in den Epiphysen des Humerus und des Femurs statt [95] [381] [383]. Die Erythropoiese wird durch einen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes stimuliert [95] [166]. Besteht Sauerstoffmangel in den Geweben, wird das Hormon Erythropoietin (EPO) vermehrt aus der Niere freigesetzt [32] [95] [165] [166]. Das EPO bindet anschließend an Erythropoietinrezeptoren, wirkt auf die erythropoietischen Vorläuferzellen und verhindert dadurch nicht nur deren Apoptose, sondern stimuliert auch die Ausdifferenzierung hin zu Erythrozyten [95] [165] [166] [198]. Die Entstehung der reifen roten Blutkörperchen hat ihren Ursprung in den pluripotenten, hämatopoietischen Stammzellen [95] [383]. Letztere Zellen entwickeln sich unter Zellteilung und Differenzierung über die determinierten

Stammzellen und mehrere Stufen der Kern-haltigen Erythroblasten hin zu den Normoblasten, welche durch die Abscheidung ihrer Zellkerne in die Retikulozyten übergehen [95] [166]. Retikulozyten sind die unmittelbaren Vorläufer der reifen roten Blutkörperchen und können bereits im peripheren Blut gefunden werden [47] [95]. Diese Zellen enthalten noch Organellen und Ribonukleinsäure [47], welche dann innerhalb kurzer Zeit ebenfalls abgegeben werden, so dass die reifen Erythrozyten entstehen [95].

Die reifen roten Blutkörperchen selbst sind Kern- und Organellen-lose Zellen [47] [276]. Sie haben ihre Synthesefähigkeit für Nukleinsäuren, Lipide und Proteine verloren [47] [95] [145]. Folglich können Erythrozyten nicht durch Zellteilung proliferieren [95] [276], sondern bedürfen für ihre zahlenmäßige und funktionelle Aufrechterhaltung der Neubildung mittels Erythropoiese [95] [276].

1.1.2 Erythrozytenmorphe

Die menschlichen Erythrozyten sind kleine, bikonkave und diskoidale Zellen [90] [166]. Ihr regelhafter Durchmesser beträgt etwa 6-8 μm und ihre randständige Dicke misst etwa 2 μm [92] [166]. Ein einzelnes rotes Blutkörperchen hat ein mittleres Zellvolumen (Mean Corpuscular Volume; MCV) von etwa 80-100 fl [166]. Das Zellinnere der ausgereiften Erythrozyten enthält weder einen Zellkern, noch andere Organellen wie beispielsweise Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum oder Golgiapparate [47] [166]. Stattdessen sind die roten Blutkörperchen mit dem Blutfarbstoff Hämoglobin bepackt, so dass das aus dem Fehlen der Zellorganellen hervorgehende Volumen effizient für den Gastransport eingesetzt wird [166]. Ihre Scheibchenform gestattet den Erythrozyten ein optimales Verhältnis zwischen ihrem Volumen und ihrer Zelloberfläche [362]. Funktionell ergibt sich hierdurch eine große Diffusionsfläche bei gleichzeitig geringer Diffusionsstrecke, wodurch der diffusive Gasaustausch in der Lunge und den peripheren Geweben erheblich vereinfacht wird [166] [362]. Rote Blutkörperchen besitzen weiterhin eine hohe mechanische Flexibilität [90]. Die daraus resultierende passive Verformbarkeit ermöglicht es den letzteren Zellen bei ihrer Kreislaufpassage regelmäßig auch solche Kapillaren zu durchqueren,

deren Durchmesser mit bis hinab zu 2-3 μm weit unterhalb der Erythrozytengröße liegt [87] [90] [166] [333] [385].

1.1.3 Erythrozytenanzahl

Mit einem Anteil von etwa 95% an der Blutzellenanzahl sind die Erythrozyten bei Weitem die häufigsten Zellen des Blutes [166]. In gesunden erwachsenen Menschen finden sich zusammengenommen etwa 25×10^{12} Erythrozyten [166]. Frauen haben dabei mit etwa $4 - 5 \times 10^{12}$ Erythrozyten pro Liter Blut einen etwas geringeren Wert als Männer, deren Anzahl bei etwa $5 - 6 \times 10^{12}$ Erythrozyten pro Liter Blut liegt [166]. Insgesamt nehmen die Erythrozyten einen Anteil am gesamten Blutvolumen (Erythrokrit) von etwa 42% bis 47% ein [166].

1.1.4 Erythrozytenfunktion

Den roten Blutkörperchen werden trotz ihres auf das Notwendige beschränkten Aufbaus verschiedene Aufgaben im Organismus zuteil [166]. Als die wichtigste Funktion ist der Gasaustausch zwischen der Lunge und den Geweben zu nennen, aber auch in die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes und des Gefäßtonus sowie in die Bildung von Thromben sind die Erythrozyten involviert [166].

Der Sauerstofftransport von der Lunge hin zu den stoffwechselaktiven Geweben zur Gewährleistung derer regelrechten Versorgung ist die charakteristische und zugleich lebensnotwendige Funktion der roten Blutkörperchen [166]. Durch den differenzierten Aufbau, insbesondere durch ihre Flexibilität [87] [145] [385], sowie den Verlust der Zellorganellen und indes der umfangreichen Beladung mit Hämoglobin, sind die letzteren Zellen bestens an diese Aufgabe angepasst [166]. Das Hämoglobin stellt dabei das zentrale Molekül zur Bindung, zum Transport und schließlich zur Abgabe des Sauerstoffs dar [166] [268].

Neben der Sauerstoffbereitstellung nehmen die Erythrozyten auch eine wichtige Funktion zum einen im Transport von Kohlenstoffdioxid (CO_2) von den metabolisierenden Geweben zurück zur Lunge und zum anderen in der damit verknüpften Regulierung des blutbezogenen pH-Wertes ein [166]. Das

anfallende CO₂ wird im Blut auf drei verschiedene Arten befördert, entweder abhängig von den Erythrozyten als Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) oder gebunden an das Hämoglobin als Carbamino-Hämoglobin oder aber unabhängig von den roten Blutkörperchen gelöst im Blutplasma [166]. Den erythrozytären Transportmechanismen kommt aufgrund ihres Anteils von etwa 95% am gesamten Kohlenstoffdioxidtransport eine hohe Relevanz zu [166].

Durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren nehmen die Erythrozyten ferner Einfluss auf den Gefäßtonus: Wirkt ein erhöhter Scherstress, so sezernieren die roten Blutkörperchen das Molekül Adenosintriphosphat (ATP), welches eine Vasodilatation und dadurch die Reduktion des Scherstress bewirkt [166]. Weiterhin geben die Erythrozyten über ihr desoxygeniertes Hämoglobin Stickoxid sowie Derivate von S-Nitrosothiol in das Blut ab und rufen so eine Vasodilatation hervor [78] [166]. Über diesen Mechanismus vermögen letztere Zellen die Durchblutung zu regulieren und damit das Sauerstoffangebot an den Stoffwechsel der Gewebe anzupassen [118] [166].

Schließlich wirken die roten Blutkörperchen an der Bildung von Thromben mit [166]. Unter physiologischer Blutzusammensetzung zentralisieren sich die Erythrozyten im Blutstrom und bedingen dadurch, dass das Blutplasma sowie die Thrombozyten in die Peripherie ausweichen und gefäßwandnah fließen [166]. Im Falle von Läsionen der Gefäßwand befinden sich die Blutplättchen unmittelbar am Wirkort [166]. Ihre Aktivierung kann rasch erfolgen und die Adhäsion der Thrombozyten in Form eines weißen Thrombus bewirken [166]. Die Kehrseite dieses Mechanismus ergibt sich allerdings, sobald die Erythrozytenanzahl stark erhöht ist, indem eine schadhafte Thrombusbildung begünstigt wird [166].

1.1.5 Erythrozytenlebensdauer

Die durchschnittliche Lebensdauer der menschlichen Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage [63] [128]. Während dieser Zeitspanne altern die roten Blutkörperchen, was schließlich zur Ausmusterung und zum Abbau der entsprechenden Zellen führt und als „Seneszenz“ bezeichnet wird [218] [219]. Dabei ist zu beachten, dass Erythrozyten auch schon vor Erreichen der Seneszenz Beschädigungen

erleiden können [218] [219]. Wegen des Verlustes ihrer Zellorganellen sind die roten Blutkörperchen nicht in der Lage, Defekte zu beheben [14] [47] [145]. Aus diesem Grund bestehen neben der Seneszenz noch zwei weitere Mechanismen zur Aussonderung pathologisch veränderter Erythrozyten, zum einen die Eryptose [219] [225] und zum anderen die „Hämolyse“.

Die Seneszenz als Mechanismus zur Aussonderung regelrecht gealterter Erythrozyten tritt ein, wenn die letzteren Zellen ihre physiologische Lebenszeit überdauern ohne Schadhafte zu erleiden, welche mit der Erfordernis eines verfrühten Zelltodes einhergehen [214] [218]. Dabei unterziehen sich die roten Blutkörperchen im Verlauf ihres Lebens einem Alterungsprozess und sammeln in dessen Rahmen sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen an [45] [88] [166]. Dieses Altern und die damit einhergehenden Verfallserscheinungen sind als Seneszenz charakterisiert und bewirken letztlich, dass der Organismus diejenigen betroffenen Erythrozyten erkennt und aus der Zirkulation entfernt [45] [51]. Zu den bezeichnenden Veränderungen sind unter anderem die Bindung von denaturiertem Hämoglobin, sogenannter Hämichrome, an das Bande 3-Protein in der Erythrozytenmembran [14] [45] [255], die Anhäufung genau des letzteren Proteins in Membranclustern [14], die Bildung von Neoantigenen aus dem Bande 3-Protein [45], sowie möglicherweise die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin auf dem äußeren Blatt der Zellmembran [45] [189] zu zählen [315]. An die Neoantigene vermögen spezifische Autoantikörper der Klasse IgG zu binden und dadurch eine Opsonisierung der betroffenen roten Blutkörperchen zu bewirken [45] [255]. Diese Antikörpermarkierung der gealterten Erythrozyten tritt vor allem während derer letzten Lebenstage vermehrt zum Vorschein [45]. Neben der Opsonisierung durch die Antikörper selbst ermöglichen die letzteren zusätzlich eine Komplementbindung auf den roten Blutkörperchen, wodurch die erythrozytäre Markierung nochmals verstärkt wird [14] [255]. Die Erkennung und schließlich der Abbau der seneszenten roten Blutkörperchen ereignet sich über das retikuloendotheliale System und dessen Makrophagen [14] [45] [331]. Im menschlichen Organismus kommen hier insbesondere den Kupferzellen in der Leber und den

Phagozyten in der Milz Relevanz zu [45] [315]. Die Ausmusterung der gealterten Erythrozyten erfolgt reguliert und gesteuert unter Umgehung einer Hämolyse und einer einhergehenden Freisetzung intrazellulärer Komponenten [45] und ermöglicht dem Organismus damit ein physiologisches wie auch zahlenmäßiges Gleichgewicht an Erythrozyten aufrechtzuerhalten [51].

Die Eryptose stellt eine weitere Ausmusterungsmöglichkeit dar und betrifft diejenigen roten Blutkörperchen, welche schon vor Erreichen der Seneszenz lebensbegrenzende und funktionsbeeinträchtigende Beschädigungen erleiden: Während ihrer Lebensdauer erfahren die Erythrozyten vielfach verschiedene Stressoren [225]: So werden die Zellen regelmäßig verformt, um durch die schmalen Kapillaren zu fließen [145] [225]. Wiederholt wirken sowohl große Turbulenzen unter anderem beim Auswurf des Blutes aus dem Herzen als auch Scherkräfte auf die roten Blutkörperchen ein [14]. Weiterhin passieren die Erythrozyten durchschnittlich einmal pro Minute den Lungenkreislauf und erfahren dort oxidativen Stress [225]. Etwa einmal pro Stunde fließen die Zellen jeweils durch die Niere und sind dabei einem hyperosmolaren Milieu ausgesetzt [225]. Zur Bewältigung dieser Stressoren ist die Integrität und Funktionalität der Erythrozyten essentiell. Bestehen Schäden oder Funktionseinbußen eines roten Blutkörperchens, so sollte dieses möglichst frühzeitig ausgesondert werden, um nachteilige Folgen wie beispielsweise seine Ruptur und damit die Freisetzung intrazellulärer Komponenten zu verhindern [225]. An dieser Stelle greift die Eryptose zur Ausmusterung nicht-seneszenter, beschädigter oder infizierter Erythrozyten unter Umgehung der Hämolyse ein [225]. Damit ist die Eryptose von der Seneszenz abzugrenzen [315] und wird in Kapitel 1.3 dargestellt.

Schließlich ist die Hämolyse anzuführen, welche gleich den beiden zuvor dargestellten Aussonderungsmechanismen zwar letztlich die Entfernung der betroffenen Erythrozyten bewirkt, dabei aber mit nachteiligen Konsequenzen für den Organismus einherzugehen vermag [214]. Unter der Hämolyse ist die Auflösung der roten Blutkörperchen zusammengefasst, wobei anders als bei der Seneszenz und der Eryptose die Integrität der erythrozytären Zellmembran

beschädigt wird [356]. Hieraus folgt, dass im Rahmen eines hämolytischen Geschehens intrazelluläre Komponenten wie das Hämoglobin in das umgebende Blutplasma freigesetzt werden [356]. Hervorgerufen wird die Hämolyse durch verschiedenartige, tiefgreifende und nicht behebbare Schädigungen der Erythrozyten wie unter anderem mechanischer oder osmotischer Stress sowie toxische oder infektiöse Einflüsse [334] [356]. Ebenso sind auch eine Vielzahl an hämatologischen Erkrankungen, beispielsweise die Sichelzellanämie oder die Thalassämie, sowie Blutgruppen-inkompatible Transfusionen durch ein vermehrtes Hämolysevorkommen gekennzeichnet [334]. Im Falle einer gering ausgeprägten, durchaus physiologischerweise auftretenden Hämolyse wird das abgegebene Hämoglobin an das Plasmaprotein Haptoglobin gebunden und nachfolgend unschädlich durch die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems abgebaut [334] [356]. Tritt ein hämolytisches Geschehen allerdings in ausgeprägter Form auf, so übersteigt die freiwerdende Hämoglobinmenge die Bindungsfähigkeit des Haptoglobins und der rote Blutfarbstoff verbleibt ungebunden im Blutplasma [334] [356]. In der Folge ist dann die Entstehung verschiedener Pathologien möglich [334]: Zum einen weist das Häm als Bestandteil des roten Blutfarbstoffes eine proinflammatorische Aktivität auf [152] [334], zum anderen bindet das im Blutplasma freie Hämoglobin vermehrt Stickoxid, beeinträchtigt so den Gefäßtonus und kann dadurch vermehrt thrombotische Ereignisse bedingen [334]. Weiterhin vermag der rote Blutfarbstoff die Niere durch den Verschluss der dortigen Tubuli zu schädigen [149].

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose entstammt der griechischen Sprache und setzt sich aus den Wörtern „apo“ für „weg“ und „ptosis“ für „Fall“ zusammen [187]. Die Apoptose beschreibt einen suizidalen Zelltod und soll durch ihre Bezeichnung bildlich auf den funktionellen Wegfall der Blätter von den Bäumen im Herbst verweisen [187].

1.2.1 Definition der Apoptose

Die Apoptose stellt einen streng reguliert verlaufenden, energieabhängigen, suizidalen Zelltod dar [187] [390]. Die involvierten Mechanismen sind innerhalb der Zellen genetisch verankert [97] und beziehen die zellständigen Organellen, insbesondere die Zellkerne und die Mitochondrien, ein [138] [140] [225]. Während des gesamten Sterbeprozesses wird die Integrität der betroffenen Zellen aufrecht erhalten und die Zellüberbleibsel werden abschließend mittels Phagozytose vollständig entfernt, sodass umgebende Gewebe geschont und Entzündungsreaktionen umgangen werden [187] [390]. Die Apoptose erfüllt die Aufgabe, gealterte, beschädigte, entartete, infizierte, sowie überschüssige Zellen zu entfernen und ermöglicht eine regelrechte Entwicklung und eine Aufrechterhaltung einer Homöostase innerhalb eines Organismus [138] [390].

1.2.2 Morphologische Charakteristika der Apoptose

Der apoptotische Zelltod ist durch verschiedene morphologische Aspekte gekennzeichnet [187] (Abbildung 1). Üblicherweise betrifft die Apoptose einzelne Zellen innerhalb eines Gewebes [97] [187], welche zu Beginn ihrer Apoptose die interzellulären Verbindungen lösen und sich somit aus dem sie umgebenden Zell- und Gewebeverband ausgliedern [102] [187] [277] [390]. Gleichzeitig reduziert sich auch das Volumen apoptotischer Zellen [102] [187]. Weiterhin stellt sich durch eine Schrumpfung der Kernmembran eine Größenabnahme des Zellkerns ein und das darin enthaltene Chromatin kondensiert [102] [187] [390]. Bezeichnet wird dieses morphologische Ereignis der Zellkernverdichtung als „Karyopyknose“ [97]. Auf die letztere Begebenheit folgt mit der „Karyorrhexis“ der endgültige Zerfall des Zellkerns in mehrere Anteile sowie die Fragmentierung des kondensierten Chromatins [102] [187] [201] [263] [390].

Die übliche Morphe der sonstigen Zellorganellen bleibt bis hin zum weit fortgeschrittenen Apoptosegeschehen, welches mit einer Organellenschwellung einhergeht, unverändert [102] [390]. Sogar die Mitochondrien, welche wesentlich an den biochemischen Signalwegen der Apoptose beteiligt sind, behalten sowohl

licht- als auch elektronenmikroskopisch über lange Zeit ihr regelhaftes Erscheinungsbild bei [390].

Weiterhin nimmt die Zellmembran apoptotischer Zellen Veränderungen an, indem sich kleine Membranausstülpungen ausbilden [102] [187] [390]. Die Entstehung und das Auftreten dieser Ausstülpungen wird als „Membranblebbing“ oder als „Zeiose“ bezeichnet [181] [263] [277]. Auf das Membranblebbing folgt eine vollständige Abschnürung der Ausstülpungen hin zu Vesikeln, welche auch als „Apoptosekörperchen“ bekannt sind [102] [187] [277]. Die so entstandenen Apoptosekörperchen sind vollständig von einer Zellmembran umgeben und enthalten in unterschiedlicher Zusammensetzung Zytoplasma, dicht gepackte Zellorganellen sowie Anteile des fragmentierten Zellkerns [187].

Im äußeren Blatt ihrer Zellmembran exponieren die Vesikel – ebenfalls in Folge der Apoptose – das Phospholipid Phosphatidylserin [141] [151], welches im physiologischen Zustand, also bei intakten, vitalen Zellen, streng auf der Membraninnenseite lokalisiert ist [338] [341]. Das externalisierte Phosphatidylserin dient als ein Erkennungsmerkmal der Apoptosekörperchen und ermöglicht den umliegenden Zellen und den Makrophagen aufgrund derer spezifischer Rezeptoren eine phagozytotische Entfernung [101] [151].

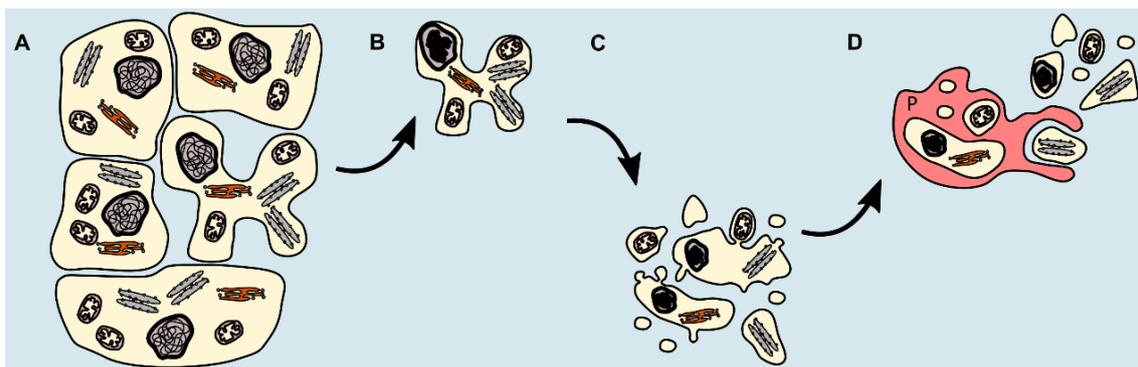


Abbildung 1: Morphologische Charakteristika der Apoptose modifiziert nach [187]. **A** Ausgliederung der apoptotischen Zelle aus dem Zellverband. **B** Zellschrumpfung und Karyopyknose der apoptotischen Zelle. **C** Membranblebbing und Abschnürung von Apoptosekörperchen von der apoptotischen Zelle. **D** Phagozytose der Apoptosekörperchen. P = Phagozyt.

1.2.3 Molekularer Ablauf der Apoptose

Der Ablauf der Apoptose wird im Hinblick auf die molekularen Ereignisse in verschiedene Abschnitte untergliedert [97] [159]: Die eingangs auftretende „Initiationsphase“ umfasst die Apoptoseauslösung über eine extra- oder intrazellulär vermittelte Aktivierungskaskade zellulärer Enzyme und Proteine [159]. In der anschließenden „Exekutionsphase“ findet ein enzymatischer Abbau verschiedener intrazellulärer Strukturen statt, welcher mit den charakteristischen Veränderungen in der Zellmorphologie einhergeht [97] [159] (Kapitel 1.2.2). Die „Terminierung“ der Apoptose ist gekennzeichnet durch eine entzündungsfreie Entfernung der Überbleibsel der apoptotischen Zelle [97] [390]. Über eine Beeinflussung durch zahlreiche, sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine wird die Apoptose als Todesmodalität sorgfältig gesteuert und reguliert [319].

Eingeleitet wird die Initiationsphase der Apoptose durch ein Einwirken verschiedener Apoptoseauslöser auf eine Zelle [97]. Diese Auslöser umfassen einerseits exogene Noxen wie ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika [97]. Andererseits resultieren auch körpereigene Stimuli und Zustände wie Hormonwirkungen, Hypoxie oder ein Entzug an Wachstumsfaktoren in der Apoptoseauslösung [97]. Die verschiedenen Zellen innerhalb eines Organismus vermögen dabei unterschiedlich anfällig gegenüber den Apoptoseauslösern zu reagieren [97]. In Folge des Einflusses eines der zuvor aufgeführten Auslösern werden innerhalb der beeinträchtigten Zelle Apoptose-spezifische Enzyme und Proteine rekrutiert und stimuliert [97]: Zu diesen Enzymen und Proteinen zählen – neben einer Vielzahl weiterer Moleküle – zum einen die „Caspasen“ (Cysteiny-Aspartat spezifische Proteasen) als eine entscheidende proteolytische Enzymgruppe im Ablauf der Apoptose [8] [97] [289] [323] und zum anderen die Familie der regulierenden, sowohl pro- als auch antiapoptotischen „Bcl-2-Proteine“ [97] [159] [319].

Abhängig vom Ausgangspunkt der Enzym- und Proteinaktivierung werden mehrere Signalwege der Apoptoseauslösung unterschieden: Der „extrinsische Signalweg“ zählt gemeinsam mit dem „intrinsischen Signalweg“ zu den beiden wichtigen auslösenden Mechanismen des Apoptoseprozesses [97] [159] [195].

Der extrinsische Signalweg der Apoptoseauslösung (Abbildung 2) wird eingeleitet, indem verschiedene Todessignale von extrazellulär auf die zu sterbende Zelle einwirken und dadurch deren Protein- und Enzymaktivierung bedingen [15] [97]. Die Todessignale werden dabei vermittelt durch bestimmte Liganden, welche spezifisch an in die Zellmembran eingebettete Transmembranproteine, die sogenannten „Todesrezeptoren“ (death receptors; DR), binden [15] [97]. Innerhalb ihres zytosolischen Anteils weisen diese Todesrezeptoren mit der „Todesdomäne“ (death domain; DD) einen bedeutenden Abschnitt auf, welcher die Weitergabe des Todessignals nach intrazellulär bewerkstelligt [15] [75] [97] [159] [323]: Nach der Stimulation eines Todesrezeptors binden an dessen zytosolische Todesdomäne verschiedene intrazelluläre Adapterproteine wie das „Fas-associated death domain-containing protein“ (FADD) und ermöglichen ihrerseits über eine „Todeseffektordomäne“ (death effector domain; DED) die Anlagerung der inaktiven Procaspase-8 (FADD-like interleukin-1-converting enzyme; FLICE) [97] [159] [323]. Dieser Zusammenschluss des Todesrezeptors, der Adapterproteine und der Procaspase-8 wird als „death inducing signalling complex“ (DISC) bezeichnet und ruft eine Autoproteolyse der Procaspase-8 in die aktive Caspase-8 hervor [97] [159] [193]. Die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 ermöglicht den Übergang in die Exekutionsphase der Apoptose [97]. Weiterhin gestattet die Caspase-8 an dieser Stelle auch eine Vernetzung des extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg der Apoptose: die letztere Protease vermag das proapoptotische Molekül Bid (BH3 interacting domain agonist) aus der Bcl-2-Proteinfamilie in das tBid (truncated Bid) zu spalten, welches anschließend mittels Einbindung weiterer proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie auf die Mitochondrienmembran und damit auf den intrinsischen Signalweg aktivierend einwirkt [159].

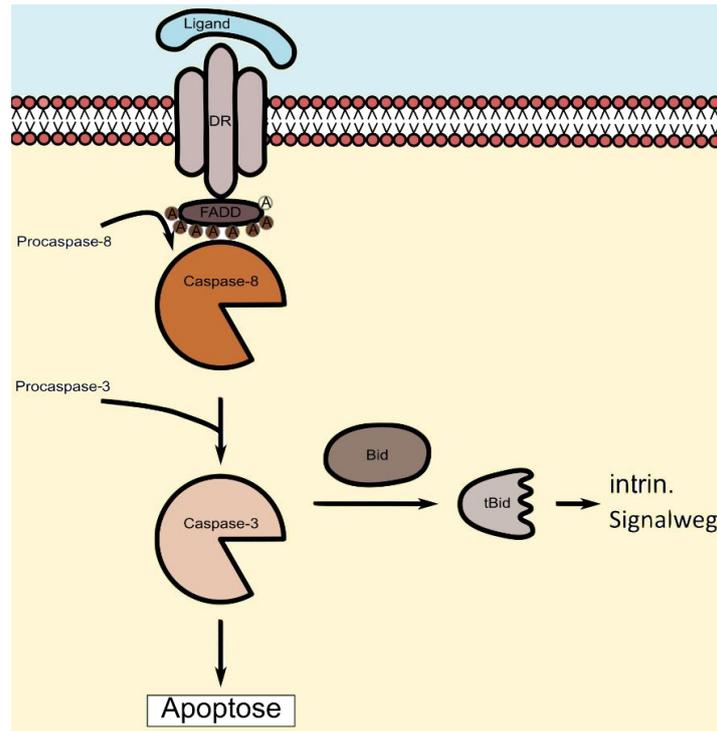


Abbildung 2: Extrinsischer Signalweg modifiziert nach [159]. Durch Bindung eines Liganden an seinen spezifischen Todesrezeptor erfolgt die Anlagerung und Aktivierung der Initiatorcaspase-8 vermittelt über Adaptorproteine wie FADD. Die Caspase-8 aktiviert anschließend die Effektorcaspase-3, welche die Apoptose bewirkt. Über eine Spaltung von Bid zu tBid durch die Caspase-8 besteht eine Verbindung zum intrinsischen Signalweg. A = Adaptorproteine; DR = Death Receptor.

Im Gegensatz zum extrinsischen Signalweg beruht der intrinsische Signalweg der Apoptose (Abbildung 3) allein auf intrazellulären Signalen, welche ihrerseits entweder durch äußere oder durch zellinterne Apoptoseauslöser hervorgerufen werden [97]. Dabei kommt den Mitochondrien der apoptotischen Zelle eine bedeutsame Rolle als Wirkort jener schädigenden Einflüsse sowie anschließend in der Vermittlung der intrazellulären Todessignale zu [97] [139]: Die Noxen und Stressoren wirken auf die Mitochondrienmembran und erhöhen dadurch deren Permeabilität [97] [319]. Den Proteinen der Bcl-2-Familie wird hierbei eine wichtige regulatorische Funktion zugeschrieben [77] [97] [139] [319]. Der Prozess der Permeabilitätssteigerung wird als „Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization“ (MOMP) bezeichnet und bedingt sowohl durch eine Schädigung der lebenswichtigen mitochondrialen Funktion als auch durch eine Freisetzung zweier Klassen an proapoptischen Proteinen aus den

Mitochondrien in das Zytosol die Einleitung der Apoptose [97] [139] [140] [182] [319] [336].

Zur ersteren Klasse zählen diejenigen Proteine, welche den apoptotischen Zelltod vermittelt über Caspasen fördern [97] [139]. Anzuführen sind dabei insbesondere das Cytochrom C, das „Smac/DIABLO“ sowie die Serinprotease „HtrA2/Omi“ [91] [97] [336]. Nach der Freisetzung aus den Mitochondrien bindet das Cytochrom C das zytosolische Protein APAF-1 und bewirkt dessen Konformationsänderung [159] [323] [336]. In der Folge wird zum einen eine Anlagerung von ATP an das APAF-1 ermöglicht und zum anderen eine Bindungsstelle für die inaktive Procaspase-9, die sogenannte „Caspasen-Rekrutierungsdomäne“ (CARD), innerhalb des APAF-1-Proteins freigelegt [169] [336]. Mehrere der letzteren Proteine oligomerisieren, binden die Procaspase-9 und aktivieren diese zur aktiven Caspase-9 [169] [336]. Der Zusammenschluss aus Cytochrom C, APAF-1, ATP und der Procaspase-9 wird „Apoptosom“ bezeichnet [159] [169] [336]. Die Aktivierung der Initiatorcaspase-9 ermöglicht den Übergang in die Exekutionsphase der Apoptose [97]. Das Protein Smac/DIABLO und die Serinprotease HtrA2/Omi unterstützen die Caspasen-vermittelte Apoptoseauslösung, indem sie verschiedene Apoptose-hemmende Proteine, sogenannte „Inhibitors of Apoptosis“ (IAP) binden und diese somit in deren inhibierenden Einflüssen einschränken [91] [97] [159] [336].

Die zweite Klasse an freigesetzten mitochondrialen Proteinen fördert ebenfalls den Apoptoseablauf und vermag dabei selbst verschiedene Zielstrukturen der Apoptose zu spalten sowie abzubauen [139]. Zu dieser Art an Proteinen zählen unter anderem der „Apoptosis inducing factor“ (AIF) sowie die Endonuklease G [97] [173] [241]. Beide Moleküle translozieren in Folge ihrer Freisetzung aus den geschädigten Mitochondrien in den Zellkern [97] [336] [361]. Der AIF bewirkt dort eine Kondensation des Chromatins und – gleich der Endonuklease G – eine Spaltung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) [97] [241] [336] [361].

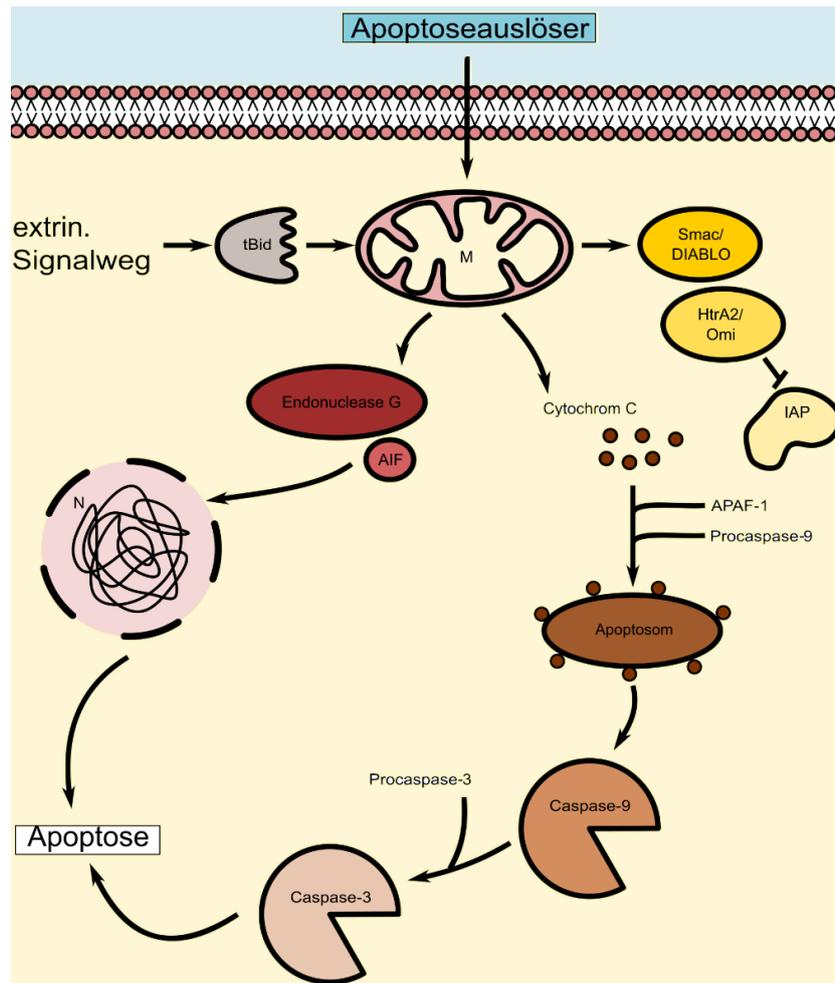


Abbildung 3: Intrinsischer Signalweg modifiziert nach [159]. Durch die Einwirkung von Apoptoseauslösern auf die Mitochondrien wird die Permeabilität der Mitochondrienmembran erhöht und mitochondriale Proteine werden freigesetzt: Das Cytochrom C bildet mit dem zytosolischen APAF-1 und der Initiatorprocaspase-9 das Apoptosom, wodurch die Caspase-9 aktiviert wird. Letztere aktiviert ihrerseits die Effektorcaspase-3, welche die Apoptose bewirkt. Die Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi hemmen die IAP. Die Endonuclease G und der AIF translozieren in den Nucleus und bewirken eine Chromatinkondensation und eine Spaltung der DNA. Über tBid aus dem extrinsischen Signalwege besteht eine Verbindung der Apoptosesignalwege. M = Mitochondrion; N = Nucleus.

Die Exekutionsphase innerhalb des Apoptoseablaufs setzt mit der aktivierenden Spaltung der Effektorprocaspasen in die Effektorcaspasen vermittelt durch die Initiatorcaspasen ein [97] [159]: Die Initiatorcaspase-8 aus dem extrinsischen Signalweg sowie die Initiatorcaspase-9 aus dem intrinsischen Signalweg prozessieren und aktivieren die Effektorcaspasen, insbesondere die Caspase-3 [97] [143] [350]. Die letzteren Caspasen ihrerseits spalten und aktivieren einerseits weitere Enzyme wie die zytoplasmatische Endonuclease oder Proteasen und nehmen andererseits selbst am Abbau verschiedener Strukturproteine teil [97]

[143] [159] [319] [350]. In Folge dieser enzymatisch vermittelten Abbauprozesse nimmt die gesteuert sterbende Zelle die in Kapitel 1.2.2 dargelegten, Apoptose-spezifischen morphologischen Veränderungen an [97] [159] [319] [323].

Während der Terminierung des Apoptosegeschehens werden die zuvor entstandenen Apoptosekörperchen mittels Phagozytose beseitigt und anschließend lysosomal abgebaut [97] [323]. Die Aufnahme und Degradation der letztgenannten Zellüberbleibsel erfolgt sowohl durch die umgebenden Zellen, als auch durch einwandernde Makrophagen [151] [187] [338]. Dabei wird die Erkennung der Vesikel unter anderem vermittelt über die Interaktion spezifischer Phosphatidylserinrezeptoren der phagozytierenden Zellen mit dem auf der Außenseite der Apoptosekörperchen exponierten Phospholipid Phosphatidylserin [101] [104]. In Folge dieser Rezeptorbindung werden die Makrophagen in der Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) oder des Interleukins-1 β (IL-1 β) inhibiert [65] [102] [325] [373] und gleichzeitig für die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) oder Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) stimuliert [65] [100] [102] [373]. Diese aufgezeigten, regulierten Mechanismen und Abläufe ermöglichen, dass die apoptotischen Zellen ohne eine Freisetzung ihrer intrazellulären Inhalte unter Beibehaltung einer intakten Zellmembran sterben und gewebeschonend entfernt werden [338] [365]. Die Apoptose stellt somit ein gesteuertes und schonendes Zellsterben unter Umgehung nachteiliger Folgen wie Entzündungsreaktionen oder Organschäden dar [187] [338] [390].

1.2.4 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose erfüllt die bedeutungsvolle und unentbehrliche Aufgabe der sorgfältigen Ausmusterung gealterter, zahlenmäßig überflüssiger, infizierter oder schadhafter Zellen [138] [143] [202]. Sie stellt das Gegenstück zur Zellneubildung mittels der Mitose dar und hält sich im physiologischen Zustand mit der letzteren das Gleichgewicht [97] [186]. Entsprechend werden regelhafterweise täglich mehrere Milliarden Zellen innerhalb des menschlichen Körpers über die Zell-

teilung neu gebildet während die gleiche Anzahl bestehender Zellen der Apoptose unterliegt [324] [326]. Der gesteuerte Zelltod ereignet sich über die gesamte Lebensspanne und stellt auf diese Weise sowohl die Funktionalität als auch die Homöostase eines Organismus sicher [326].

Bereits in der Embryonal- und der Fetalentwicklung ist das Auftreten der Apoptose unverzichtbar [97] [326]: Durch den gesteuerten Verlust überflüssiger Zellen wird sowohl die endgültige Morphe beispielsweise im Bereich der Finger und Zehen [326], als auch die regelrechte Entwicklung des Gehirns sichergestellt [97] [298] [326]. Auch die Ausbildung und später die Weiterentwicklung des Immunsystems selbst sowie ebenfalls dessen Aktivität zur Pathogen- und Schadensabwehr erfolgt maßgeblich unter Einbeziehung der Apoptose [97] [132] [302] [326]. Schließlich ermöglicht der programmierte Zelltod mittels Apoptose sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Zustand den Ablauf etwaiger Auf-, Ab- und Umbauvorgänge beispielsweise im Rahmen der Involution verschiedener Gewebe [97] [186] oder bei der Wundheilung [97], sowie die Erneuerung verkommener und die Entfernung entarteter Zellen [143].

Neben diesen eben aufgezeigten physiologischen und unabdingbaren Aspekten der Apoptose besteht indessen auch eine pathophysiologische Relevanz dieses programmierten Zelltodes [365]. Entsprechende nachteilige Ereignisse ergeben sich insbesondere dann, wenn die gründliche Regulation der Apoptose gestört wird und aus ihrem Gleichgewicht gerät [326]. Abzugrenzen sind in diesem Fall diejenigen Krankheitsbilder, welche auf einer unphysiologisch verminderten Apoptoserate beruhen, von solchen pathologischen Zuständen, welche durch ein gesteigertes Apoptosevorkommen gekennzeichnet sind [97] [326].

Zu der ersteren Kategorie sind unter anderem maligne Neoplasien, aber auch verschiedene autoimmune Pathologien zu zählen [97] [326]. Im Falle von Krebserkrankungen vermögen die maligne entarteten Zellen durch eine Ansammlung genomischer Mutationen eine Resistenz gegenüber des genetisch verankerten Apoptoseprogrammes zu entwickeln und sich hierdurch ihrem gesteuerten Zelltod zu entziehen [97] [147] [186] [250]. Dem Auftreten einiger Autoimmunerkrankungen liegt pathogenetisch eine unzureichende apoptotische Entfernung

autoreaktiver Immunzellen zugrunde, so dass die letzteren Zellen schließlich körpereigenes Gewebe schädigen [97] [365].

Im Gegensatz zum eben dargestellten verminderten gesteuerten Zelltod ist ein unphysiologisch vermehrtes Auftreten der Apoptose beispielsweise sowohl als eine Ursache als auch als eine Folge infektiöser, neurodegenerativer, aber auch ischämischer Erkrankungen vorzufinden [97] [326]. So rufen die humanen Immundefizienz-Viren (HIV) nach Infektion ein gesteigertes apoptotisches Zellsterben der CD4⁺-T-Lymphozyten innerhalb ihres Wirtes hervor, was letztlich die Entstehung des Aquired Immune Deficiency Syndromes (AIDS) bedingt [97] [136]. Betrachtet man den Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen, so sind unter anderem die Krankheitsbilder Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington von einem erhöhten Untergang verschiedener Neurone mittels der Apoptose begleitet [97] [365] [386]. Auch im Rahmen von Ischämien wird dem Auftreten der Apoptose – neben dem geläufigen nekrotischen Zellsterben – eine wichtige Bedeutung zugemessen [97] [365].

1.3 Eryptose

1.3.1 Definition der Eryptose

Die Eryptose ist ein koordinierter, programmierter und suizidaler Zelltod, welchen die roten Blutkörperchen erfahren können [218] [225]. Morphologisch ist diese Art des Zellsterbens durch die drei Hauptmerkmale, (1) die Abnahme der Zellgröße durch Schrumpfung, (2) das Membranscrumbling mit Phosphatidylserinexposition auf der Erythrozytenoberfläche sowie (3) das Zellmembranblebbing charakterisiert [50] [218] [225]. Die Eryptose wird aufgrund von Schädigungen der roten Blutkörperchen durch Einwirkung von Eryptosetriggern hervorgerufen und ermöglicht dem Organismus die Entfernung defekter Zellen vor einem anschließenden Eintritt schädlicher Folgen [218] [225].

1.3.2 Trigger der Eryptose

Um das Eintreten und Ablaufen der Eryptose in den roten Blutkörperchen hervorzurufen, bedarf es der Einwirkung verschiedener Stressoren auf die letzteren Zellen [212]. Diese als Eryptosetrigger bezeichneten Auslöser des gesteuerten erythrozytären Zelltodes umfassen sowohl verschiedene Umstände, welche endogen im Organismus auftreten oder durch externe Manipulation entstehen, als auch den Einfluss diverser Xenobiotika, Giftstoffe, sowie körpereigener Moleküle [212]. Hervorzuheben sind bei dieser Betrachtung die Ionomycine Calcimycin und Ionomycin, welche die ersten beschriebenen Trigger der Eryptose darstellen [31] [50]. Zu denjenigen Umständen, welche das Auftreten der Eryptose bewirken können, sind beispielsweise der hyperosmolare Schock [224], der oxidative Stress [224], eine Glukosedepletion mit daraus folgendem Energiemangel [194], die Hyperthermie [113], sowie das Vorliegen von Erkrankungen [218] [221] (Kapitel 1.3.7) zu zählen [212]. Beispiele für solche Xenobiotika und endogene Substanzen, welche den suizidalen, erythrozytären Zelltod bedingen sind in der untenstehenden Tabelle 1 zusammengetragen [212].

Tabelle 1: Exogene Xenobiotika und endogene Moleküle mit Funktion als Eryptosetrigger modifiziert nach [214] [218].

Xenobiotikum	Involvierte Signalwege			Referenz
	Ca ²⁺	Ceramid	Andere	
α-Liponsäure	+	+	+	[34]
Amiodaron	+			[291]
Amphotericin B	+		+	[261]
Amyloid		+		[292]
Azathioprin	+			[126]
Bismuth	+	+		[54]
Chlorpromazin	+			[196]
Ciglitazon	+			[297]
Cyclosporin		+	+	[295]
Dimethylfumarat	+		+	[127]
Leukotrien C ₄	+			[117]
Methyldopa		+	+	[259]

1.3.3 Signalwege der Eryptose

Der gesteuerte Zelltod der Erythrozyten kann – wie in Kapitel 1.3.2 dargestellt – durch eine große Anzahl an Eryptosetriggern hervorgerufen werden und vollzieht sich anschließend über verschiedene Signalwege. Letztere lassen sich unterteilen in Kalzium-abhängige Mechanismen und in solche Signalwege, die ohne

den Einfluss von Kalzium erfolgen. Beide Mechanismen, Kalzium-abhängig und Kalzium-unabhängig, können alleine genommen zur Eryptose führen oder auch gemeinsam in eryptotischen Zellen wirken.

Der Kalzium-abhängige Signalweg der Eryptose beruht auf einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration [31] [50] [84]. Hervorgerufen wird diese gesteigerte Kalziumaktivität durch die Öffnung nicht-selektiver Kationenkanäle in der Erythrozytenmembran mit einem nachfolgenden Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellularraum [175] [177] [224]. Die genannten Ionenkanäle sind selektiv für Kationen durchlässig, wobei sowohl monovalente Kationen wie Natrium (Na^+) oder Kalium (K^+), als auch divalente Kationen wie Kalzium (Ca^{2+}) passieren können [93] [176] [224]. Bisher ist die molekulare Charakterisierung der nicht-selektiven Kationenkanäle unvollständig erfolgt, es wird jedoch von einer Beteiligung von Transient Receptor Potential Channel 6 (TRPC6) ausgegangen [116]. Unter Ruhebedingungen weisen diese nicht-selektiven Kationenkanäle eine Inaktivität auf [93] [116]. Ihre Öffnung erfolgt durch das Einwirken verschiedener Eryptosetrigger. Zu letzteren gehören beispielsweise:

- der **osmotische Schock** [158] [224]

Das Einwirken von Hyperosmolarität auf rote Blutkörperchen führt zu deren Zellschrumpfung. Letztere Volumenabnahme bewirkt über eine Enzymaktivierung die sequenzielle, erythrozytäre Synthese von Prostaglandin E_2 (PGE_2) durch die Phospholipase A_2 (PLA_2), die Cyclooxygenase (COX) und die PGE_2 -Synthase [234]. PGE_2 seinerseits stimuliert die Öffnung der nicht-selektiven Kationenkanäle [234].

- die **Depletion von extrazellulären Chloridionen** [93] [228] [234]

Die Entfernung extrazellulärer Chloridionen bewirkt über eine Enzymaktivierung die sequenzielle, erythrozytäre Synthese von PGE_2 durch die PLA_2 , die COX sowie die PGE_2 -Synthase [234]. PGE_2 seinerseits stimuliert die Aktivierung der nicht-selektiven Kationenkanäle [234].

- das **Prostaglandin E_2** [175] [234]

Auch eigenständig erwirkt PGE_2 die Öffnung der nicht-selektiven Kationenkanäle [234]. Letzteres Eikosanoid wird unter anderem von aktivierten Throm-

bozyten [177] [352], von mechanisch beanspruchten Erythrozyten [301] oder bei Entzündungsgeschehen [234] [239] freigesetzt.

- der **oxidative Stress** [82] [93] [224]
- die **Energiedepletion durch Glukoseentzug** [224]
Die Absenz von Glukose – und damit die Energiedepletion – führt zu einer eingeschränkten antioxidativen Abwehr und bewirkt dadurch oxidativen Stress [207] [257], welcher die nicht-selektiven Kationenkanäle aktiviert [229].
- die **Reduktion des Zellvolumens** [224] [234]
Die Aktivität der nicht-selektiven Kationenkanäle wird weiterhin über das Zellvolumen der entsprechenden roten Blutkörperchen reguliert [224]. Hieraus ergibt sich, dass erythrozytäre Pathologien – sofern sie mit einer erleichterten Zellschrumpfung einhergehen – zu einer vermehrten Öffnung jener Kationenkanäle führen können [234]. Beschrieben ist eine Vereinfachung der Zellschrumpfung unter anderem für die Sichelzellanämie [171] [217] und für die Eisenmangelanämie [172].
- verschiedene **Xenobiotika** [214] [218] [223] (Tabelle 1).

Mittels der erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration, welche sich nach der Aktivierung der nicht-selektiven Kationenkanäle durch die eben beschriebenen Eryptosetrigger einstellt, wird anschließend unter anderem das Membran-scrambling, die Öffnung der Gárdos-Kanäle und die Aktivierung der Calpain-Enzyme bewirkt:

Die eingeströmten Kalziumionen rufen eine Aktivierung des Enzyms Phospholipid-Scramblase hervor [351] [382] und hemmen gleichzeitig das Enzym Aminophospholipid-Translokase [37] [283] [387] (Abbildung 4). Beide Enzyme sind in der Zellmembran der Erythrozyten lokalisiert [76] [387] und erfüllen unterschiedliche Funktionen: Die Phospholipid-Scramblase führt nach ihrer Aktivierung zu einer schnellen Durchmischung der Membranlipide, indem sie einen bidirektionalen Transport der verschiedenen Phospholipide zwischen den beiden Membranblättern ermöglicht [25] [379]. Hieraus resultiert ein symmetrischerer Aufbau der Zellmembran, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin werden inter-

nalisiert während Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin auf dem äußeren Membranblatt exponiert werden [351] [391]. Die Aminophospholipid-Translokase hingegen bewahrt in ihrem aktiven Zustand die Asymmetrie der Membranlipide gesunder Erythrozyten, indem sie Phosphatidylserin und in geringerem Ausmaß auch Phosphatidylethanolamin nach deren Diffusion vom äußeren zurück in das innere Membranblatt transportiert [81] [343] [379] [387].

Unter dem Einfluss des erhöhten intrazellulären Kalziumspiegels kommt es daher zu einer raschen Umverteilung der Phospholipide zwischen dem inneren und dem äußeren Anteil der Zellmembran mit konsekutivem Verlust der Membranasymmetrie [25] [379]. Das Membranlipid Phosphatidylserin, welches im physiologischen Zustand streng an das innere Membranblatt gebunden ist, wird in den eryptotischen Zellen externalisiert [25]. Der Verlust der Membranasymmetrie mit der Phosphatidylserinexposition beschreibt ein Hauptmerkmal der Eryptose [50] [224] und ermöglicht die Erkennung und Entfernung betroffener Erythrozyten mittels Phagozytose [104] [152] (Kapitel 1.3.4).

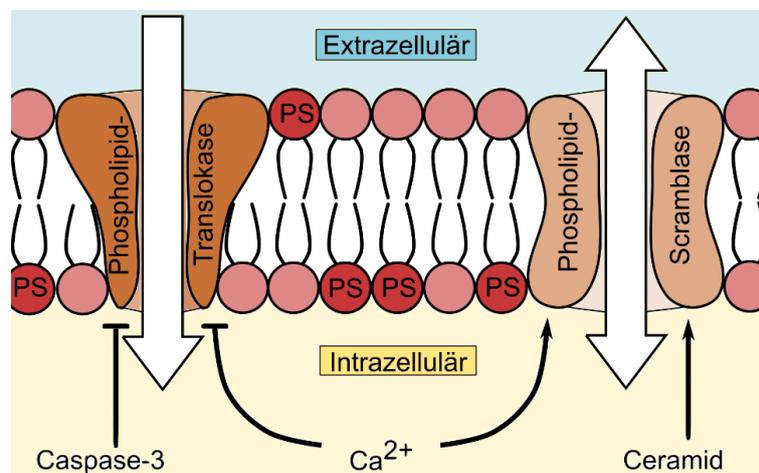


Abbildung 4: Aktivierung des Enzyms Phospholipid-Scramblase und Hemmung des Enzyms Phospholipid-Translokase. Kalziumionen wirken aktivierend auf die Phospholipid-Scramblase, welche einen bidirektionalen Phospholipidtransport ermöglicht, und hemmend auf die Phospholipid-Translokase, welche Phosphatidylserin internalisiert. In der Folge wird Phosphatidylserin vermehrt exponiert. Ferner wird die Phospholipid-Scramblase durch Ceramid aktiviert (Kapitel 1.3.3) und die Phospholipid-Translokase durch die Caspase-3 inhibiert (Kapitel 1.3.3) PS = Phosphatidylserin.

Weiterhin bewirkt die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Öffnung von Ca^{2+} -sensitiven Kaliumkanälen in der Erythrozytenmembran [122] [142]

[232] [258] (Abbildung 5). Angelehnt an ihren Erstbeschreiber werden letztere Kanäle auch als Gárdos-Kanäle bezeichnet [124]. Ihre Aktivierung führt zu einem Kaliumausstrom aus den Erythrozyten [56]. Daraus resultiert eine Hyperpolarisation an der Zellmembran, welche als treibende Kraft einen Chlorid- ausstrom durch membranständige Chloridkanäle hervorruft [55] [225] [232]. Zusammengefasst kommt es also zu einem erythrozytären Verlust von Kaliumchlorid (KCl), osmotisch bedingt folgt Wasser nach extrazellulär [55] [232]. Dieser Wasserverlust bedingt eine Schrumpfung der Zellen [56] [57] [232], welche als eines der Hauptmerkmale der Eryptose gilt [50] [224] (Kapitel 1.3.1).

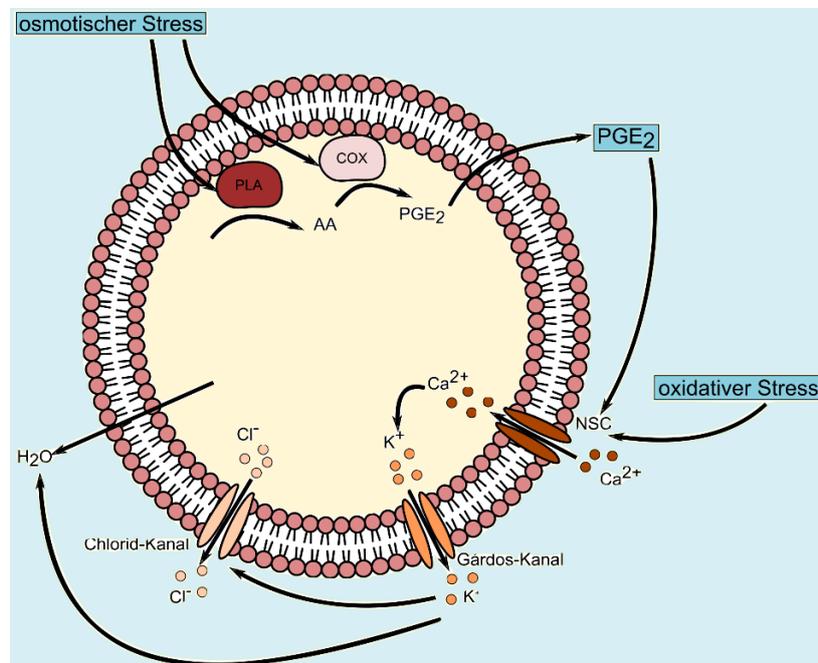


Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der eryptotischen Zellschrumpfung modifiziert nach [225]. Verschiedene Eryptosetrigger wie der osmotische Stress, der oxidative Stress oder PGE₂ rufen eine Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals hervor, durch welchen Kalziumionen nach intrazellulär einströmen. Die Kalziumionen bewirken eine Öffnung des Gárdos-Kanals mit nachfolgendem Ausstrom von Kaliumionen. Dem elektrochemischen Gradienten entsprechend folgen Chloridionen durch den Chloridkanal nach extrazellulär. Der Verlust an Kaliumchlorid bedingt den osmotischen Ausstrom von Wasser und eine damit verbundene Zellschrumpfung. AA = Arachidonsäure; NSC = Nicht-selektiver Kationenkanal.

Die Abnahme des Zellvolumens wirkt an dieser Stelle einer schädigungsbedingten Schwellung der betroffenen Erythrozyten entgegen und kann so deren Hämolyse mit einhergehender Freisetzung intrazellulärer Komponenten verzögern oder sogar verhindern [208] [232]. Überdies resultiert die Zellschrumpfung

pfung in einer vermehrten Expressierung von Phosphatidylserin auf dem äußeren Membranblatt der roten Blutkörperchen [237] [340]. Als ein möglicher Pathomechanismus hierfür erscheint eine Aktivierung des Enzyms Sphingomyelinase aufgrund der Reduktion des Zellvolumens und in der Folge die Entstehung von Ceramid [226]. Das Ceramid seinerseits sensibilisiert die Phospholipid-Scramblase für die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration [226] (Kapitel 1.3.3). Damit nimmt die Öffnung der Gárdos-Kanäle mit nachfolgender Abnahme des Erythrozytenvolumens indirekt einen verstärkenden Einfluss auf den Verlust der Membranasymmetrie eryptotischer Zellen.

In Folge der gesteigerten intrazellulären Kalziumaktivität wird außerdem die zytosolische Cystein-Endopeptidase Calpain (Calium ion-dependent papain-like cysteine protease [285]) in den roten Blutkörperchen an die Zellmembran transloziert und anschließend durch Autoproteolyse aktiviert [31] [150] [272] [273] [275]. In aktivierter Form bewirkt das Calpain in den Erythrozyten den Abbau verschiedener Strukturproteine des Zytoskeletts wie Spektrin, Ankyrin R oder Bande-3-Proteinen [84] [150] [234] [305]. Die gestörte Integrität des Zytoskeletts führt zum Membranblebbing [115], welches ein Hauptmerkmal der Eryptose darstellt [50] [224], sowie zur Ausbildung und Ablösung von Mikrovesikeln [234] [309]. Die Mikrovesikel reduzieren dabei das Zellvolumen der eryptotischen roten Blutkörperchen und erleichtern so deren anschließende Phagozytose [234].

Neben dem oben beschriebenen Kalzium-abhängigen Signalweg vermag die Eryptose auch unabhängig von erhöhten intrazellulären Kalziumionen zu erfolgen: Werden Erythrozyten beispielsweise einem hyperosmolaren Milieu ausgesetzt und wird gleichzeitig die Kalziumwirkung unterbunden – entweder durch Depletion der Kalziumionen oder durch pharmakologische Hemmung der nicht-selektiven Kationenkanäle – so werden die Zellschrumpfung und die Phosphatidylserinexposition zwar abgeschwächt, aber nicht gänzlich unterbunden [224] [226]. Aus dieser Beobachtung folgt, dass auch weitere Mechanismen – losgelöst von einer gesteigerten Kalziumaktivität – den gesteuerten Zelltod der roten Blutkörperchen hervorrufen [226]. Zu diesen alternativen Signalwegen

zählen unter anderem die durch das Lipid Ceramid vermittelten Mechanismen der Eryptose sowie der über Caspasen hervorgerufene Signalweg.

Ceramide gehören der Verbindungsklasse der Sphingolipide an und zählen neben dem Kalzium-abhängigen Signalweg zu den bedeutsamsten Mechanismen der Eryptoseauslösung [208]. Ersteres Lipid dient als ein Second-Messenger und taucht in verschiedenen Zellvorgängen wie dem Entzündungsgeschehen, der Seneszenz, der Apoptose und eben der Eryptose auf [88] [137] [148].

Die Ceramid-vermittelten Mechanismen der Eryptose können durch das Einwirken vieler verschiedener Zustände und Substanzen ausgelöst werden. Hierzu gehören beispielsweise:

- der osmotische Schock [226]
- das Auftreten von Fieber [113] oder einer Sepsis [184]
- das Leber- [210] und das Nierenversagen [1]
- das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) [230]
- der Morbus Wilson [236]
- diverse Xenobiotika [218] [223] (Tabelle 1)

Noch ist unzureichend bekannt, welche Mechanismen und Enzyme die Entstehung des Ceramids in den roten Blutkörperchen bewirken [208] [218]. Eine erythrozytäre de novo Synthese des Second-Messengers wurde bislang nicht angenommen und festgestellt [96] [146] [370]. Beschrieben wird, dass die Ceramidbildung in den Erythrozyten durch eine Spaltung des Membranlipids Sphingomyelin in Phosphocholin und Ceramid mittels des Enzyms Sphingomyelinase erfolgt [134] [226]. Fraglich ist diesbezüglich die Lokalisation des letzteren Enzyms [223]: Eine erythrozytäre Sphingomyelinaseaktivität erscheint aufgrund einer mangelnden Nachweisbarkeit [146] als unwahrscheinlich [88]. Möglich ist indes das Vorkommen der Sphingomyelinase im Blutplasma [167] [218]. In Übereinstimmung hierzu weisen Patienten mit Morbus Wilson diese Enzymaktivität in ihrem Blutplasma auf [236]. Im Falle eines osmotischen Schocks wird die Aktivität der Sphingomyelinase über einen Signalweg reguliert,

welcher auf dem Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) beruht: Eine Zellschrumpfung der Erythrozyten, bedingt durch das hyperosmolare Milieu, zieht die Entstehung des PAF durch die Katalyse des Enzyms PLA₂ nach sich [235]. Die roten Blutkörperchen exprimieren in ihrer Zellmembran PAF-Rezeptoren [235] und die Stimulation mittels des PAF führt nachfolgend zu einer Aktivierung der Sphingomyelinase [235].

Auch das Verständnis über die Signalwege, mittels welcher Ceramid die Eryptose bewirkt, ist bislang unvollständig [208]. Zum einen wird angenommen, dass jenes Sphingolipid die roten Blutkörperchen für Kalziumionen und den Kalzium-vermittelten Signalweg der Eryptose, insbesondere die Phosphatidylserinexposition durch die Phospholipid-Scramblase [223], sensibilisiert [225] [226]. Weiterhin sammelt sich Ceramid in der erythrozytären Zellmembran in Form von Anhäufungen und führt zu veränderten Eigenschaften der Membran sowie einer abweichenden Interaktion der letzteren mit dem Zytoskelett [88]. Infolgedessen kommt es zu einer gesteigerten Membranrigidität, einer erhöhten Membranpermeabilität sowie der Ausbildung von Vesikeln [88].

Ferner können die Kalzium-unabhängigen Mechanismen der Eryptoseauslösung auch die Aktivität von Caspasen involvieren [265] [266]. Rote Blutkörperchen exprimieren nennenswerte Mengen an Procaspase-3 und Procaspase-8 [31]. Durch das Einwirken beispielsweise von oxidativem Stress [266] [269] oder von Leukotrienen [117] – nicht aber durch sonstige geläufige apoptotische/eryptotische Stimuli [31] – wird zunächst die Procaspase-8 in die aktive Caspase-8 gespalten und diese aktiviert daraufhin die Procaspase-3 zur Caspase-3 [265]. Letztere wird weiterhin unter dem Einfluss von α -Liponsäure aktiviert [34]. Die Caspase-3 bewirkt anschließend den Abbau des Bande-3-Proteins [264] und eine Hemmung der Aminophospholipid-Translokase [266]. Folglich gelangt Phosphatidylserin vermehrt auf das äußere Blatt der Zellmembran und die betroffenen Erythrozyten werden durch Makrophagen erkannt und beseitigt [266]. In diesen beschriebenen Fällen, nämlich der Eryptoseauslösung durch oxidativen Stress, durch Leukotriene sowie durch α -Liponsäure, sind Caspasen an den Mechanismen des gesteuerten Zelltodes beteiligt. Betrachtet man

allerdings die oben beschriebene Kalzium-vermittelte Eryptose, so wird die Caspasenaktivität dort nicht benötigt [31] [50] [226] [377].

1.3.4 Entfernung der eryptotischen Zellen aus der Zirkulation

Diejenigen roten Blutkörperchen, welche die Eryptose durchlaufen, nehmen verschiedene morphologische Veränderungen an (Kapitel 1.3.1). Dem Verlust der Membranasymmetrie mit nachfolgender Exposition von Phosphatidylserin kommt dabei – wie auch bei der Apoptose (Kapitel 1.2.2) – eine besondere Bedeutung zu: das Erkennen und Entfernen der eryptotischen Zellen wird hierdurch ermöglicht [152]. Befindet sich Phosphatidylserin im äußeren Blatt der Zellmembran, so werden Makrophagen zur Phagozytose dieser Zellen stimuliert [85] [103] [104] [338] [382]. Über spezifische Rezeptoren binden die Fresszellen an das exponierte Phospholipid [101] [274] und entfernen anschließend die betroffenen Zellen aus der Zirkulation [40]. Die Phagozytose tritt zeitnah nach dem Eintritt des Zelltodes bei noch intakter Zellmembran der eryptotischen Zellen auf und trägt dadurch zur Verhinderung einer Zellruptur bei [104] [152] [185] [338]. Nachteilige Folgen wie die Freisetzung intrazellulärer Komponenten mit anschließender Entzündungsreaktion [152] [334] oder eine mögliche Nierenschädigung [149] [334] werden auf diese Weise umgangen.

1.3.5 Inhibitoren der Eryptose

Neben der oben dargestellten Stimulation der Eryptose durch verschiedene Trigger (Kapitel 1.3.2) kann der gesteuerte Zelltod der roten Blutkörperchen auch in hemmender Weise beeinflusst werden [212]. Diese Inhibition vermag sowohl durch endogene Faktoren und Mechanismen im Rahmen physiologischer Regulation als auch durch exogene, pharmakologische Hemmstoffe zu erfolgen [212]. Möglich ist die Eryptosehemmung dabei auf den verschiedenen Ebenen der zuvor beschriebenen Signalwege (Kapitel 1.3.3):

Zunächst ist eine Hemmung des gesteuerten erythrozytären Zelltodes mittels der Verhinderung des intrazellulären Kalziumanstiegs möglich. Hierzu können die nicht-selektiven Kationenkanäle endogen durch das Hormon EPO inhibiert werden [286]. Weiterhin inhibieren sowohl zytoplasmatische [158] als auch extrazelluläre [93] Chloridionen die Aktivität jener Ionenkanäle [227]. Eine Hemmung der nicht-selektiven Kationenkanäle ist ebenfalls durch verschiedene Katecholamine zu erzielen [233]. Sowohl endogene Hormone wie Dopamin, als auch exogene Sympathomimetika wie Isoproterenol oder Phenylephrin vermindern den Einstrom von Kalziumionen [233]. Anzumerken ist hierbei allerdings, dass der inhibitorische Effekt dieser Katecholamine erst bei hohen Konzentrationen, teilweise oberhalb des physiologischen Bereichs, auftritt [233]. Pharmakologisch kann eine Hemmung der nicht-selektiven Kationenkanäle mittels Amilorid [93] [224], dessen Analogon Ethylisopropylamilorid (EIPA) [228], dem Schleifen-diuretikum Furosemid [204] sowie dem Reverse-Transkriptase-Inhibitor Zidovudin [203] erfolgen. Sofern PGE₂ an der Öffnung jener Kationenkanäle mitwirkt, ist es zudem möglich, deren Aktivierung durch ein Eingreifen in die PGE₂-Synthese abzuschwächen oder zu verhindern [234]. Erreicht werden kann dies sowohl durch die Inhibition des Enzyms PLA₂ mittels Quinacrin als auch durch die Hemmung des Enzyms COX mittels Acetylsalicylsäure oder Diclophenac [234].

An späterer Stelle im Signalweg der Eryptose besteht die Möglichkeit einer Hemmung der Gárdos-Kanäle. Jene kann pharmakologisch mithilfe von Charybdotoxin, Clotrimazol, Nitrendipin oder Nifedipin erfolgen und führt zu einer Verminderung des Kaliumausstroms aus den Erythrozyten [168] [178] [232].

Auch im Ceramid-vermittelten Signalweg des erythrozytären Zelltodes bietet sich die Möglichkeit der inhibitorischen Regulation: Endogen erfolgt eine Hemmung der Sphingomyelinase durch Urea [227], pharmakologisch kann dieses Enzym mittels Amitryptilin inhibiert werden [48]. Beide Hemmstoffe gehen mit einer verminderten Ceramidentstehung einher.

Zusätzlich zu den zuvor dargestellten endogenen Molekülen mit definiertem Angriffspunkt in der Eryptosekaskade gibt es weitere, physiologischerweise vorkommende Hemmstoffe, deren Wirkmechanismen und Zielstrukturen bisher nicht vollständig aufgeklärt sind. Zu dieser Gruppe an Inhibitoren gehört das Molekül NO, welches in niedriger Dosierung die Eryptose zu verhindern mag [293]. Zum einen ist dabei denkbar, dass NO zumindest teilweise einen hemmenden Einfluss auf die nicht-selektiven Kationenkanäle ausübt, zum anderen könnte das Molekül auch eine Nitrosylierung erythrozytärer Proteine bewirken und dadurch deren antiapoptotische/-eryptotische Wirkung fördern [293]. Zu beachten ist, dass hohe Konzentrationen an NO eine gegenteilige Wirkung zeigen, indem sie die Auslösung des gesteuerten Zelltodes der Erythrozyten fördern [197] [293]. In Übereinstimmung mit der beschriebenen Eryptosehemmung durch das Molekül NO zeigt auch das Peptidhormon Endothelin 1 eine inhibitorische Wirkung auf den gesteuerten Zelltod [118]. Als zugrundeliegender Mechanismus erscheint eine Aktivierung des Endothelin B Rezeptors mit anschließender Stimulation der NO-Synthase denkbar [314]. Folglich könnte also auch hier das Molekül NO die Eryptose negativ regulieren [118]. Ebenfalls ist als endogener Inhibitor das Nukleosid Adenosin zu nennen, welches das Ausmaß des gesteuerten, erythrozytären Zelltodes abschwächt [296]. Berücksichtigt werden muss an dieser Stelle, dass für die inhibitorische Wirkung Adenosinkonzentrationen oberhalb des physiologischen Bereichs notwendig sind [296].

Schließlich sind noch solche exogenen, pharmakologischen Hemmstoffe der Eryptose anzuführen, deren exakte Wirkweisen oder Angriffspunkte – wie eben schon bei den endogenen Inhibitoren – inkomplett beschrieben sind (Tabelle 2).

Tabelle 2: Pharmakologische Hemmstoffe der Eryptose modifiziert nach [212].

Eryptosehemmstoff	Referenz
Blebbistatin	[215]
Koffein	[111]
Naringin	[347]
Nitroprussid (NO-Donator)	[293]
Papanonoat (NO-Donator)	[293]
Resveratrol	[316]
Salidroside	[318]
Trolox	[114]
Xanthohumol	[317]

1.3.6 Physiologische Bedeutung der Eryptose

Die Eryptose stellt – wie zuvor beschrieben – einen gesteuerten Zelltod dar, sie ist sorgfältig reguliert und erfolgt nach einem klaren Prinzip [212] [225]. Eben deswegen wird dem ersteren Ereignis im physiologischen Zustand eine hohe Relevanz zuteil [221]. Die Bedeutung der Eryptose ähnelt dabei derjenigen der Apoptose und liegt in der frühzeitigen Entfernung beschädigter, infizierter oder überschüssiger roter Blutkörperchen [214] [221].

Weisen Erythrozyten Defekte wie einen Energieverlust oder eine schadhafte, lecke Zellmembran auf, so schwellen jene Zellen letztendlich aufgrund einer Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Chloridionen sowie osmotisch-bedingt begleitendem Wassereinstrom an [217] [221]. Die Zunahme des Zellvolumens zieht anschließend die Ruptur der roten Blutkörperchen, also deren Hämolyse (Kapitel 1.1.5) nach sich [221]. Dadurch kommt es zu einer unkontrollierten Freisetzung intrazellulärer Komponenten, welche eine Entzündungsreaktion bedingen können [152]. Weiterhin wird Hämoglobin aus den lysierten Zellen freigesetzt [149] [212] [221]. Der rote Blutfarbstoff vermag nach Filtration in der Niere die dortigen Tubuli zu verstopfen und das Organ zu schädigen [73] [149] [221]. Um diese schwerwiegenden Folgen der Zellruptur zu vermeiden, greift hier die Eryptose ein [225]: Sie geht den eben beschriebenen Mechanismen nach Zellschädigung voran und bezweckt, die Hämolyse abzuwenden [214] [221]. Dabei werden im Rahmen der Eryptose die Gárdos-Kanäle geöffnet [221] [225]. Die roten Blutkörperchen verlieren folglich Kaliumchlorid sowie Wasser und ihr Volumen verringert sich [221] [225]. Durch die Zellschrumpfung wird eine Zellruptur des geschädigten Erythrozyts herausgezögert und möglichst verhindert [221] [232]. Gleichzeitig wird durch die Phosphatidylserinexposition auf der Membran der eryptotischen Zellen die zeitnahe Erkennung und Beseitigung durch Makrophagen erwirkt, aufgrund der zügigen Phagozytose kann die Hämolyse nicht eintreten [104] [152]. Zusammengenommen stellt die Eryptose verglichen mit der Hämolyse also einen schonenden Zelltod mit der Funktion der Eingrenzung schädlicher Folgen dar [214] [221]. Durch die Verhinderung der Zellruptur und seinen fein abgestimmten Ablauf ist der programmierte, erythrozytäre Zelltod nicht-entzündlich und organprotektiv.

Ebenfalls kann eine Infektion der roten Blutkörperchen zu einem gesteigerten Auftreten des programmierten Zelltodes in den letzteren Zellen führen [211]. In diesem Fall werden diejenigen Erythrozyten nach ihrem Eryptoseeintritt rasch aus der Zirkulation entfernt, so dass durch die Eryptose eine Abwehr der Erkrankung ermöglicht wird [214]. Beschrieben ist dieser Zusammenhang für die Protozoonose Malaria: Das Pathogen Plasmodium bewirkt nach Infektion der roten Blutkörperchen über die Ausübung von oxidativem Stress [16] [29] [130] eine Öffnung von nicht-selektiven Kationenkanälen in der erythrozytären Zellmembran [94] [112] [363]. Folglich kommt es zum Einstrom der Kationen Na^+ und Ca^{2+} , welche einerseits für die Ausreifung des Parasits benötigt werden [49] [112] [192], andererseits aber über die oben beschriebenen Signalwege (Kapitel 1.3.3) die Eryptose der Wirtszelle bedingen [49] [225]. Die sterbenden roten Blutkörperchen werden rasch phagozytiert und anschließend gemeinsam mit dem Pathogen Plasmodium abgebaut [222]. Auf diese Weise wird eine Parasitämie begrenzt und die Malariainfektion angegangen [112].

Schließlich besteht die Vermutung, dass der gesteuerte, erythrozytäre Zelltod auch eine regulative Funktion übernimmt, indem entbehrliche oder den physiologischen Bedarf zahlenmäßig überschreitende rote Blutkörperchen mittels der Eryptose ausgemustert werden [214] [223] [315]. Ein derartiger Regulationsmechanismus läuft beispielsweise in der Neonatalperiode ab, um überflüssige und mit fetalem Hämoglobin beladene Erythrozyten aus dem Blutkreislauf zu entfernen [115] [212] [327] [329]. Weiterhin ist auch nach der Rückkehr aus großer Höhe mit dadurch bedingt hoher EPO-Einwirkung und gesteigerter Erythropoiese ein deutlich vermehrtes Verscheiden vor allem junger roter Blutkörperchen auszumachen [214] [223] [329]. Bezeichnet wird letztere Erscheinung als Neozytolyse [7] [223]. Unvollständig geklärt ist allerdings noch, ob dem gesteigerten Zelltod der fetalen Erythrozyten sowie der Neozytolyse die gleichen Mechanismen wie auch der Eryptose zugrunde liegen [115] [214]. Auf diese beschriebene Weise – unter Zuhilfenahme der Eryptose oder auch der Neozytolyse – ergäbe sich für den Organismus folglich die Möglichkeit, die Erythrozytenanzahl zeitnah an die aktuelle Notwendigkeit anzupassen [214] [223] [329]. Der langwierige Regelkreis über die Absenkung der EPO-Konzentration und der

Erythropoiese sowie über das Abwarten des altersbedingten Zelltodes der vorhandenen Erythrozyten könnte somit erheblich verkürzt werden [214] [223].

1.3.7 Pathophysiologische Bedeutung der Eryptose

Neben der zuvor aufgezeigten physiologischen Relevanz und der protektiven Wirkung der Eryptose besteht gleichermaßen eine pathophysiologische Bedeutung des gesteuerten, erythrozytären Zelltodes [221]. Wichtigkeit erlangen die nachteiligen Folgen insbesondere in denjenigen Situationen, in welchen die Eryptose in deutlich gesteigerter Form auftritt und somit die Regulationsmechanismen des betroffenen Organismus beeinträchtigt [211] [212] [214]. Die pathophysiologische Relevanz des gesteuerten, erythrozytären Zelltodes ergibt sich einerseits aus den Folgen eines verstärkt auftretenden Eryptosegeschehens selbst wie im Falle einer Anämie oder thrombotischer Ereignisse [212] [214].

Eryptotische rote Blutkörperchen werden aufgrund ihrer morphologischen Merkmale, insbesondere der Phosphatidylserinexposition, von Makrophagen erkannt und nachfolgend mittels Phagozytose aus der Zirkulation entfernt [104] [338]. Der hieraus resultierende, gesteigerte Verlust an Erythrozyten erfordert deren vermehrte Bildung mittels Erythropoiese, um die physiologische Zellzahl aufrecht zu erhalten [214]. In diesem Zustand ist die erhöhte Syntheserate an einem vermehrten Auftreten von Retikulozyten im peripheren Blut erkenntlich [223]. Übersteigt die phagozytotische Entfernung im Rahmen der Eryptose jedoch die Neubildung der roten Blutkörperchen, so tritt als Folge das Krankheitsbild der Anämie in Erscheinung [214] [223]. Letztere Erkrankung ist definiert als eine Verminderung entweder der Anzahl an Erythrozyten oder des Hämoglobins mit daraus folgender verminderter Sauerstofftransportkapazität und unzureichender Erfüllung des physiologischen Sauerstoffbedarfs [271].

Ebenso vermögen die eryptotischen Zellen durch das exponierte Phosphatidylserin an die Endothelzellen der Gefäßwand zu adhären [44] [72] [74] [123] [304]. Auch dieser beschriebene Pathomechanismus ist insbesondere bei exzessiver Eryptose bedeutend: die gesteigerte Endotheladhäsion der sterbenden

Erythrozyten kann die Ausbildung von Gefäßthromben fördern sowie zu Einschränkungen der Mikrozirkulation führen [44] [72] [380] [392].

Andererseits vermag aber auch das Vorliegen verschiedener Erkrankungen innerhalb eines Patienten das Auftreten der Eryptose zu fördern oder sogar zu erwirken [212] [214] [223].

Zunächst sind eine beträchtliche Anzahl an Erkrankungen aus der Gruppe der hämatologischen Pathologien durch eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber Stressoren und eine erhöhte Rate an gesteuertem, erythrozytärem Zelltod gekennzeichnet [223]. Anzuführen ist hier die Eisenmangelanämie, in deren Rahmen die eisendefizienten roten Blutkörperchen eine Verkürzung ihrer Lebensspanne aufweisen [185]. Pathophysiologisch liegt eine verstärkte Aktivierung der nicht-selektiven Kationenkanäle aufgrund des verringerten Zellvolumens der eisenmangelnden Erythrozyten nahe [172] [185]. Gleichmaßen zeigen sich auch die roten Blutkörperchen beim Vorliegen der hereditären Hämoglobinopathien Thalassämie und Sichelzellanämie vermehrt anfällig gegenüber der Eryptose [26] [229] [380]. Auch im Rahmen der Erbkrankheit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD)-Mangel ist ein erhöhtes Auftreten des gesteuerten, erythrozytären Zelltodes unter Einwirkung von Stressoren zu verzeichnen [229]. Ferner geht auch die Erkrankung an der paroxysmalen nächtliche Hämoglobinurie (PNH) mit einer erhöhten erythrozytären Phosphatidylserinexposition und somit mit einem vermehrten Eryptosegeschehen einher [27].

Ebenso ist bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen begleitend ein vermehrtes Auftreten der Eryptose beschrieben [211] [212]. So zeigt sich im Blut von Patienten, welche an einem Diabetes leiden, ein erhöhter Anteil an roten Blutkörperchen, welche das Phospholipid Phosphatidylserin auf ihrer Zelloberfläche exponieren und dem gesteuerten Zelltod unterliegen [62] [256] [294]. Pathophysiologisch liegen hier – zumindest zum Teil – die vermehrte Entstehung des Ketoaldehyds Methylglyoxal [294] im Rahmen von Hyperglykämien [366] sowie die krankhaften Zuckerüberschreitungen selbst [299] zugrunde. Das Methylglyoxal schädigt die Erythrozyten unter anderem über eine Beeinflussung ihrer Glykolyse mit einhergehender Abnahme des Energieträgers ATP und Verminde-

runge des antioxidativen Tripeptids GSH [294]. Gleichzeitig bewirken die Hyperglykämien ihrerseits die Einwirkung von oxidativem Stress vermittelt über eine Erhöhung der Malondialdehydkonzentration [299], eine gesteigerte Aktivität der Superoxiddismutase [21], die Lipidperoxidation [21] [62], sowie ebenfalls die Abnahme der Glutathionkonzentration [299]. Auch ist ein vermehrtes Vorkommen der Eryptose als eine Folge des metabolischen Syndroms denkbar [212] und für die einbegriffenen Symptome der Adipositas [354], der Hypertonie [311], sowie der Dyslipidämie [311] jeweils sogar beobachtet. Weiterhin gilt der Morbus Wilson, eine genetisch bedingte Krankheit mit Störungen im Kupferstoffwechsel und vermehrter Anreicherung dieses Spurenelementes in verschiedenen Geweben des Körpers [249], als eine Stoffwechselerkrankung mit gesteigertem Eryptosevorkommen [211] [212] [236]. Diagnostisch ersichtlich wird der vermehrte erythrozytäre Zelltod in Form einer milden Anämie [19] [249]. Pathophysiologisch liegt der durch den Morbus Wilson bedingten Eryptose vor allem eine Aktivierung der Sphingomyelinase mit anschließender Ceramidentstehung [236] sowie möglicherweise auch vermehrter oxidativer Stress vermittelt durch die Kupferionen zugrunde [19] [287].

Eine erhöhte Anfälligkeit der roten Blutkörperchen gegenüber der Eryptose und nachfolgend auch gesteigerte Raten an diesem gesteuerten, erythrozytären Zelltod werden weiterhin im Rahmen von Organinsuffizienzen beobachtet. Als wichtigstes Beispiel soll hier die chronische Niereninsuffizienz aufgeführt werden [211] [212]. Patienten mit letzterem Krankheitsbild weisen vermehrt Phosphatidylserin-exponierende, eryptotische Erythrozyten in ihrem Blut auf [1] [42] [286] [313]. Zudem gehen Niereninsuffizienzen regelmäßig mit Anämien einher [206], welche neben dem aus der Grundkrankheit resultierenden Erythropoietinmangel [17] und dem häufig begleitenden Eisenmangel [17] [206] auch durch die erhöhte Eryptoserate mitbedingt werden [1] [216]. Der Eryptose als Folge der Niereninsuffizienz liegt pathophysiologisch sowohl vermehrter oxidativer Stress [13], eine Hyperphosphatämie [371] sowie die Anhäufung toxischer Substanzen wie Vanadat [120], Acrolein [5], Indoxylsulfat [4] und Methylglyoxal [238] [294] zugrunde. Die akute Herzinsuffizienz stellt ein weiteres Organversagen dar, bei welchem die Möglichkeit des Auftretens eines erhöhten Eryptosegeschehen

besteht [18] [262]. Ebenfalls sind an dieser Stelle Leberschäden sowie Leberinsuffizienzen anzuführen, beide Pathologien bewirken vermehrt eine Phosphatidylserinexposition auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen sowie deren gesteuerten Zelltod [210] [213].

Überdies zeigen die roten Blutkörperchen auch unter Einwirkung verschiedener infektiöser Erkrankungen sowie deren Maximalform, der Sepsis, eine vermehrte Exposition des Phosphatidylserins auf ihrer Zelloberfläche und ein gesteigertes Auftreten ihres gesteuerten Zelltodes [211]. Beschrieben ist das erhöhte Eryptosegeschehen beispielsweise für Infektionen an dem Bakterium *Mycoplasma* [107] [211], durch das Toxin Listeriolysin im Rahmen einer Infektion an dem Bakterium *Listeria monocytogenes* [119] oder auch im Fall der Protozoonose Malaria [112] [222]. Der gesteuerte, erythrozytäre Zelltod ist unter den Krankheitsumständen einer Sepsis besonders ausgeprägt [184] [211]. Diese Blutvergiftungen können in ihrer Folge zudem von Anämien begleitet werden, wobei die Eryptose als eine mitwirkende Ursache an letzterer Blutarmut betrachtet wird [184]. Pathophysiologisch kommt in der Entwicklung des Sepsisvermittelten gesteuerten Zelltodes der roten Blutkörperchen der Ceramidentstehung eine hohe Bedeutung zu [184].

Auch im Rahmen von malignen Neoplasien vermag der gesteuerte, erythrozytäre Zelltod vermehrt aufzutreten [209] [211] [212]. Beschrieben sind erhöhte Expositionen des Phospholipids Phosphatidylserin und ein vermehrtes Eryptosegeschehen beispielsweise für Lungenkarzinome [36] und das Myelodysplastische Syndrom [27]. Klinische Relevanz erlangt die Eryptose in den letzteren Krankheitsbildern aufgrund der Tatsache, dass die Krebserkrankungen häufig mit einer Anämie einhergehen [125] [129], welche ihrerseits durch den gesteuerten, erythrozytären Zelltod mitbedingt oder verschlechtert werden kann [209]. Als ein möglicher Auslöser der Eryptose in Folge von bösartigen Neubildungen ist das Vorhandensein von Faktoren im Blutplasma beschrieben, welche in zelltodfördernder Weise auf die roten Blutkörperchen einwirken [209]. Diese Erkenntnis leitet sich aus der Beobachtung ab, dass die Erythrozyten gesunder Probanden nach einer Inkubation mit dem Plasma von an Lungenkrebs erkrankten Patienten eine signifikant höhere Phosphatidylserinexposition auf ihrer Zelloberfläche

aufweisen [36]. Weiterhin ist auch die Mitwirkung eines Eisenmangels, welcher eine Krebserkrankung oftmals begleitet [129] [248], an der Induktion der Eryptose denkbar [209]. Erschwerend kommt hinzu, dass viele der in der antineoplastischen Therapie eingesetzten Zytostatika selbst den gesteuerten, erythrozytären Zelltod fördern (Tabelle 3) [36] [209].

Tabelle 3: Zytostatika mit fördernder Wirkung auf die Eryptoseauslösung modifiziert nach [209].

Klinisch eingesetzte Zytostatika	Referenz
Bexaroten	[6]
Carmustin	[170]
Cisplatin	[260]
Mitotan	[163]
Oxaliplatin	[106]
Paclitaxel	[231]
Sorafenib	[254]
Sunitinib	[346]
Topotecan	[35]

1.4 Testsubstanzen

1.4.1 Costunolid

Das Xenobiotikum Costunolid stellt einen sekundären Pflanzenstoff dar und zählt – als ein Terpenderivat – zur Stoffklasse der Sesquiterpenlactone [190] [242]. Jene chemische Verbindung wurde 1960 erstmals durch Isolierungen aus der Kostuswurzel (*Saussurea lappa*) gewonnen [190] [320], ist natürlicherweise aber in verschiedenen Heilpflanzen enthalten [242] [243] [246]: Insbesondere Pflanzenarten aus der Familie der Korbblütler (*Asteraceae*), wie unter anderem eben die Kostuswurzel oder der echte Alant (*Inulea helenium*) [60], aber auch Vertreter weiterer Pflanzenfamilien wie der echte Lorbeer (*Laurus nobilis*) schließen Costunolid als Inhaltsstoff ein [243].

Chemisch betrachtet, weist das letzere Sesquiterpenlacton die Summenformel $C_{15}H_{20}O_2$ auf [190]. Strukturell handelt es sich um ein aus zehn Kohlenstoffatomen aufgebautes, ringförmiges Grundgerüst, welches mit einer funktionellen Gruppe, dem α -Methylen- γ -Butyrolacton, verknüpft ist [242] (Abbildung 6).

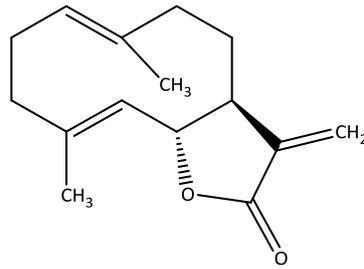


Abbildung 6: Chemische Struktur des Sesquiterpenlactons Costunolid, Strukturformel erstellt in ChemDraw 19.1.

Dem α -Methylenrest des Lactons, auch als exozyklisches Methylen bezeichnet, wird dabei die hauptsächliche Bioaktivität des Costunolids zugeschrieben [64] [190] [243] [322]: Aufgrund seiner ausgeprägten elektrophilen Reaktivität reagiert der Methylenrest unter anderem mit der Thiolgruppe innerhalb der Aminosäure Cystein und vermag auf diese Weise Einfluss auf cysteinhaltige Proteine zu nehmen [190] [322] (Abbildung 7).

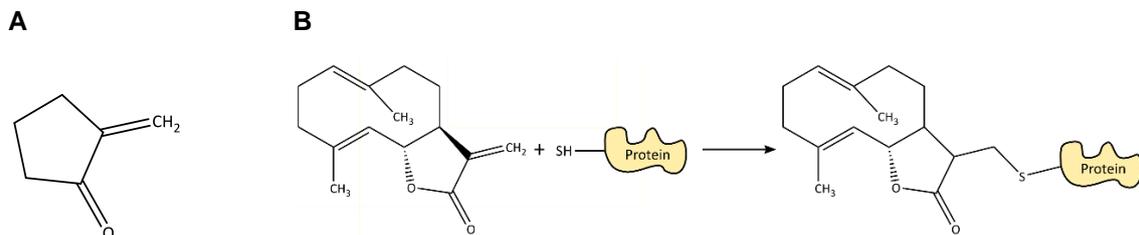


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Reaktion von Costunolid mit Reaktionspartnern modifiziert nach [242], Strukturformeln erstellt in ChemDraw 19.1. A Funktionelle Gruppe: α -Methylen- γ -Butyrolacton. B Chemische Reaktion zwischen dem α -Methylenrest des Lactons von Costunolid und Reaktionspartnern mit einer Thiolgruppe.

In der medizinischen Forschung stößt das Xenobiotikum Costunolid aufgrund seiner vielfältigen biologischen Aktivität auf Interesse [242] [243]. Als bedeutendste Wirkung ist dabei ein antineoplastischer Effekt anzuführen [190] [243] [337], wobei dieser sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben ist [69] [243]. Auf eine Vielzahl an malignen Tumorzelllinien, unter anderem Leukämien [60], Leberzellkarzinome [246], Mammakarzinome [69] [335], Ovarialkarzinome [384], Blasenkarzinome [321] sowie Sarkome [199] [388], übt Costunolid eine Zytotoxizität aus und gilt aus diesem Grund als interessant für die klinische Anwendung [243]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der antineoplastischen

Wirkung sind bisher unvollständig geklärt, allerdings ist anerkannt, dass das Sesquiterpenlacton die malignen Tumoren auf verschiedenen Ebenen beeinflusst [243]. So wird neben einer vermehrten Apoptoseinduktion gegenüber Tumorzellen [199] [243] [388] auch eine Proliferationshemmung [243] [246] [339], eine Hemmung der Angiogenese [243] [337], eine Verhinderung der Invasion und Metastasierung [69] [243], eine Differenzierungsförderung [191] [243] sowie eine Umkehrung möglicher Medikamentenresistenz aufgezeigt [243] [384]. Überdies ist dem letzteren Sesquiterpenlacton eine antiinflammatorische Wirkung zugeordnet [59] [190] [337] [339]. Auch im Bereich des metabolischen Systems ruft Costunolid vorteilhafte Effekte hervor, indem es sowohl antidiabetisch wirkt [190], als auch vor gastrointestinalen Ulzera [389] und hepatischen Schädigungen schützt [242] [376]. Bezüglich des Nervensystems sind neuroprotektive Effekte beschrieben [144] [190] und im Bereich des skelettalen Systems bewirkt dieses Xenobiotikum eine vorteilhafte Wirkung auf den Knochenumbau durch Förderung der Osteoblasten- und Hemmung der Osteoklastendifferenzierung [68] [190] [240]. Zuletzt weist Costunolid eine antibakterielle [253] [308], eine antivirale [66] und eine antifungale [22] Aktivität auf [190].

Auf molekularer Ebene vermittelt das Sesquiterpenlacton Costunolid seine Wirkung durch Ausübung von oxidativem Stress [321] [388] sowie durch eine Interaktion mit oder Beeinflussung von verschiedenen Molekülen, Enzymen und Signalwegen [190]. Entsprechend ist eine Herunterregulierung proinflammatorischer Zytokine, wie dem IL-1 β , dem IL-6, dem IL-17 und dem TNF- α beschrieben [337]. Auch auf mehrere Wachstumsfaktoren, unter anderem den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [337] oder den Transforming Growth Factor β (TGF β) [337], ebenso wie auf Transkriptionsfaktoren, beispielsweise der Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (NF- κ B) [69] [190] [376], übt jenes Xenobiotikum eine modulierende Wirkung aus. Weiterhin stellen auch verschiedene zellständige Kinasen, wie unter anderem Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) oder die Proteinkinase B (AKT) Zielstrukturen der Beeinflussung durch Costunolid dar [60] [190] [307]. Daneben bewirkt Costunolid in entsprechend inkubierten Zellen die Auslösung des programmierten Zelltodes über den intrinsischen Apoptosesignalweg [60] [157]

[321] [388]. Bei dieser dargestellten Betrachtung gilt zu beachten, dass die molekularen Einflüsse des Sesquiterpenlactons Costunolid noch nicht umfassend erfasst und verstanden sind [243].

Aussagen zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, welche Costunolid nach Administration möglicherweise hervorruft, sind aufgrund fehlender Untersuchung bisher nicht evidenzbasiert und nur deutlich begrenzt zu treffen [190] [322].

Im Hinblick auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von Costunolid liegen Daten bezüglich der maximalen Plasmakonzentrationen C_{max} *in vivo* sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Administration innerhalb tierexperimenteller Studien vor [156] [310]. Die mittels oraler Gabe bewirkte maximale Plasmakonzentration C_{max} von Costunolid liegt bei 24 ± 4 ng/ml in Wistar Ratten [156]. Mittels intravenöser Infusion von Costunolid ist eine maximale Plasmakonzentration C_{max} von $12,29 \pm 1,47$ µg/ml in Sprague Dawley Ratten zu erreichen [310]. Die letztere maximale Plasmakonzentration liegt dabei innerhalb des Konzentrationsbereiches von Costunolid, welcher *in vitro* die Apoptoseauslösung Kern-haltiger Zellen bewirkt [190].

1.4.2 Phenoxodiol

Das Xenobiotikum Phenoxodiol wird aufgrund seines strukturellen Aufbaus der Stoffklasse der Isoflavone zugeordnet [71]. Diese Stoffklasse ihrerseits umfasst Wirkstoffe, welche als sekundäre Pflanzenstoffe in verschiedenen Pflanzen enthalten sind und dort bedeutsame Funktionen wie den Ablauf des Zellzyklus oder die Apoptose regulieren [71] [179]. Phenoxodiol selbst allerdings wird synthetisch gewonnen und stellt einen Abkömmling des natürlicherweise vorkommenden Isoflavons Genistein dar [10] [71] [349]. Beide der letztgenannten Wirkstoffe – Phenoxodiol und Genistein – üben eine beeinflussende Wirkung auch auf menschliche Zellen aus, wobei Phenoxodiol eine deutlich gesteigerte biologische Aktivität und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften gegenüber Genistein aufweist [10] [71] [179] [349].

Dem Xenobiotikum Phenoxodiol ist im chemischen Hinblick die Summenformel $C_{15}H_{12}O_3$ zuzuordnen [67]. Entsprechend der Charakteristika der Stoffklasse der

Isoflavone weist Phenoxodiol eine Ringstruktur mit zwei enthaltenen Phenolgruppen auf [10] [355] (Abbildung 8).

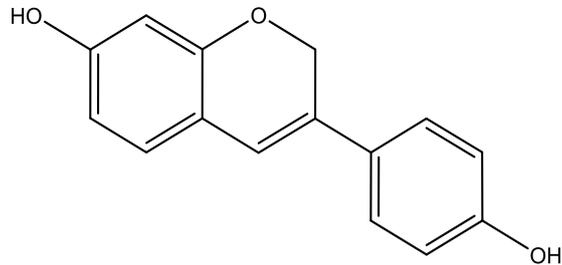


Abbildung 8: Chemische Struktur des Isoflavons Phenoxodiol, Strukturformel erstellt in ChemDraw 19.1.

Für die medizinische Forschung und die klinische Anwendung ist das Xenobiotikum Phenoxodiol aufgrund seiner antineoplastischen Aktivität von Interesse: Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist beobachtet, dass das letztere Isoflavon auf Tumorzellen zytotoxisch wirkt [10] [179]. Weiterhin ermöglicht Phenoxodiol *in vivo* und tierexperimentell eine Umkehrung einer möglichen Chemoresistenz gegenüber gängiger Chemotherapeutika [9] [10] [11].

Im Rahmen präklinischer Studien zeigt das letztere Isoflavon eine breite Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl an Tumorzelllinien [10] [71], wie Ovarialkarzinome [179], Prostatakarzinome [3], Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches [2] und Melanome [195]. Ebenso ist beschrieben, dass Phenoxodiol einerseits Ovarialkarzinomzellen gegenüber den Chemotherapeutika Carboplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und Topotecan sensibilisiert und andererseits sogar in chemoresistenten Ovarialkarzinomzellen wieder eine Anfälligkeit für die Zytostatika bewirkt [9] [11] [71] [179]. Bei der Untersuchung des Xenobiotikums Phenoxodiol innerhalb von klinischen Studien ist keine bis eine geringe antineoplastische Wirkung bei guter Verträglichkeit und überwiegend geringgradiger Toxizität verzeichnet [70] [71] [121] [355].

Aufgrund seiner Einflussnahme auf vielfältige Signalwege und Moleküle wird Phenoxodiol als „Multiple Signal Transduction Regulator“ angesehen [71] [349]. Molekular betrachtet, ruft das letztere Xenobiotikum innerhalb von Tumorzellen sowohl eine vermehrte Induktion der Apoptose als auch eine Umkehrung einer

möglicherweise bestehenden Chemoresistenz hervor [10] [349]. Weiterhin löst Phenoxodiol auch einen Zellzyklusarrest aus [2] [349] und hemmt die Angiogenese [349].

In Bezug auf die Apoptoseauslösung fördert das Isoflavon sowohl den intrinsischen, als auch den extrinsischen Apoptosesignalweg, indem proapoptotische Proteine aktiviert und antiapoptotische Proteine, welche in Tumorzellen vermehrt vorliegen, inhibiert und degradiert werden [10] [349] (Abbildung 9): Phenoxodiol führt über eine Beeinflussung des Sphingomyelinstoffwechsels eine Anhäufung des Sphingolipids Ceramid herbei [349]. Das angereicherte Ceramid bedingt nachfolgend einerseits eine Aktivierung der Procaspase-2 in die Caspase-2, welche anschließend das proapoptotische Molekül Bid in das tBid spaltet [11] [349]. Das tBid selbst wirkt – zusammen mit weiteren proapoptotischen Proteinen – auf die Mitochondrien ein und ruft somit den intrinsischen Apoptosesignalweg mit Freisetzung von Cytochrom C, Smac/DIABLO und der Serinprotease HtrA2/Omi hervor [11] [349]. Wie in Kapitel 1.2.3 aufgezeigt, bedingt Cytochrom C die Aktivierung der Procaspase-9 in die Caspase-9 [349], wohingegen das Molekül Smac/DIABLO und die Serinprotease HtrA2/Omi die IAP binden, inaktivieren und proteolytisch abbauen [349]. Andererseits wirkt das angesammelte Ceramid in hemmender Weise auf die Sphingosinkinase, so dass sich die Menge an intrazellulärem Sphingosin-1-Phosphat reduziert [349]. Infolgedessen wird die Aktivität der AKT negativ beeinflusst, was dann zu einem vermehrten Abbau der AKT selbst, aber auch der IAP und des antiapoptotischen Proteins „FLICE inhibitory Protein“ (FLIP) führt [179] [349]. Durch die Abnahme der IAP vermag sowohl der intrinsische, als auch der extrinsische Apoptose-signalweg gesteigert abzulaufen [179] [349]. Der Wegfall der antiapoptotischen Wirkung des Proteins FLIP resultiert in der vermehrten Aktivierung der Procaspase-8 in die Caspase-8 [179] und fördert somit insbesondere den extrinsischen Apoptotesignalweg, ermöglicht aber auch die weitere Spaltung des Moleküls Bid in das tBid [349].

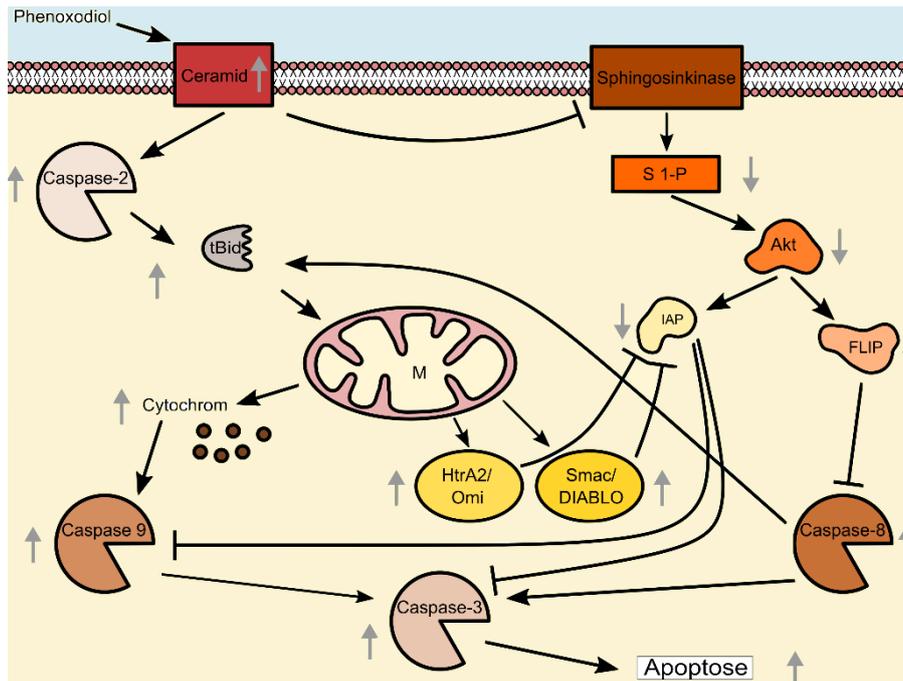


Abbildung 9: Molekulare Wirkweise des Isoflavons Phenoxodiol modifiziert nach [349]. Phenoxodiol bewirkt über eine Beeinflussung des Sphingolipidstoffwechsels einen Anstieg des Ceramids. Das Ceramid seinerseits aktiviert zum einen die Caspase-2 und hemmt zum anderen die Sphingosinkinase. Die aktive Caspase-2 spaltet das Molekül Bid in das tBid, welches über den intrinsischen Signalweg die Freisetzung von Cytochrom C und Proteinen wie Smac/DIABLO und HtrA2/Omi hervorruft. Mittels Cytochrom C erfolgt die Aktivierung der Caspase-9, welche ihrerseits die Effektorcaspase-3 aktiviert. Smac/DIABLO und HtrA2/Omi hemmen die IAP. Durch die Hemmung der Sphingosinkinase wird das zytosolische Sphingosin-1-Phosphat reduziert, wodurch die AKT und nachfolgend auch die IAP und FLIP vermehrt abgebaut werden. Der vermehrte Wegfall des Proteins FLIP resultiert in einer verminderten Hemmung der Caspase-8. Akt = Proteinkinase B; FLIP = FLICE inhibitory Protein; M = Mitochondrion; S-1-P = Sphingosin-1-Phosphat.

Die Umkehrung einer möglichen Chemoresistenz innerhalb von Tumorzellen wird darauf zurückgeführt, dass Phenoxodiol eine Apoptoseinduktion ermöglicht [349]. Durch die Inaktivierung und den vermehrten Abbau antiapoptotischer Proteine bei gleichzeitiger Aktivierung proapoptotischer Proteine erlangen entartete Zellen ihre Fähigkeit zurück, einen gesteuerten Zelltod zu durchlaufen und sind folglich wieder anfällig gegenüber Apoptose-induzierenden Zytostatika [11] [280] [349].

Der ebenfalls von Phenoxodiol hervorgerufene Zellzyklusarrest betrifft den Übergang der Gap 1-Phase (G1-Phase) zur Synthese-Phase (S-Phase) und wird hervorgerufen über eine Phenoxodiol-vermittelte Induktion des Regulatorproteins p21^{WAF1} [2]. Dieses Protein seinerseits inhibiert die Cyclin-abhängige Kinase 2 (Cdk2), wodurch ein Fortschreiten des Zellzyklus verhindert wird [2].

Im Rahmen der Administration an Menschen zeigt sich das Isoflavon Phenoxodiol sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Anwendung als gut verträglich [349] [355]. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Toxizitäten treten – auch im Falle von hohen Dosierungen des Xenobiotikums – überwiegend in milder Ausprägung auf [70] [349] [355]. Beschrieben sind dabei unter anderem hämatologische Auswirkungen wie Lymphozytopenien, seltener Anämien oder Leuko- und Thrombozytopenien [355], gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe oder Leberwerterhöhung [70] [355], sowie Müdigkeit [70], Lethargie, und die Entwicklung von Ausschlägen [70] [349].

Die Pharmakokinetik des Isoflavons Phenoxodiol wurde im Rahmen mehrerer Studien untersucht, sodass *in vivo* Daten sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Administration am Menschen vorliegen. In Folge von oraler Anwendung von 50 µg/kg Körpergewicht Phenoxodiol ist eine Plasmakonzentration von 59,52 µg/ml zu erreichen [11]. Die mittels intravenöser Applikation von 30 mg/kg Körpergewicht Phenoxodiol erzielte maximale Plasmakonzentration C_{max} beträgt $88,7 \pm 25$ µg/ml [355]. Mit diesem Wert liegt die maximale Plasmakonzentration *in vivo* oberhalb derjenigen notwendigen Phenoxodiolkonzentration, um *in vitro* die Apoptose Kern-haltiger Zellen hervorzurufen [2] [3] [179] [355]. Im Hinblick auf die Pharmakodynamik des Phenoxodiols ist aus *in vitro* Studien und aus der molekularen Wirkweise abzuleiten, dass sich der antineoplastische Effekt des letzteren Xenobiotikums proportional zu der Kontaktzeit mit den Tumorzellen verhält [2] [70] [355].

1.4.3 Raloxifen

Das Xenobiotikum Raloxifen wird aufgrund seiner beeinflussenden Wirkung gegenüber Östrogenrezeptoren zu der Arzneistoffgruppe der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren, abgekürzt SERM (selective estrogen receptor modulator), gezählt [282] [284] [342] [353]. Weiterhin wird Raloxifen auch als Antiöstrogen oder nicht-steroidales Antiöstrogen benannt [183] [284], wobei die letzteren Bezeichnungen aufgrund der sowohl östrogenagonistischen, als auch -antagonistischen Wirkweisen unpräzise sind [183] [284] [342]. Raloxifen wurde im Jahr

1982 entwickelt [33] und zählt – nach vorangegangenen Östrogenrezeptor-beeinflussenden Wirkstoffen wie dem Tamoxifen – zur zweiten Generation der Östrogenrezeptor-Modulatoren [33] [353].

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei dem letzteren Xenobiotikum um ein Molekül mit der Summenformel $C_{28}H_{27}NO_4S$ [281] [353]. Anders als die Östrogene, mit welchen der selektive Östrogenrezeptor-Modulator um die Bindungsstellen an den Östrogenrezeptoren kompetitiert, weist Raloxifen keinen steroidalen Aufbau auf, sondern wird, bezogen auf seine Struktur, den Benzothiophen-derivaten zugeordnet [183] [284] (Abbildung 10).

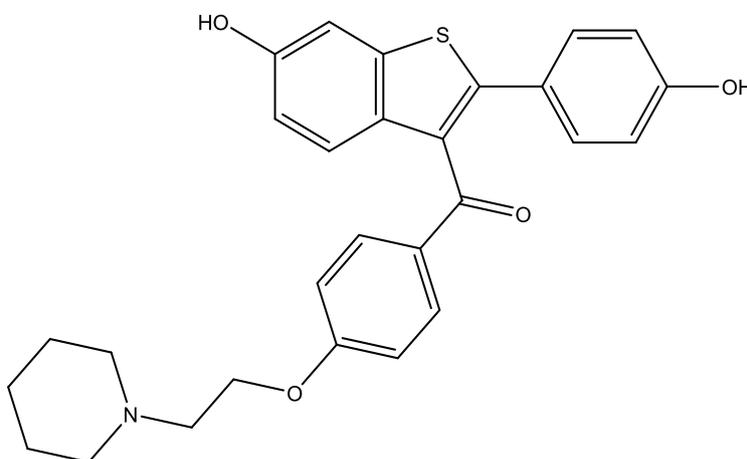


Abbildung 10: Chemische Struktur des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators Raloxifen, Strukturformel erstellt in ChemDraw 19.1.

Im klinischen Bereich findet der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen insbesondere Anwendung in der Osteoporoseprophylaxe sowie in der Behandlung manifester Osteoporosen bei postmenopausalen Frauen und ist für diese Indikation sowohl in den USA als auch in Europa zugelassen [245] [353]. Raloxifen weist eine östrogenagonistische Wirkung auf das Knochengewebe auf und beeinflusst daher den Stoffwechsel und die Mineralisation des Knochens in förderlicher Weise [86] [154] [183] [245] [252] [342]. In Folge von Medikation mit dem letzteren Xenobiotikum zeigten sich im Rahmen klinischer Studien geringere Raten an Knochenfrakturen im Bereich der Wirbelsäule [99] [245] [252] [342].

Weiterhin übt Raloxifen einen östrogenantagonistischen Einfluss auf das Brustgewebe aus [245]. Aufgrund dieser Eigenschaft wird der letztere selektive Östrogenrezeptor-Modulator als wirksam für den Gebrauch in der Chemoprävention von Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen bei risikobehafteten oder von Osteoporose betroffenen Frauen angesehen [183] [245] [342]. Die Zulassung des Raloxifens wurde daher in den USA um diese Anwendung erweitert, innerhalb von Europa ist der Wirkstoff allerdings nicht zur Mammakarzinomprävention zugelassen [245]. Raloxifen zeigt im Gegensatz zu Tamoxifen eine östrogenantagonistische Wirkung auf das Endometrium [46] [183] [245] [284] und wird daher nicht als risikosteigernd in Bezug auf Endometriumkarzinome angesehen [154] [281] [284] [353]. In klinischen Studien und Reviews wird Raloxifen als ähnlich antineoplastisch wirksam – bei erhöhter Sicherheit im Vergleich zu Tamoxifen – eingeschätzt [23] [58] [183] [372] [374].

Zuletzt wirkt Raloxifen auch in antiarterogener Weise [183], indem es eine Absenkung der Lipide mit niedriger Dichte, wie das Low-Density-Lipoprotein (LDL) oder das Lipoprotein(a), hervorruft [342]. Tierexperimentell konnte eine Verminderung von arterogener Plaque innerhalb der Aorta nach Gabe jenes selektiven Östrogenrezeptor-Modulators nachgewiesen werden [38]. Innerhalb von klinischen Studien war allerdings keine Senkung der Rate an kardialen Ereignissen wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle infolge der Einnahme des Raloxifens nachzuweisen [23] [342].

Die molekulare Wirkweise von Raloxifen ist nicht vollständig verstanden und aufgeklärt [154] [183] [284]. Bekannt ist, dass das letztere Xenobiotikum mit den natürlicherweise vorhandenen Östrogenen um die Bindungsstelle an den verschiedenen Östrogenrezeptoren kompetitiert [154] [284]. Durch die Bindung von Raloxifen an den Östrogenrezeptor wird letzterer in seiner Konformation verändert [58] [183] [284] [342]. Diese Konformationsänderung ihrerseits beeinflusst nachfolgend die Rekrutierung und Interaktion mit verschiedenen transkriptionellen Koaktivatoren [58] [183] [342] und dadurch insgesamt die Gentranskription [58] [342]. Die gewebeabhängigen östrogenagonistischen oder -antagonistischen Wirkungen des Raloxifens werden darauf zurückgeführt, dass in den verschiedenen Körpergeweben unterschiedliche transkriptionelle Koaktivatoren

vorliegen [342]. Weiterhin ist *in vitro* festgestellt worden, dass Raloxifen innerhalb von maligne entarteten Endometriumzellen den intrinsischen, mitochondrial-vermittelten Signalweg induziert und hierüber die Apoptose herbeiführt [282].

Raloxifen besitzt in Bezug auf die klinische Anwendung am Menschen eine gute Verträglichkeit [86] [252] [281] [342] [353]: Schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie thromboembolische Ereignisse treten nur selten auf [245] [281] [342]. Ansonsten sind dem selektiven Östrogenrezeptor-Modulator auch trotz Langzeitanwendung bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zugeschrieben [183]. Leichtere und moderate unerwünschte Arzneimittelwirkungen im Zusammenhang mit einer Raloxifentherapie umfassen insbesondere Brustspannen, Hitzewallungen mit Hautrötung (Flush), Wadenkrämpfe, Gewichtszunahme oder Ödeme und das Auftreten von grippeähnlichen Symptomen [99] [183] [281] [342].

Die pharmakokinetischen Eigenschaften des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators Raloxifen sind sowohl innerhalb von tierexperimentellen Untersuchungen, als auch innerhalb von Studien an Menschen ermittelt worden. In Bezug auf die maximale Plasmakonzentration C_{max} ist bei oraler Administration von gelöstem Raloxifen an Wistar Ratten ein Plasmakonzentrationsmaximum von $47,3 \pm 1,2$ $\mu\text{g/ml}$ dokumentiert [180]. Wird der selektive Östrogenrezeptor-Modulator den Wistar Ratten in Form von beladenen Mizellen verabreicht, so ist eine maximale Plasmakonzentration C_{max} von $64,09 \pm 1,3$ $\mu\text{g/ml}$ zu erzielen [180]. In Menschen liegt die maximale Plasmakonzentration C_{max} nach einmaliger Administration von 60 mg Raloxifen per os bei 0,5 ng/ml [154] [281] [353] und nach einmaliger Administration von 185 mg Raloxifen per os bei 12,5 ng/ml [281] [353]. Bei Vorliegen von Leberfunktionsstörungen kommt es, aufgrund der hepatischen Verstoffwechslung des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators, ebenfalls zu Anstiegen der plasmatischen Raloxifenkonzentration [154] [281] [353]. Die innerhalb der tierexperimentellen Studien erreichten maximalen Plasmakonzentrationen umfassen den Konzentrationsbereich des Raloxifens, welcher *in vitro* in maligne entarteten Zellen deren Apoptose hervorruft [282].

1.4.4 Taurolidin

Das Xenobiotikum Taurolidin ist ein synthetischer Abkömmling der natürlicherweise im menschlichen Stoffwechsel auftretenden Aminosulfonsäure Taurin [174] [288]. Die erstmalige Gewinnung jenes Taurinderivates erfolgte um das Jahr 1970 durch Geistlich-Pharma, Inc [61] [288].

In Bezug auf seine chemischen Eigenschaften ist Taurolidin durch die Summenformel $C_7H_{16}N_4O_4S_2$ charakterisiert [160] [288]. Strukturell handelt es sich bei diesem Xenobiotikum um ein Dimer, aufgebaut aus zwei gleichartigen Taurinamidringen, welche über eine Methylgruppe miteinander verknüpft sind [160] [288] (Abbildung 11).

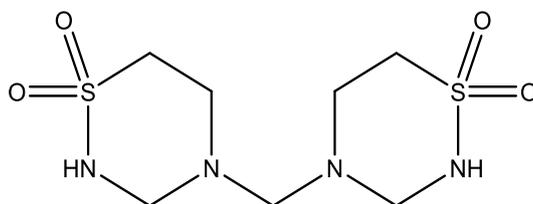


Abbildung 11: Chemische Struktur des Taurinderivates Taurolidin, Strukturformel erstellt in ChemDraw 19.1.

Dem letzteren Taurinderivat kommt sowohl in der medizinischen Forschung, als auch in der klinischen Anwendung Interesse und Bedeutsamkeit zu: So zeigt Taurolidin eine breite antibakterielle Aktivität, indem es auf gram-positive und gram-negative Bakterien, sowohl Aerobier, als auch Anaerobier, bakterizid wirkt [61] [174] [288] [345] [348] [367]. Auch gegenüber den in gram-negativen Bakterien enthaltenen Endotoxinen übt das letztgenannte Xenobiotikum eine Hemmung aus [135] [288]. Trotz mittlerweile langzeitigem klinischen Einsatz sind bislang keine bakteriellen Resistenzen aufgetreten [174] [288]. Entsprechend dieser Effekte findet Taurolidin zum einen als antibakterielle Katheterlocklösung zur Verhinderung Katheter-assoziierten Infektionen Anwendung [133] [174] [312]. Zum anderen weisen die Ergebnisse klinischer Studien darauf hin, dass auch ein Einsatz dieses Taurinderivates im Rahmen bakterieller Peritonitiden möglicherweise eine vorteilhafte Wirkung zu zeigen vermag [133] [135] [244] [288]. Zusätzlich zu seiner antimikrobiellen Aktivität hemmt Taurolidin auch Entzündungs-

geschehen [288]. Weiterhin wirkt das letztere Taurinderivat Zelladhärenzen entgegen, so dass durch die klinische Anwendung beispielsweise eine Verhinderung postoperativer, peritonealer Verwachsungen ermöglicht wird [20] [61] [98] [288]. Schließlich gilt die antineoplastische Wirkung, welche Taurolidin gegenüber maligne entarteten Zellen bewirkt, als bedeutsam [288]. Innerhalb einer Vielzahl an Tumorzelllinien, wie beispielsweise malignen Gliomen [332], Lungenkarzinomen [61], Ösophaguskarzinomen [80], Gallenblasenkarzinomen [161], Kolonkarzinomen [61] [161] [162] [270], Prostatakarzinomen [61] [83], Osteosarkomen [375] oder Melanomen [61] [360], wird das Zellwachstum in Folge einer Taurolidinbehandlung *in vitro* vermindert. Auch tierexperimentell ist eine Reduktion der Tumormasse sowie des Metastasierungsgeschehens beschrieben [61] [83] [155] [270] [360]. *In vivo*-Studien im menschlichen Organismus zeigten eine antineoplastische Aktivität des Taurolidins gegenüber Glioblastomen [357] und einem Magenkarzinom [53], sowie eine verbesserte Verträglichkeit von zytostatischen Melanomtherapien bei kombinierter Anwendung [288] [300]. Die antineoplastische Wirksamkeit des letzteren Xenobiotikums wird – zumindest in Teilen – auf eine gesteigerte Apoptoseinduktion, eine Verminderung der Tumorzelladhäsion, eine Hemmung der Angiogenese und des Entzündungsgeschehens sowie eine postoperative, gegen die malignen Zellen gerichtete Immunmodulation zurückgeführt [79] [288].

Auf der molekularen Ebene werden die oben aufgezeigten Wirkungen des Taurolidins einer Interaktionen mit verschiedenen Molekülen und einer Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege zugeschrieben. Dabei sind die genauen zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt und verstanden [288].

Seinen antibakteriellen Effekt ruft das Xenobiotikum durch eine chemische Modifikation von Zielstrukturen innerhalb von Bakterien hervor [288]: Taurolidin wird nach der Administration im Organismus in seine biologisch aktiven Komponenten Taurultam, N-Methyloltaurultam, Taurinamid und N-Methyloltaurinamid hydrolysiert [160] [188] [288]. Die beiden N-Methylol-haltigen Moleküle interagieren durch chemische Bindung mit Proteinbestandteilen der bakteriellen Zellwand [160] [174] [188] [288]. Hierdurch werden sowohl die Bakterien selbst negativ be-

einflusst und unter anderem in ihrer Adhäsionsfähigkeit eingeschränkt, als auch deren zellwandständige Toxine inaktiviert [135] [160] [367].

Die entzündungshemmende Aktivität bewirkt das Taurolidin über eine Herunterregulierung proinflammatorischer Botenstoffe [288]. Sowohl das IL-1, das IL-6 und das IL-8, als auch der TNF- α werden in Folge der Wirkung des Taurinderivates gehemmt [30] [267] [288] [344].

Seine antineoplastische Wirkung vermittelt Taurolidin über verschiedene molekulare Mechanismen. Das Xenobiotikum fördert sowohl den extrinsischen, als auch den intrinsischen Signalweg der Apoptose innerhalb von Tumorzellen [288]: Den extrinsischen Signalweg bedingt das Taurinderivat dabei durch eine Stimulation des membranständigen Fas-Rezeptors und anschließender Aktivierung der entsprechenden Caspasen [52] [288] [332] [359]. In den intrinsischen Signalweg greift Taurolidin ein, indem es unter anderem eine mitochondriale Permeabilitätssteigerung und dadurch die Freisetzung von Cytochrom C hervorruft [83] [288]. Gleichzeitig fördert das letztere Xenobiotikum das Ablaufen dieses Signalweges durch eine Erhöhung des proapoptotischen Proteins Bax sowie durch eine Herunterregulierung antiapoptotischer Proteine wie beispielsweise Bcl-2 und Mcl-1 [288] [303] [360]. Zusätzlich zu dieser Steigerung der Apoptoseinduktion vermindert Taurolidin die Fähigkeit von Tumorzellen zur Zelladhäsion [375], unter anderem durch eine reduzierte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin [41] [288]. Weiterhin wirkt Taurolidin antineoplastisch, indem es über eine verminderte Synthese angiogenetischer Proteine wie dem VEGF die Gefäßneubildung negativ beeinflusst [288] [332]. Auch die oben beschriebene Herunterregulierung proinflammatorischer Mediatoren und dadurch die Hemmung des Entzündungsgeschehens selbst wird als immunitätsfördernd und somit als antineoplastisch wirksam angesehen [79] [288]. Zuletzt gilt zu erwähnen, dass Taurolidin gezielt innerhalb von Tumorzellen oxidativen Stress auslöst und jene dadurch schädigt [279] [332].

Das Xenobiotikum Taurolidin zeigt im Rahmen der medikamentösen Therapie am Menschen eine gute Verträglichkeit [133] [288]: Während seiner Verwendung über mittlerweile mehrere Jahrzehnte sind nur wenige und überwiegend milde

Nebenwirkungen aufgetreten [288]. So zeigten sich Venenreizungen bei intravenöser Applikation hoher Taurolidinkonzentrationen über periphere Venen [133] [288] und brennende Schmerzen bei intrakavitärer Instillation [133] [188]. *In vitro* wurde weiterhin eine Schädigung an Leberzelllinien festgestellt [105]. Aufgrund dieser geringfügigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen – und vor allem einer fehlenden Beeinflussung der Leukopoiese – gilt Taurolidin als gut mit Chemotherapeutika kombinierbares Xenobiotikum [53] [288].

In Bezug auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Taurolidins liegen Daten aus *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt an humanem Blutplasma sowie Vollblut und am Menschen selbst vor [133] [358]. Die Verabreichung des Taurinderivates ist bisher auf einer Vielzahl an verschiedenen Administrationswegen, unter anderem oral, intravenös, intrakavitär, hierbei insbesondere intraperitoneal, und topisch vorgenommen worden [288]. In Folge intravenöser Taurolidingabe *in vivo* am Menschen ist eine maximale Plasmakonzentration C_{max} des Taurolidins im Bereich von 20-100 µg/ml erzielt worden [332] [358]. Mit dieser Konzentrationsspanne liegt die maximale Plasmakonzentration *in vivo* innerhalb desjenigen Konzentrationsbereiches von Taurolidin, welcher *in vitro* die Apoptose Kern-haltiger Zellen hervorruft [61] [133] [270] [290] [332] [358].

1.5 Zielsetzung der Dissertation

Die vorliegende Dissertation strebt an, neue, bisher nicht bekannte Regulatoren der Eryptose festzustellen und diese nachfolgend eingehender auf ihre Wirkungsweisen hin zu untersuchen. Hierdurch sollen das aktuelle Wissen über den programmierten, erythrozytären Zelltod erweitert und die grundlagenforschungsbezogenen Erkenntnisse bezüglich der Beeinflussungsmöglichkeiten der Eryptose vorangebracht werden. Derartige Forschungsergebnisse bieten zukünftig die Möglichkeit, in der klinischen Praxis Arzneimitteltherapien besser zu individualisieren und an Begleiterkrankungen wie beispielsweise Anämien oder Thrombosen anzupassen sowie andererseits Medikamente mit stimulierender oder inhibierender Wirkung je nach Grunderkrankung – beispielsweise Malaria oder eben Anämien – gezielt einzusetzen.

Zu diesem Zweck erfolgt in den nachfolgend dargestellten Studien eine Überprüfung von Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen und Taurolidin bezüglich ihrer Eryptose-modulierenden Wirkung *in vitro*. Die beiden Xenobiotika Costunolid und Phenoxodiol werden aufgrund ihrer breiten antineoplastischen Aktivität sowie ihrer weiteren vorteilhaften Wirkungen im Hinblick auf einen klinischen Einsatz erforscht [10] [179] [242] [243]. Der selektive Östrogenrezeptormodulator Raloxifen und das Taurinderivat Taurolidin finden bereits als Arzneimittel Anwendung [133] [174] [245] [312] [353]. Allen dieser letztgenannten Testsubstanzen ist dabei gemeinsam, dass ihnen bereits eine Apoptose-auslösende Aktivität gegenüber Kern- und Mitochondrien-haltiger Zellen zugeschrieben ist. Vor diesem Hintergrund erscheint daher auch eine Beeinflussung der Eryptose als denkbar.

Die Untersuchung einer möglichen Wirkung der oben aufgeführten Xenobiotika auf den programmierten Erythrozytentod erfolgt mittels durchflusszytometrischer Beurteilung der roten Blutkörperchen auf charakteristische Eryptosemerkmale. Im Rahmen weiterführender Versuche wird nach der initialen Bestätigung einer Eryptose-fördernden Wirkung zusätzlich eine Aufschlüsselung der hierbei involvierten Signalwege angestrebt.

2 Materialien und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen und durchgeführten, experimentellen Studien einschließlich der Gewinnung roter Blutkörperchen durch die Blutentnahme an gesunden Probanden sind von der Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen geprüft und genehmigt (184/2003 V).

Für die Durchführung der Versuche wurden sowohl humane rote Blutkörperchen, als auch unterschiedliche Lösungen (Kalzium-haltige Ringer-Lösung (0,541 g/l), Kalzium-freie Ringer-Lösung, Annexin-Waschpuffer, Phosphate buffered Saline-Bovine Serum Albumin-Lösung (PBS-BSA-Lösung)), die verschiedenen Xenobiotika (Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen, Taurolidin) sowie diagnostische Substanzen (Annexin V-FITC, Fluo-3-AM, DCFDA, Ceramid-spezifische Primär- und fluoreszierende Sekundärantikörper) zur Messung am Durchflusszytometer verwendet. Die aufgeführten Materialien werden in den nachfolgenden Abschnitten genauer erläutert.

2.1 Erythrozyten

Die humanen Erythrozyten, welche für die unten beschriebenen Untersuchungen der Eryptose benötigt wurden, wurden in Form von Lithium-Heparin-antikoaguliertem Vollblut von der Blutbank der Eberhard Karls Universität Tübingen bereitgestellt. Das Vollblut entstammte freiwilligen und gesunden Probanden, deren schriftliche Einwilligung zur weiteren Verwendung jener Blutproben vorliegt [108] [109] [110].

Im Rahmen der Aufbereitung des Vollbluts erfolgte die Isolierung der Erythrozyten von Plasma, sowie Leuko- und Thrombozyten. Dazu gaben wir unter einer Sterilbank jeweils 1 ml des Vollblutes in 3 ml Kalzium-haltige Ringer-Lösung und zentrifugierten die dadurch entstandene Suspension anschließend für 20 Minuten bei 21° C mit 120 Relative Centrifugal Force (RCF). Den hierbei entstandenen Überstand bestehend aus Plasma, weißen Blutkörperchen und

Blutplättchen pipettierten wir nachfolgend ab und verwarfen diesen, die nun isolierten roten Blutkörperchen transferierten wir in autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße. Gelagert wurden die Erythrozytenproben bei einer Temperatur von +4° C für höchstens zwei Tage [108] [109] [110].

Für die Durchführung der anschließenden Versuche wurden die isolierten Erythrozyten jeweils mit Kalzium-haltiger oder Kalzium-freier Ringer-Lösung auf einen Hämatokrit von 0,4 % resuspendiert [108] [109] [110].

2.2 Lösungen

2.2.1 Ringer-Lösung

Die Ringer-Lösung wurde vielfach in den Versuchsdurchführungen angewendet: Neben dem Gebrauch bei der Isolierung der Erythrozyten fand jene Flüssigkeit auch zur Herstellung von Lösungen aus den Testsubstanzen, zur Inkubation, zur Herstellung von Lösungen aus einigen der Diagnostika sowie zum Waschen der Versuchsansätze Verwendung. Dieser breite Einsatzbereich der Ringer-Lösung ermöglicht sich aufgrund der Tatsache, dass die roten Blutkörperchen für ihr Überleben nur auf wenige Stoffwechselabläufe angewiesen sind. Jene Lösung ist somit ausreichend, um die erythrozytäre Ionenhomöostase aufrecht zu erhalten und den Energiebedarf der Erythrozyten mittels der enthaltenen Glukose zu decken. Die Ringer-Lösung weist einen physiologischen pH-Wert von 7,4 auf.

Die Zusammensetzung der Ringer-Lösung ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Letztere Lösung wurde nach ihrer Anfertigung mittels einer Stericup® Filtereinheit der Firma Merk Millipore (Burlington, USA) gefiltert und zwischen der Verwendung für die Versuche bei einer Temperatur von +4°C gelagert.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Ringer-Lösung.

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g] für 1 l Ringer-Lösung
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
HEPES (N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N-2-Ethansulfonsäure)	32	7,674
Glukose	5	0,901

CaCl ₂	1	0,541
H ₂ O		982,798

2.2.2 Kalzium-freie Ringer-Lösung

Die Kalzium-freie Ringer-Lösung wurde im Rahmen der Versuchsdurchführung eingesetzt, um die Wirkung der Xenobiotika Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen und Taurolidin auf die Eryptose ohne den Einfluss und das Mitwirken von extrazellulären Kalziumionen zu überprüfen. Letztere Ringer-Lösung enthält kein CaCl₂ und weist einen physiologischen pH-Wert von 7,4 auf.

Die Zusammensetzung der Kalzium-freien Ringer-Lösung ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Letztere Lösung wurde nach ihrer Anfertigung mittels einer Stericup® Filtereinheit der Firma Merk Millipore (Burlington, USA) gefiltert und zwischen der Verwendung für die Versuche bei einer Temperatur von +4°C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Kalzium-freien Ringer-Lösung.

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g] für 1 l Ringer-Lösung
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
HEPES	32,2	7,674
Glukose	5	0,901
NaOH	13,7	0,541
H ₂ O		982,798

2.2.3 Annexin-Waschpuffer

Der Annexin-Waschpuffer wurde in denjenigen Untersuchungen angewendet, in welchen die Messung der erythrozytären Phosphatidylserinexposition mittels Annexin V-FITC erfolgte. Gekennzeichnet ist dieser Waschpuffer durch einen physiologischen pH-Wert von 7,4. Zudem enthält der Annexin-Waschpuffer im Vergleich zur Ringer-Lösung eine höhere Konzentration an Kalziumionen, um hierdurch die Kalzium-abhängige Bindung von Annexin V-FITC an das Membranlipid Phosphatidylserin zu ermöglichen (Kapitel 2.3.5). Für die Versuchsdurchführungen fügten wir dem letzteren Puffer das Annexin V-FITC in einer 1:200 Verdünnung hinzu.

Die Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Letzterer Puffer wurde nach seiner Anfertigung mittels einer

Stericup® Filtereinheit der Firma Merck Millipore (Burlington, USA) gefiltert und zwischen der Verwendung für die Versuche bei einer Temperatur +4°C gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers.

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g] für 1 l Annexin-Waschpuffer
NaCl	140	7,305
HEPES	10	2,383
CaCl ₂	5	0,555
NaOH	4	0,168
H ₂ O		990

2.2.4 PBS-BSA-Lösung

Die PBS-BSA-Lösung wurde in den Versuchen zur Bestimmung der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche gebraucht (Kapitel 2.5.7). Angefertigt wurde die letztere Lösung durch die Zugabe von 0,1% Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) zu einer vorgefertigten phosphatgepufferten Salzlösung (Dulbecco's Phosphate buffered Saline, DPBS). Das BSA bezogen wir von der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, USA), die DPBS stammt von der Firma Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA). Für die Versuchsdurchführung fügten wir der PBS-BSA-Lösung einen Ceramid-spezifischen Primärantikörper im Verhältnis 1:10 und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper im Verhältnis 1:50 hinzu.

Die Zusammensetzung der PBS-BSA-Lösung ist der Tabelle 7 zu entnehmen. Letztere Lösung wurde jeweils unmittelbar vor den einzelnen Versuchen zur Ceramidbestimmung auf der Erythrozytenoberfläche angefertigt. Zwischen den einzelnen Untersuchungen wurde das BSA bei +4° C und die vorgefertigte DPBS-Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der PBS-BSA-Lösung.

Substanz	Konzentration [mM]	Menge [g] für 1 l PBS-BSA-Lösung
NaCl	137	8
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	8,1	1,44
KCl	2,7	0,2
KH ₂ PO ₄	1,76	0,24
BSA	0,015	1

2.3 Substanzen

2.3.1 Costunolid

Das Sesquiterpenlacton Costunolid bezogen wir von SelleckChemicals (Houston, USA). Durch die Lösung des Costunolids im Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde eine Stammlösung der Konzentration 10 mg/ml erzeugt. Aus letzterer Stammlösung gaben wir für die Versuchsansätze anschließend entsprechende Mengen zu 1 ml Ringer-Lösung hinzu, um die Costunolidkonzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml zu erhalten. Das in DMSO gelöste Costunolid wurde zwischen der Durchführung der einzelnen Versuchsreihen unter Lichtschutz bei -20° C aufbewahrt.

2.3.2 Phenoxodiol

Das Isoflavon Phenoxodiol bezogen wir von Sigma (Schnelldorf, Deutschland). Durch die Lösung des Phenoxodiol im Lösungsmittel DMSO wurde eine Stammlösung der Konzentration 20 mg/ml erzeugt. Aus letzterer Stammlösung gaben wir für die Versuchsansätze anschließend entsprechende Mengen zu 1 ml Ringer-Lösung hinzu, um die Phenoxodiolkonzentrationen 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml zu erhalten. Das in DMSO gelöste Phenoxodiol wurde zwischen der Durchführung der einzelnen Versuchsreihen unter Lichtschutz bei -20° C aufbewahrt.

2.3.3 Raloxifen

Den selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen bezogen wir von MedChemExpress (Princeton, USA). Durch die Lösung des Raloxifens im Lösungsmittel DMSO wurde eine Stammlösung der Konzentration 50 mg/ml erzeugt. Aus letzterer Stammlösung gaben wir für die Versuchsansätze anschließend entsprechende Mengen zu 1 ml Ringer-Lösung hinzu, um die Raloxifenkonzentrationen 15 µg/ml, 30 µg/ml und 60 µg/ml zu erhalten. Das in DMSO gelöste Raloxifen wurde zwischen der Durchführung der einzelnen Versuchsreihen unter Lichtschutz bei -20° C aufbewahrt.

2.3.4 Taurolidin

Das Taurinderivat Taurolidin bezogen wir von Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). Durch die Lösung des Taurolidins im Lösungsmittel DMSO wurde eine Stammlösung der Konzentration 40 mg/ml erzeugt. Aus letzterer Stammlösung gaben wir für die Versuchsansätze anschließend entsprechende Mengen zu 1 ml Ringer-Lösung hinzu, um die Taurolidinkonzentrationen 15 µg/ml, 30 µg/ml und 60 µg/ml zu erhalten. Das in DMSO gelöste Taurolidin wurde zwischen der Durchführung der einzelnen Versuchsreihen unter Lichtschutz bei -20° C aufbewahrt.

2.3.5 Annexin V-FITC

Annexin V-FITC wurde in den unten beschriebenen Untersuchungen angewendet, um die Phosphatidylserinexposition auf der Erythrozytenoberfläche und damit indirekt das Zellmembranscrambling durchflusszytometrisch zu überprüfen [108] [109] [110]. Dabei handelt es sich bei dem Annexin V um ein physiologischerweise vorkommendes Protein [328], welches aufgrund seiner unten beschriebenen Charakteristika nach Modifikation auch als laborchemischer Marker Verwendung findet [153]. In Abhängigkeit von Kalziumionen bindet das Protein Annexin V bevorzugt anionische Phospholipide und weist damit eine hohe Affinität für das Membranlipid Phosphatidylserin auf [328]. Da das Annexin V selbst nicht fluoresziert und damit der Messung mittels Durchflusszytometrie nicht zugänglich ist, besteht eine Konjugation des Proteins mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) zu Annexin V-FITC [369]. Durch diese Modifikation wird die durchflusszytometrische Detektion des Annexin V und damit des Phosphatidylserins möglich [205] [369].

Das in den nachfolgenden Messungen verwendete Annexin V-FITC bezogen wir von der Firma ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland). Zwischen den einzelnen Anwendungen im Rahmen der Versuche wurde das letztere Diagnostikum bei +4° C unter Lichtschutz gelagert. Für die Untersuchungen verdünnten wir das Annexin V-FITC in einem Verhältnis von 1:200 in Annexin-Waschpuffer (Kapitel 2.2.3) [108] [109] [110].

2.3.6 Fluo-3-AM

Fluo-3-AM wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen zur durchflusszytometrischen Messung der zytosolischen Kalziumionen eingesetzt [108] [109] [110]. In seiner Esterform (Acetoxymethylester; AM) kann das Fluo-3-AM keine Kalziumionen binden, ist jedoch zellmembrangängig, so dass die zu untersuchenden Zellen durch Inkubation mit letzterem Molekül beladen werden können [306]. Im Zellinneren angelangt, wird die Esterform durch intrazelluläre Esterasen zu Fluo-3 hydrolysiert [306]. Fluo-3 seinerseits kann die Zellen nicht mehr verlassen und ist nach der vorausgegangenen Hydrolyse in der Lage, intrazelluläre Kalziumionen zu binden [306]. Durch die Bindung dieser Kationen wird die Fluoreszenz des Fluo-3 verstärkt und ist mittels der Durchflusszytometrie messbar [278] [306].

Das in den unten beschriebenen Untersuchungen genutzte Fluo-3-AM bezogen wir von der Firma Biotium (Hayward, USA) und lösten es im Lösungsmittel DMSO. Zwischen den Versuchsdurchführungen wurde letzteres Diagnostikum unter Lichtschutz bei -20° C aufbewahrt. Für die Messungen der intrazellulären Kalziumionen gaben wir das gelöste Fluo-3-AM in einer Konzentration von 5 µM zu physiologischer Ringer-Lösung (Kapitel 2.2.1) hinzu [108] [109] [110].

2.3.7 DCFDA

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFDA) wurde im Rahmen der Versuche eingesetzt, um die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als indirektes Maß für das Einwirken von oxidativem Stress durchflusszytometrisch zu ermitteln [108] [109] [110]. In der genannten Form ist dieser Fluoreszenzfarbstoff sowohl chemisch reduziert als auch acetyliert und nicht-fluoreszierend [24] [364]. Die Acetylierung ermöglicht dem DCFDA die diffusive Aufnahme in die roten Blutkörperchen [24] [364]. In den Erythrozyten angekommen, wird das Molekül durch intrazelluläre Esterasen zu der weiterhin nicht-fluoreszierenden Verbindung 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein deacetyliert und dadurch zellulär retiniert [24] [364]. Sind intrazellulär zusätzlich ROS wie Wasserstoffperoxid, Hydroxyl- oder Peroxylradikale vorhanden, so kommt es zur

Oxidation des DCF mit der Umwandlung in das stark fluoreszierende, durchflusszytometrisch detektierbare 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) [12] [24] [364].

Das verwendete DCFDA bezogen wir von der Firma Sigma (Schnelldorf, Deutschland) und lösten es im Lösungsmittel DMSO. Zwischen den Ausführungen der Versuche wurde das letztere Diagnostikum unter Lichtschutz bei -20° C gelagert. Für die unten aufgeführten Untersuchungen wurde physiologischer Ringer-Lösung (Kapitel 2.2.1) das gelöste DCFDA auf eine Konzentration von 10 µM hinzugefügt [108] [109] [110].

2.3.8 Antikörper zur Bestimmung der Ceramidhäufigkeit

Zweierlei verschiedene Antikörpergruppen wurden verwendet, um das Vorkommen des Sphingolipids Ceramid auf der Erythrozytenoberfläche durchflusszytometrisch zu detektieren. Zum einen handelt es sich dabei um einen murinen, monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörper (Clone MID 15B4) der Firma Alexis (Grünberg, Deutschland), welcher als Primärantikörper spezifisch an das Ceramid bindet. Diesen Antikörper verdünnten wir für die Versuche zur Ceramid-Bestimmung im Verhältnis 1:10 mit PBS-BSA-Lösung (Kapitel 2.2.4). Zum anderen wurde im Anschluss ein polyklonaler, Fluoresceinisothiozyanat (FITC)-konjugierter Anti-Maus IgG und IgM spezifischer Antikörper von Ziegen der Firma Pharmingen (Hamburg, Deutschland) verwendet. Dieser Sekundärantikörper kann durch seine Fluoreszenzmarkierung die Primärantikörper nach deren Bindung für die Detektion mittels Durchflusszytometer sichtbar machen. Für die Versuche verdünnten wir den letzteren Antikörper in einem Verhältnis von 1:50 mit PBS-BSA (Kapitel 2.2.4) [108] [109] [110].

2.3.9 DMSO

DMSO bezogen wir von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und verwendeten letzteres im Rahmen der durchgeführten Versuche als Lösungsmittel sowohl für die Präparation der oben beschriebenen Xenobiotika Costunolid,

Phenoxodiol, Raloxifen und Taurolidin als auch zur Lösung der Diagnostika Fluo-3-AM und DCFDA.

2.4 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte für sämtliche Versuchsdurchführungen am Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson (BD) (New Jersey, USA). Für die anschließende Analyse der gesammelten Rohdaten setzten wir die entsprechende Software BD-CellQuest™ ein.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die angewendeten Methoden und die Abläufe der Untersuchungen aufgezeigt. Dazu werden sowohl der allgemeine Versuchsaufbau als auch das Vorgehen zur Bestimmung der einzelnen Parameter Phosphatidylserinexposition, Zellgröße, zytosolische Kalziumkonzentration, Phosphatidylserinexposition unter Kalziumdeprivation, reaktive Sauerstoffspezies und die Ceramidhäufigkeit auf den Erythrozyten erläutert.

2.5 Versuchsaufbau

Alle durchgeführten und hier beschriebenen Untersuchungen erfolgten in einer Sterilbank, um potentielle Kontaminationen zu vermeiden. Aufgrund der Möglichkeit, dass die roten Blutkörperchen verschiedener Probanden unterschiedlich empfindlich auf die Xenobiotika und deren Einfluss auf die Erytose reagieren, setzten wir die Untersuchungen als Versuchsreihen um. Eine Versuchsreihe beinhaltet dabei die Testung eines der Xenobiotika Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen oder Taurolidin einschließlich einer oder zweier Kontrollgruppen an den Erythrozyten eines Probanden. Für jedes der zu untersuchenden Xenobiotika wurden mehrere Versuchsreihen unter Verwendung der Erythrozyten mehrerer Probanden durchgeführt. Die Untersuchungen geschahen *in vitro*. Die Etablierung der Kontrollgruppen fand statt, um fehlerhafte Versuchsergebnisse möglichst zu erkennen und daraufhin ausschließen zu können [108] [109] [110].

Für die nachfolgende Messung der Phosphatidylserinexposition, der Zellgröße, der intrazellulären Kalziumkonzentration, der reaktiven Sauerstoffspezies sowie der Ceramidhäufigkeit wurden die Erythrozytensedimente mit Kalzium-haltiger Ringer-Lösung auf einen Hämatokrit von 0,4 % resuspendiert. Einzig für die Bestimmung der Phosphatidylserinexposition unter Kalziumdepletion erfolgte die Resuspension auf einen Hämatokrit von 0,4 % mit Kalzium-freier Ringer-Lösung. Von den so entstandenen Erythrozytensuspensionen pipettierten wir jeweils 1 ml in je ein autoklaviertes Eppendorf-Reaktionsgefäß. Innerhalb einer Versuchsreihe beließen wir anschließend eines der Eppendorf-Reaktionsgefäße als Negativkontrolle ausschließlich mit den roten Blutkörperchen und der Ringer-Lösung, in weitere Eppendorf-Reaktionsgefäße erfolgte die Zugabe eines der Xenobiotika – wenn indiziert in ansteigender Konzentration. In denjenigen Fällen, in welchen die Kontrolle eines möglichen Einflusses des Lösungsmittels DMSO angezeigt war, fügten wir der Erythrozytensuspension DMSO hinzu. Im Anschluss an die Präparation der jeweiligen Erythrozytenproben wurden diese für 48 Stunden bei 37° C inkubiert [108] [109] [110]. Die Inkubationszeit der roten Blutkörperchen mit den verschiedenen Testsubstanzen wurde dabei so gewählt, dass auch möglicherweise auftretende langsame oder verzögerte Mechanismen und Signalwege des eryptotischen Zelltodes aufzutreten vermögen [109].

Nach der Beendigung der Inkubation bereiteten wir die Erythrozytenproben der Versuchsreihen jeweils für ihre durchflusszytometrische Analyse auf, indem wir – abhängig von der anschließenden Messung – je 100 µl oder 150 µl Zellsuspension aus jeder Erythrozytenprobe in je eine Kammer einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettierten. Diese Mikrotiterplatte wurde anschließend für drei Minuten bei einer Temperatur von 37° C mit 1600 Revolutions per Minute (RPM) zentrifugiert und der so entstandene Überstand wurde verworfen. Die in den Kammern verbliebenen Erythrozytensedimente wuschen wir einmalig mit der entsprechenden Ringer-Lösung und behandelten letztere schließlich mit den unten beschriebenen Diagnostika auf die unten aufgezeigte Weise weiter, bevor die Messung am Durchflusszytometer erfolgte [108] [109] [110].

2.5.1 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie stellt ein technologisches Mess- und Analyseverfahren dar, welches unter Zuhilfenahme von Lichtstrahlen einzelne Partikel, üblicherweise Zellen, auf deren physikalische Eigenschaften hin untersucht [28] [131]. Dabei vermag diese Messung unter anderem relative Aussagen über die Partikelgröße, die Partikelinnenstruktur oder Granularität und – falls entsprechende Farbstoffe angewendet werden – auch über die Fluoreszenzintensität zu treffen [28] [131].

Das Verfahren der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Partikel durch einen Lichtstrahl fließen und diesen dadurch streuen sowie gegebenenfalls selbst zur Emission von Fluoreszenzsignalen angeregt werden [28] [131]. Diese Lichtstreuungen und Fluoreszenzsignale werden anschließend über verschiedene Detektoren registriert und schließlich analysiert [28]. Demgemäß umfasst ein Durchflusszytometer die folgenden Komponenten: die (1) Fluidtechnik, die (2) Optik und die (3) Elektronik [28].

Die (1) Fluidtechnik ermöglicht, dass die Partikel optimal für ihre Vermessung vorbereitet werden [28]. Dies erfolgt durch die automatisierte Injektion der Partikel in eine Hüllflüssigkeit, sodass sich ein Flüssigkeitsstrom, auch Hüllstrom genannt, bildet [28]. In dessen Zentrum fokussieren sich aufgrund der durch die Hüllflüssigkeit erfahrenen Beschleunigung die Partikel separat hintereinander aufgereiht. Diese Erscheinung wird als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet und ermöglicht, dass nachfolgend jeweils nur die Streuung und Emission eines einzelnen Partikels registriert wird [28] [131]. Auf diese Weise werden überlagerte, uneindeutige Ergebnisse vermieden [28].

Mittels der (2) Optik, eines Zusammenschlusses aus Lasern als Quelle der Lichtstrahlen und Detektoren zur Registrierung der Messsignale, werden die fokussierten Partikel vermessen [28] [131]. Sobald ein Partikel den Lichtstrahl durchquert, wird der letztere gestreut, wobei die resultierende Streuung von den physikalischen Eigenschaften des Partikels abhängt [28]. Verschiedene Photodetektoren fangen das Streulicht ein: abhängig von der Größe der Abweichung zum ursprünglichen Lichtstrahl wird das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter,

FSC) von dem Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) abgegrenzt [28]. Das Vorwärtsstreulicht beinhaltet dabei alle Streustrahlen mit einer nur sehr geringen Abweichung und wird über eine Photodiode registriert [28] [131]. Es gilt als Maß für die Partikelgröße, je höher das Signal des Vorwärtsstreulichtes ist, desto größer ist auch der entsprechende Partikel [28] [131]. Das Seitwärtsstreulicht umfasst diejenigen Streustrahlen, welche eine Abweichung von 90° zum ursprünglichen Lichtstrahl erfahren und wird über einen Photomultiplier registriert [28] [131]. Dieses Streulicht ermöglicht Aufschluss über die Beschaffenheit und Binnenstruktur eines Partikels, also beispielsweise die Membranfaltungen oder Granularität einer Zelle, wobei das Signal des Seitwärtsstreulichtes mit vermehrter Membranfaltung und Granularität zunimmt [28] [131].

Werden die Partikel vor ihrer durchflusszytometrischen Vermessung noch mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit fluoreszenzgekoppelten Molekülen behandelt, so können neben dem Vorwärts- und dem Seitwärtsstreulicht noch Fluoreszenzintensitäten registriert werden [28]. Hierdurch wird es im Falle von Zellen möglich, indirekt gezielt das Vorhandensein von Oberflächenmolekülen oder von intrazellulären Strukturen wie Proteinen oder DNA zu ermitteln [131]. Zugrunde liegt hierbei, dass die Fluoreszenzfarbstoffe Licht in einem bestimmten, für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, dem sogenannten Absorptionsspektrum, absorbieren [28] [131]. Liegt die Wellenlänge des durch den Laser emittierten Lichtstrahls innerhalb dieses Bereiches, so werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben [28] [131]. Wenn diese Elektronen anschließend rasch in ihren Ausgangszustand zurückverfallen, wird die dabei freigesetzte Energie in Form eines Photons abgegeben und ist als Fluoreszenz durch einen Photomultiplier detektierbar [28]. Abhängig davon, welche Wellenlänge die emittierte Fluoreszenz aufweist, wird diese zur allgemeinen Unterscheidung mithilfe von Interferenzfiltern verschiedenen Fluoreszenzkanälen „FL“ zugeordnet [131].

Zuletzt ermöglicht die (3) Elektronik eine Umwandlung der durch die Photodetektoren registrierten Streulicht- und Fluoreszenzsignale in elektrische Signale [28] [131]. Diese können anschließend mittels Computer weiterverarbeitet

werden, indem beispielsweise eine graphische Darstellung in Form eines Histogrammes oder eines Dot-Plots und eine statistische Analyse erfolgt [28] [131].

Das im Rahmen der Versuchsdurchführungen verwendete Durchflusszytometer FACSCalibur™ beinhaltet einen Argon-488nm-Laser und einen Dioden-633nm-Laser zur Erzeugung der Lichtstrahlen, sowie eine Photodiode als Vorwärtsstreu-lichtdetektor, einen Photomultiplier als Seitwärtsstreu-lichtdetektor und vier Photo- multipliiere FL1-FL4 als Fluoreszenzdetektoren. Für jede Probe wurden 50.000 Zellen durchflusszytometrisch registriert, um so eine hohe Zuverlässigkeit und Repräsentativität der Ergebnisse zu erzielen. Innerhalb einer Messreihe wurde das Vorwärtsstreu-licht durch die Photodiode des FSC-Kanals und die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Färbungen durch den Photomultiplier im FL1-Kanal erfasst. Auf Messungen des Seitwärtsstreu-licht verzichteten wir, da diesem im Forschungsbereich der Eryptose keine wesentliche Bedeutung beige- messen wird.

2.5.2 Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC

Für die Messung der erythrozytären Phosphatidylserinexposition resuspendierten wir die nach Kapitel 2.5 vorbehandelten Erythrozyten mit 150 µl Annexin V-FITC in einer 1:200 Verdünnung mit Annexinwaschpuffer und inkubierten diese bei 37° C für 20 Minuten unter Lichtschutz. Die Bestimmung der Annexin V-Fluoreszenz erfolgte im Anschluss mittels des Durchflusszytometers bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL1-Kanal. Um solche Erythrozyten, welche vermehrt Annexin V auf ihrer Oberfläche binden, von Zellen ohne erhöhte Annexin V-Bindung abzugrenzen, wurde ein Marker (M1) als arbiträrer Grenzwert festgelegt. Dieser Grenzwert wurde sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die mit Xenobiotika behandelten Proben gleich gewählt [108] [109] [110]. Die in diesem Versuch erlangten Daten wurden anschließend nach Kapitel 2.5.8 statistisch ausgewertet.

2.5.3 Zellgröße - Forward Scatter

Die Messung der Zellgröße erfolgte mittels der Bestimmung des Vorwärtsstreu-lichts im FSC-Kanal des Durchflusszytometers bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm. Gemessen wurde die Zellgröße parallel zur Bestimmung der Annexin V-Fluoreszenz innerhalb desselben Messdurchgangs [108] [109] [110]. Möglich ist dieses Vorgehen aufgrund der Tatsache, dass durch Annexin V keine fälschliche Veränderung des Zellvolumens anzunehmen ist. Zu beachten gilt, dass durch die Bestimmung des Vorwärtsstreu-lichts keine absoluten Zellgrößen erfasst werden. Folgerungen bezüglich der Zellgröße erfolgen daher durch den Vergleich der Messergebnisse der Proben untereinander. Die Messwerte für jede Probe wurden in Form des geometrischen Mittels erfasst. Die in diesem Versuch erlangten Daten werteten wir anschließend nach Kapitel 2.5.8 statistisch aus.

2.5.4 Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM

Um die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu bestimmen, resuspendierten wir die vorbehandelten Erythrozyten (Kapitel 2.5) in 150 µl einer Fluo-3-AM-haltigen Ringer-Lösung mit einer Konzentration von 5 µM, um letztere auf diese Weise mit Fluo-3-AM zu beladen. Diese Suspension wurde dann für 30 Minuten unter Lichtschutz bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte am Durchflusszytometer die Ermittlung der Kalzium-abhängigen Fluo-3-Fluoreszenz mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL1-Kanal [108] [109] [110]. Die Messwerte für jede Probe wurden in Form des geometrischen Mittels erfasst. Die in diesem Versuch erlangten Daten werteten wir anschließend nach Kapitel 2.5.8 statistisch aus.

2.5.5 Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC

Für die Messung der erythrozytären Phosphatidylserinexposition unter Wegnahme der extrazellulären Kalziumionen resuspendierten wir die nach Kapitel 2.5 mit Kalzium-freier Ringer-Lösung vorbehandelten Erythrozyten mit 150 µl Annexin V-FITC in einer 1:200 Verdünnung mit Annexinwaschpuffer und inkubierten jene bei 37° C für 20 Minuten unter Lichtschutz. Die Ermittlung der

Annexin V-Fluoreszenz erfolgte im Anschluss mittels des Durchflusszytometers bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL-1-Kanal. Um solche Erythrozyten, welche vermehrt Annexin V auf ihrer Oberfläche binden, von Zellen ohne erhöhte Annexin V-Bindung abzugrenzen, wurde ein Marker (M1) als arbiträrer Grenzwert festgelegt. Dieser Grenzwert wurde sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die mit Xenobiotika behandelten Proben gleich gewählt [108] [109] [110]. Die in diesem Versuch erlangten Daten wurden anschließend nach Kapitel 2.5.8 statistisch ausgewertet.

2.5.6 Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA

Für die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies und des damit einhergehenden oxidativen Stresses färbten wir die vorbehandelten roten Blutkörperchen (Kapitel 2.5) mit DCFDA an. Zu diesem Zweck erfolgte die Inkubation dieser Erythrozyten in einer Ringerlösung mit einer 10 µM DCFDA-Konzentration für 30 Minuten bei 37° C unter Lichtschutz. Vor der Messung wurden die angefärbten Zellen zweifach in reiner Ringer-Lösung gewaschen und schließlich in 200 µl Ringer-Lösung suspendiert. Die DCFDA-Fluoreszenzbestimmung am Durchflusszytometer erfolgte mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm im FL1-Kanal [108] [109] [110]. Die Messwerte für jede Probe wurden in Form des geometrischen Mittels erfasst. Die in diesem Versuch erlangten Daten werteten wir anschließend nach Kapitel 2.5.8 statistisch aus.

2.5.7 Ceramidhäufigkeit - Primär- und Sekundärantikörper

Die hier durchgeführte Bestimmung der Ceramidhäufigkeit im Rahmen der Eryptose beruht auf der Anwendung eines Antikörper-basierten Testverfahrens. Für die Messung des Vorkommens dieses Sphingolipids auf der Oberfläche der Erythrozyten markierten wir die nach Kapitel 2.5 vorbehandelten roten Blutkörperchen mit einem murinen, Ceramid-spezifischen Primärantikörper. Hierzu erfolgte deren Inkubation über 60 Minuten bei 37° C in 100 µl einer PBS-BSA Lösung, welche 1 µg des letzteren Antikörpers in einer 1:10 Verdünnung in ge-

löster Form enthält. Nach dieser Zeitspanne wuschen wir die Erythrozyten zweifach in 100 µl reiner PBS-BSA-Lösung, um die nicht-gebundenen Antikörper abzuscheiden. Anschließend fand die Anfärbung der roten Blutkörperchen durch eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei 37° C unter Lichtschutz mit 100 µl einer PBS-BSA Lösung, welche einen polyklonalen, FITC-konjugierten Sekundärantikörper in einer 1:50 Verdünnung beinhaltet, statt. Wieder wurden überschüssige, ungebundene Antikörper nach der Inkubationsperiode durch zweimalige Waschung in 100 µl reiner PBS-BSA-Lösung entfernt und schließlich die markierten und gefärbten Erythrozyten zur durchflusszytometrischen Messung in 150 µl reiner PBS-BSA Lösung suspendiert. Die FITC-Fluoreszenzbestimmung des Sekundärantikörpers erfolgte mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionenwellenlänge von 530 nm im FL1-Kanal [109] [110] [108]. Die Messwerte für jede Probe wurden in Form des geometrischen Mittels erfasst. Die in diesem Versuch erlangten Daten werteten wir anschließend nach Kapitel 2.5.8 statistisch aus.

2.5.8 Statistik

Die im Rahmen der Versuche erhobenen Daten werden nachfolgend als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) wiedergegeben. Deren statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Statistiksoftware GraphPad Prism der Firma GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA). Die Daten der Versuchsreihen wurden jeweils komplett und ohne die Anwendung von Ein- oder Ausschlusskriterien analysiert. Für die statistische Auswertung mehrerer (>2) unabhängiger Gruppen zogen wir eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) mit einem Tukey's Test als Post-hoc-Test heran. Die Signifikanzanalyse zweier unabhängiger Gruppen führten wir mittels eines T-Tests durch. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert. n zeigt die Anzahl der durchgeführten Versuchsreihen innerhalb einer Untersuchung an. Aufgrund der Möglichkeit, dass die Erythrozytenproben der verschiedenen Probanden unterschiedlich anfällig für die Wirkung der Xenobiotika auf die Eryptoseauslösung sind, setzten wir die einzelnen Erythrozytenproben jeweils sowohl den Kontroll- als auch den Experimentalbedingungen aus [108] [109] [110].

3 Ergebnisse

Die in Kapitel 2 aufgezeigten und im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen haben zum Ziel, mögliche Einflüsse der Xenobiotika Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen sowie Taurolidin auf den gesteuerten, erythrozytären Zelltod aufzuzeigen. Vertiefend soll weiterhin eine Klärung der notwendigen Substanzkonzentrationen sowie eine Erläuterung der in diesen Fällen involvierten Eryptosemechanismen stattfinden.

3.1 Einfluss von Costunolid auf die Eryptose

Zunächst werden die Ergebnisse der Untersuchung bezüglich der Wirkung des Sesquiterpenlactons Costunolid auf die Eryptose dargelegt. Letzteres Xenobiotikum gilt in der medizinischen Forschung insbesondere aufgrund seiner breiten antineoplastischen Wirksamkeit auf Zelllinien *in vitro* sowie tierexperimentell als bedeutsam. Wir beurteilten verschiedene Wirkkonzentrationen des Costunolids sowie die Wirkung auf die Phosphatidylserinexposition, die Zellgröße, die zytosolische Kalziumkonzentration, den Einfluss extrazellulärer Kalziumionen, die Entstehung von oxidativem Stress und die Anhäufung von Ceramid auf den Erythrozyten.

3.1.1 Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC

Eines der Hauptmerkmale der Eryptose stellt der Verlust der Membranasymmetrie mit der Translokation von Phosphatidylserin auf den äußeren Anteil der Zellmembran dar (Kapitel 1.3.1). Um die Beeinflussung des gesteuerten Zelltodes der Erythrozyten durch Costunolid zu ermitteln, bestimmten wir daher zunächst die Phosphatidylserinexposition mithilfe von Annexin V am Durchflusszytometer. Die Messung erfolgte nach einer 48-stündigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Xenobiotikums (5-15 µg/ml) und zeigt, wie in Abbildung 12 dargestellt, einen Anstieg der Annexin V-bindenden Zellen vermittelt durch Costunolid. Statistisch signifikant wird die Zunahme der Annexin V-Bindung ab

einer Costunolid-Konzentration von 10 µg/ml. Mit zunehmender Konzentration des Sesquiterpenlactons steigt auch die Anzahl der Annexin V-bindenden Erythrozyten an. Im Original-Histogramm ist die Steigerung der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation mit einer Costunolidkonzentration von 15 µg/ml gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 17$ für die Negativkontrolle $0,97 \pm 0,08$, für die Exposition mit 5 µg/ml Costunolid $2,07 \pm 0,14$, für die Exposition mit 10 µg/ml Costunolid $4,01 \pm 0,38$, für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid $8,90 \pm 0,90$ und für die Kontrollgruppe mit 15 µg/ml DMSO $0,91 \pm 0,09$ [109].

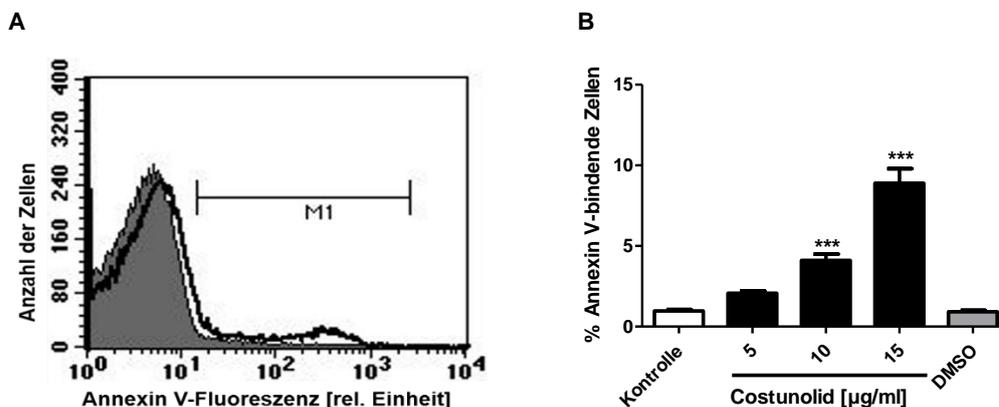


Abbildung 12: Effekt von Costunolid auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten modifiziert nach [109]. **A** Original-Histogramm Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Linie) [109]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 17$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Costunolid (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (15 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0,001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Costunolid (ANOVA) [109].

3.1.2 Zellgröße - Forward Scatter

Auch die Zellschrumpfung der roten Blutkörperchen als Folge eines Kaliumchlorid- und Wasserverlustes gehört zu den Hauptmerkmalen der Eryptose (Kapitel 1.3.1). Daher ermittelten wir neben der Wirkung auf die Phosphatidylserinexposition auch den Einfluss von Costunolid auf das erythrozytäre Zellvolumen. Die Messung erfolgte nach einer 48-stündigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Xenobiotikums (5-15 µg/ml) durch die Bestimmung des Forward Scatters am Durchflusszytometer. Die Ergebnisse sind in

Abbildung 13 dargelegt und zeigen ein verändertes Vorwärtsstreulicht und damit eine Abnahme der Zellgröße unter dem Einwirken von Costunolid. Ab einer Konzentration des Xenobiotikums von 15 µg/ml erreicht die Reduktion des Forward Scatters gegenüber der Kontrollgruppe statistische Signifikanz. Im Original-Histogramm ist eine Linksverschiebung hin zu kleineren Werten des Vorwärtsstreulichts nach Inkubation mit einer Costunolidkonzentration von 15 µg/ml zu erkennen. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Vorwärtsstreulichtintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 17$ für die Negativkontrolle $490,40 \pm 11,04$, für die Exposition mit 5 µg/ml Costunolid $475,10 \pm 10,17$, für die Exposition mit 10 µg/ml Costunolid $449,00 \pm 11,45$, für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid $368,60 \pm 16,89$ und für die Kontrollgruppe mit 15 µg/ml DMSO $477,60 \pm 12,15$ [109].

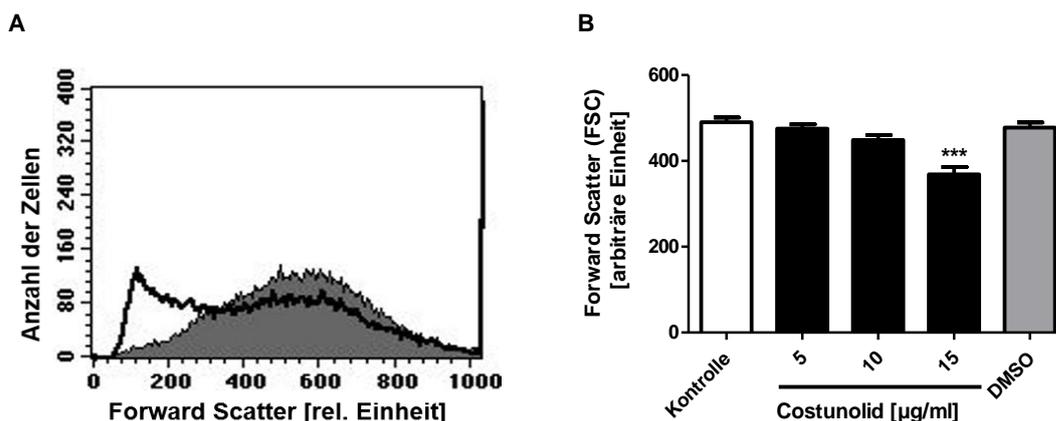


Abbildung 13: Effekt von Costunolid auf die Zellgröße der Erythrozyten modifiziert nach [109]. **A** Original-Histogramm des Forward Scatters (FSC) der Erythrozyten als Maß für die Zellgröße nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Linie) [109]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 17$) des Forward Scatters (FSC) der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Costunolid (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (15 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Costunolid (ANOVA) [109].

Sowohl die Steigerung der Phosphatidylserinexposition auf der Außenseite der Zellmembran als auch Abnahme des Zellvolumens zeigen auf, dass das Sesquiterpenlacton Costunolid einen stimulierenden Effekt auf den gesteuerten Zelltod der Erythrozyten ausübt. Im Rahmen der nachfolgenden Untersuchungen ermittelten wir daher, welche Signalwege und Wirkmechanismen in der Eryptoseauslösung durch dieses Xenobiotikum involviert sind.

3.1.3 Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM

Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumaktivität stellt einen bedeutenden und oftmals zentralen Mechanismus der Eryptoseauslösung dar (Kapitel 1.3.3). Aus diesem Grund bestimmten wir im nächsten Schritt die Konzentration der intrazellulären Kalziumionen nach 48-stündiger Inkubation mit Costunolid in verschiedenen Konzentrationen (5-15 µg/ml). Die Messung erfolgte mithilfe der durchflusszytometrischen Registrierung der Fluo-3-AM-vermittelten Fluoreszenz. Aus der Abbildung 14 wird ersichtlich, dass das Sesquiterpenlacton in der Konzentration 15 µg/ml eine signifikante Steigerung der Fluo-3-Fluoreszenz und damit der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. Im Original-Histogramm stellt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität unter Einwirkung einer Costunolidkonzentration von 15 µg/ml dar. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Fluo-3-AM-Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 13$ für die Negativkontrolle $19,22 \pm 0,45$, für die Exposition mit 5 µg/ml Costunolid $20,53 \pm 0,64$, für die Exposition mit 10 µg/ml Costunolid $22,23 \pm 0,46$, für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid $28,69 \pm 4,05$ und für die Kontrollgruppe mit 15 µg/ml DMSO $17,98 \pm 0,42$ [109].

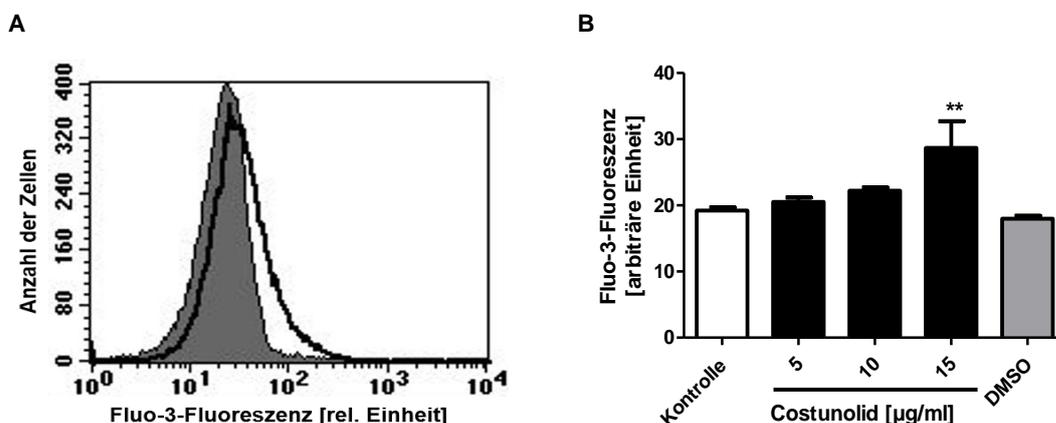


Abbildung 14: Effekt von Costunolid auf die zytosolischen Kalziumionen modifiziert nach [109]. **A** Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für die zytosolischen Kalziumionen nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Linie) [109]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 13$) der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Costunolid (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (15 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ******($p < 0.01$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Costunolid (ANOVA) [109].

3.1.4 Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC

Neben dem Kalzium-vermittelten Signalweg der Eryptoseauslösung sind weitere Mechanismen des gesteuerten, erythrozytären Zelltodes bekannt, welche losgelöst von einer erhöhten intrazellulären Kalziumaktivität ablaufen (Kapitel 1.3.3). Um auszumachen, in welchem Ausmaß die Costunolid-induzierte Eryptose auf einer gesteigerten Kalziumkonzentration durch den Ioneneinstrom von extrazellulär beruht und ob weitere, Kalzium-unabhängige Effekte einwirken, führten wir Versuchsreihen in Abwesenheit von extrazellulären Kalziumionen durch. Hierzu bestimmten wir die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation entweder in einer Kalzium-haltigen oder in einer Kalzium-freien Ringer-Lösung mit oder ohne Zusatz des Xenbiotikums in der Konzentration 15 µg/ml mittels der Durchflusszytometrie. Wie in Abbildung 15 wiedergegeben ist, wird der Effekt des Costunolids auf die Phosphatidylserinexposition durch das Fehlen von extrazellulären Kalziumionen signifikant gegenüber der Wirkung in Anwesenheit von Kalzium abgeschwächt. Weiterhin ist jedoch ersichtlich, dass das Sequiterpenlacton sogar in der Abwesenheit von extrazellulären Kalziumionen den prozentualen Anteil der erythrozytären Phosphatidylserinexposition im Vergleich zur Kalzium-freien Negativkontrolle signifikant erhöht. Im Original-Histogramm ist die Steigerung der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation mit einer Costunolidkonzentration von 15 µg/ml sowohl in Kalzium-haltiger als auch in Kalzium-freier Ringer-Lösung gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. Dieser Effekt tritt sowohl in der Kalzium-haltigen als auch in der Kalzium-freien Ringerlösung auf. Ferner ist ersichtlich, dass die Annexin V-Fluoreszenz unter der Anwesenheit von extrazellulären Kalziumionen stärker angestiegen ist als im Kalzium-absenten Milieu. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 10$ für die Negativkontrolle mit Kalziumionen $1,02 \pm 0,08$, für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid mit Kalziumionen $11,86 \pm 1,31$, für die Negativkontrolle ohne Kalziumionen $1,18 \pm 0,43$ und für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid ohne Kalziumionen $6,21 \pm 0,65$ [109].

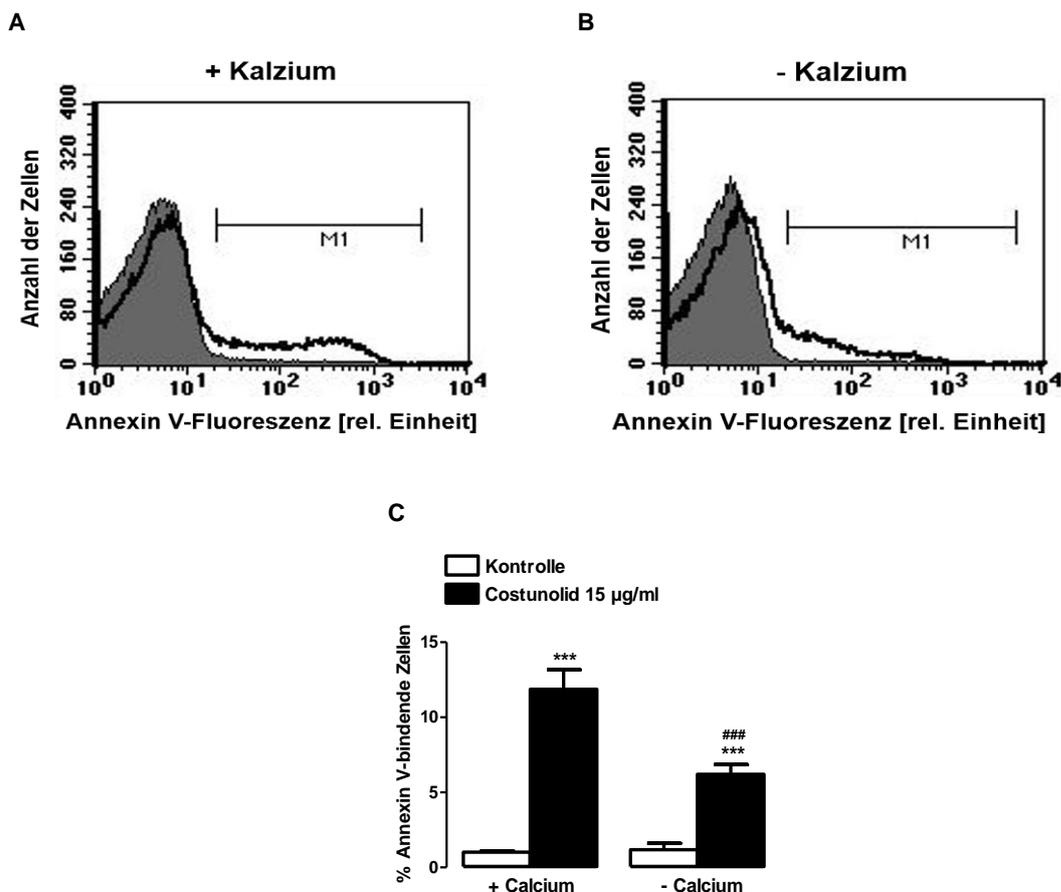


Abbildung 15: Kalziumsensitivität der Costunolid-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten modifiziert nach [109]. **A** und **B** Original-Histogramme Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Flächen) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Linien). **A** stellt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalziumhaltiger Ringer-Lösung dar, **B** zeigt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalzium-freier Ringer-Lösung [109]. **C** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 10$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Balken) unter Vorhandensein (linke Balken, + Kalzium) oder Abwesenheit von Kalzium (rechte Balken, - Kalzium). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Costunolid, ###($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zum Vorhandensein von Kalzium (ANOVA) [109].

Aus dieser Untersuchung wird deutlich, dass die Costunolid-induzierte Veränderung der Phosphatidylserinexposition und die Erytose in Teilen auf dem Kalziumeinstrom von extrazellulär beruhen. Zusätzlich deuten die Ergebnisse aber auf weitere Mechanismen hin, welche die signifikante Translokation des Phosphatidylserins trotz der fehlenden extrazellulären Kalziumionen bewirken [109].

3.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA

An der Auslösung der Erytose und an der Öffnung der erythrozytären nicht-selektiven Kationenkanäle können ROS und folglich oxidativer Stress beteiligt

sein. Um Aufschluss über ein mögliches Mitwirken von oxidativem Stress in der Eryptoseauslösung durch Costunolid zu erhalten, bestimmten wir die DCFDA-Fluoreszenz am Durchflusszytometer nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten mit einer Costunolidkonzentration von 15 µg/ml. Abbildung 16 zeigt auf, dass das Sesquiterpenlacton die DCFDA-vermittelte Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht und demnach die Entstehung von ROS und oxidativem Stress bewirkt. Im Original-Histogramm ist eine Zunahme der DCFDA-abhängigen Fluoreszenzintensität durch das Einwirken von 15 µg/ml Costunolid gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. Das arithmetische Mittel \pm SEM des geometrischen Mittels der DCFDA-bedingten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 10$ für die Kontrollgruppe $16,14 \pm 0,95$ und für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid $23,58 \pm 0,99$ [109].

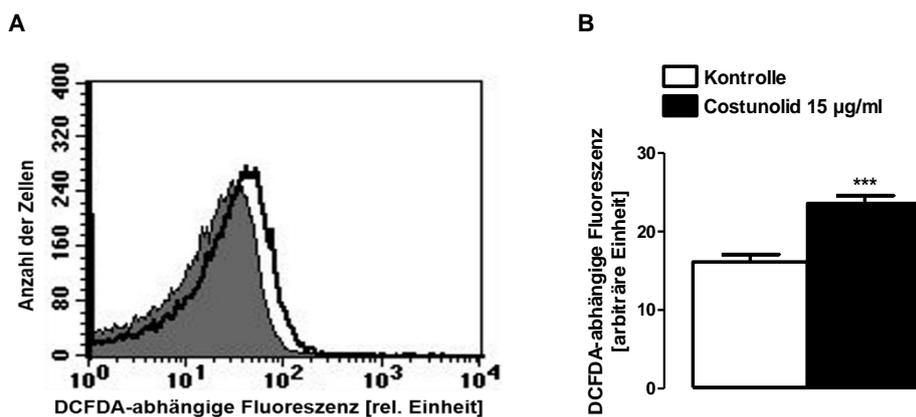


Abbildung 16: Einfluss von Costunolid auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten modifiziert nach [109]. **A** Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für den oxidativen Stress nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Linie) [109]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 10$) der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarzer Balken). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Costunolid (T-Test) [109].

3.1.6 Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper

Die Ceramid-vermittelten Mechanismen der Eryptose können unabhängig vom Einstrom extrazellulärer Kalziumionen in die sterbenden roten Blutkörperchen verlaufen (Kapitel 1.3.3). Aus diesem Grund untersuchten wir im Rahmen des nachfolgenden Versuchs eine Beteiligung des Sphingolipids Ceramid an der durch Costunolid bewirkten Eryptose. Zu diesem Zweck bestimmten wir durch-

flusszytometrisch das Ceramidvorkommen nach einer 48-stündigen Inkubation mit einer Konzentration des Sesquiterpenlactons von 15 µg/ml mithilfe von spezifischen Primär- und fluoreszierenden Sekundärantikörpern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt und zeigen auf, dass Costunolid die Ceramidbedingte Fluoreszenz und damit die Anhäufung dieses Sphingolipids im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant steigert. Im Original-Histogramm stellt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität unter Einwirkung einer Costunolidkonzentration von 15 µg/ml dar. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Antikörperbedingten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 5$ für die Negativkontrolle $4,67 \pm 0,07$ und für die Exposition mit 15 µg/ml Costunolid $7,07 \pm 0,34$ [109].

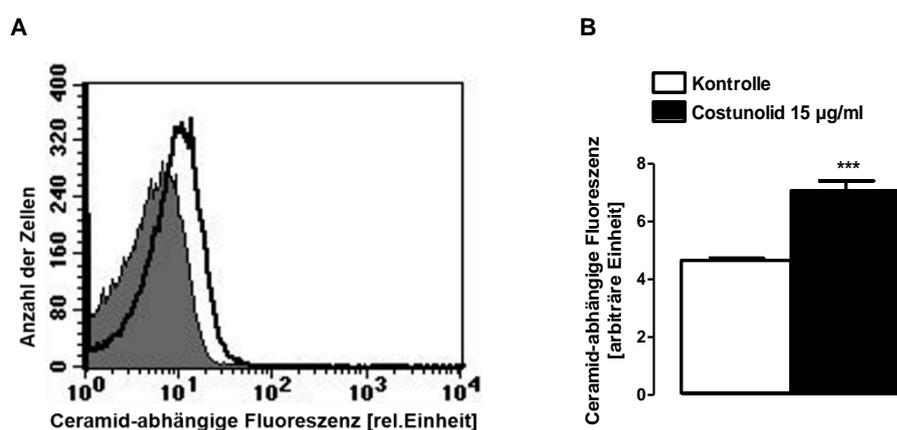


Abbildung 17: Effekt von Costunolid auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche modifiziert nach [109]. **A** Original-Histogramm der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarze Linie) [109]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 5$) der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Costunolid (15 µg/ml) (schwarzer Balken). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Costunolid (T-Test) [109].

3.2 Einfluss von Phenoxodiol auf die Eryptose

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Effekte des Isoflavons Phenoxodiol auf die Eryptose beschrieben. Letztgenanntes Xenobiotikum ist für die medizinische Forschung und die klinische Anwendung aufgrund seiner antineoplastischen

Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von Interesse. Untersucht wurden verschiedene Wirkkonzentrationen des Phenoxodiols sowie die Phosphatidylserinexposition, die Zellgröße, die zytosolische Kalziumkonzentration, der Einfluss extrazellulärer Kalziumionen, die Entstehung von oxidativem Stress und die Anhäufung von Ceramid auf den Erythrozyten nach Inkubation.

3.2.1 Phosphatidylserinexposition – Annexin V-FITC

Der gesteuerte Zelltod der Erythrozyten ist gekennzeichnet durch die Exposition des Lipids Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran, welche mit einem Verlust der Membranasymmetrie einhergeht (Kapitel 1.3.1). Um zu ermitteln, welchen Einfluss das Xenobiotikum Phenoxodiol auf die Eryptose ausübt, überprüften wir daher im ersten Schritt das Vorhandensein von externalisiertem Phosphatidylserin auf den Erythrozyten. Dazu wurden die roten Blutkörperchen über 48 Stunden mit Phenoxodiol in aufsteigender Konzentration (25-100 µg/ml) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch mithilfe ihrer Annexin V-Fluoreszenz auf ihre Phosphatidylserinexposition getestet. Aus Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die Annexin V-vermittelte Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe ansteigt und das Isoflavon damit ein Zellmembranscrambling mit Phosphatidylserinexposition bewirkt. Statistisch signifikant ist dieser Effekt ab einer Phenoxodiolkonzentration von 50 µg/ml. Weiterhin besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung, steigende Konzentrationen des Xenobiotikums führen allesamt auch zu erhöhten Eryptoseraten. Im Original-Histogramm ist die Zunahme der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation mit einer Phenoxodiolkonzentration von 100 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 20$ für die Negativkontrolle $0,90 \pm 0,07$, für die Exposition mit 25 µg/ml Phenoxodiol $2,57 \pm 0,34$, für die Exposition mit 50 µg/ml Phenoxodiol $6,84 \pm 0,59$, für die Exposition mit 100 µg/ml Phenoxodiol $11,59 \pm 1,14$ und für die Kontrollgruppe mit 100 µg/ml DMSO $0,81 \pm 0,06$ [108].

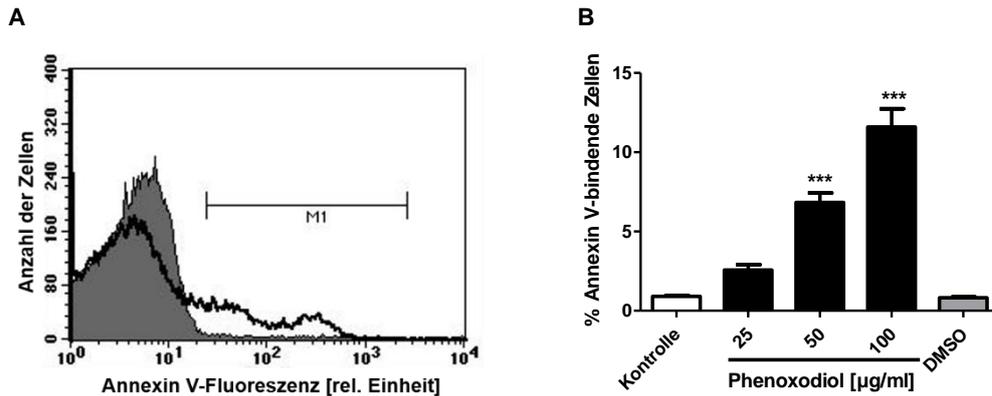


Abbildung 18: Effekt von Phenoxodiol auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten modifiziert nach [108]. **A** Original-Histogramm Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Phenoxodiol (100 µg/ml) (schwarze Linie) [108]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 20$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Phenoxodiol (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (100 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Phenoxodiol (ANOVA) [108].

3.2.2 Zellgröße - Forward Scatter

Weiterhin zählt eine Verminderung der Zellgröße zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen, welche während des Ablaufs der Eryptose auftreten (Kapitel 1.3.1). Neben der Phosphatidylserinexposition bestimmten wir zur Einschätzung der Wirkung von Phenoxodiol auf die Eryptose folglich auch das Zellvolumen der Erythrozyten nach Einwirkung jenes Isoflavons. Diese Messung erfolgte nach einer 48-stündigen Inkubation der roten Blutkörperchen mit verschiedenen Phenoxodiolkonzentrationen (25-100 µg/ml) durch die Bestimmung des Forward Scatters am Durchflusszytometer. Abbildung 19 zeigt auf, dass letzteres Xenobiotikum das Vorwärtsstreulicht der inkubierten Erythrozyten verändert und zu einer Verminderung der Zellgröße führt. Ab einer Phenoxodiolkonzentration von 50 µg/ml zeigt sich die Größenreduktion als statistisch signifikant gegenüber der Negativkontrolle. Auch hier ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung gegeben, höhere Konzentrationen des Isoflavons erzielen eine stärkere Abnahme der Zellgröße. Im Original-Histogramm stellt sich eine Linksverschiebung hin zu kleineren Werten des Vorwärtsstreulichts nach Inkubation mit einer Phenoxodiolkonzentration von 100 µg/ml dar. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Vorwärtsstreulichtintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 27$ für die Kontrollgruppe $478,30 \pm 5,37$, für

die Exposition mit 25 µg/ml Phenoxodiol $454,30 \pm 6,41$, für die Exposition mit 50 µg/ml Phenoxodiol $426,30 \pm 6,34$, für die Exposition mit 100 µg/ml Phenoxodiol $364,3 \pm 7,99$ und für die Kontrollgruppe mit 100 µg/ml DMSO $473,8 \pm 4,80$ [108].

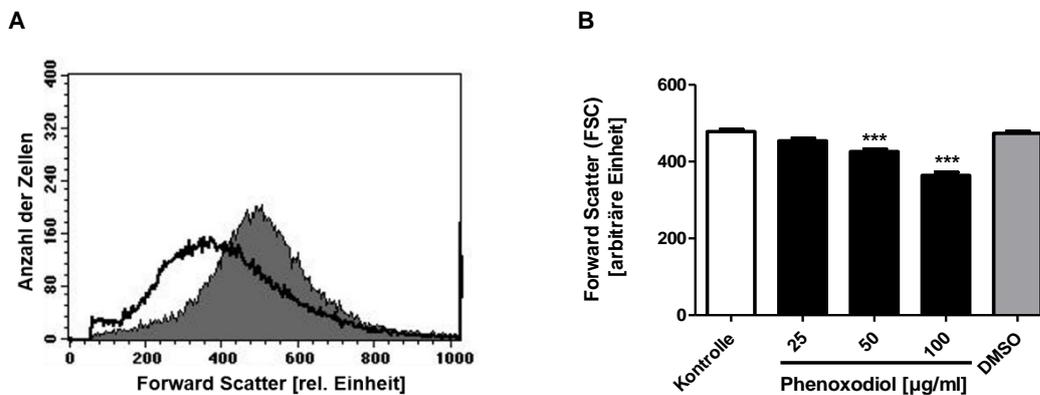


Abbildung 19: Effekt von Phenoxodiol auf die Zellgröße der Erythrozyten modifiziert nach [108]. **A** Original-Histogramm des Forward Scatters der Erythrozyten als Maß für die Zellgröße nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Phenoxodiol (100 µg/ml) (schwarze Linie) [108]. **B** Arithmetisches Mittel ± SEM ($n = 27$) des Forward Scatters der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Phenoxodiol (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (100 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Phenoxodiol (ANOVA) [108].

Aus den obenstehenden Versuchsergebnissen wird ersichtlich, dass das Isoflavon Phenoxodiol sowohl einen steigernden Einfluss auf die Phosphatidylserinexposition ausübt, als auch eine Verringerung der Zellgröße bewirkt und somit die Auslösung der Eryptose bewirken kann. In den nachfolgenden Untersuchungen verfolgten wir daher das Ziel, tiefere Informationen über die involvierten Signalwege und Wirkmechanismen zu erhalten.

3.2.3 Intrazelluläre Kalziumkonzentration - Fluo-3-AM

Ein wichtiger und vielfach involvierter Mechanismus zur Auslösung der Eryptose stellt die Öffnung der nicht-selektiven Kationenkanäle mit daraus resultierender Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration dar (Kapitel 1.3.3). Um zu überprüfen, ob auch die durch Phenoxodiol hervorgerufene Eryptose eine Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration involviert, ermittelten wir nachfolgend die intrazellulären Kalziumionen nach 48-stündiger Inkubation der

Erythrozyten mit ansteigender Konzentration (25-100 µg/ml) des Isoflavons. Die Messung erfolgte durch Registrierung der Fluo-3-AM-vermittelten Fluoreszenz am Durchflusszytometer. Wie in Abbildung 20 dargestellt, führt die Inkubation der Erythrozyten mit dem Isoflavon zu einer Abnahme der Fluo-3-Fluoreszenz und damit der intrazellulären Kalziumkonzentration, was sich bereits bei einer Phenoxodiolkonzentration von 25 µg/ml als statistisch signifikant erweist. Im Original-Histogramm zeigt sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine Abnahme der Fluoreszenzintensität nach der Inkubation mit dem Xenobiotikum. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Fluo-3-AM-Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 27$ für die Negativkontrolle $19,40 \pm 0,61$, für die Exposition mit 25 µg/ml Phenoxodiol $13,23 \pm 0,53$, für die Exposition mit 50 µg/ml Phenoxodiol $9,92 \pm 0,31$, für die Exposition mit 100 µg/ml Phenoxodiol $8,44 \pm 0,31$ und für die Kontrollgruppe mit 100 µg/ml DMSO $19,85 \pm 0,66$ [108].

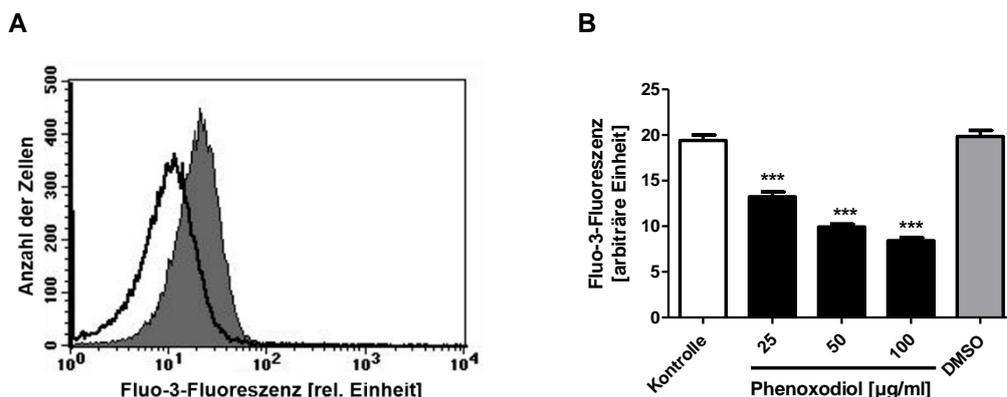
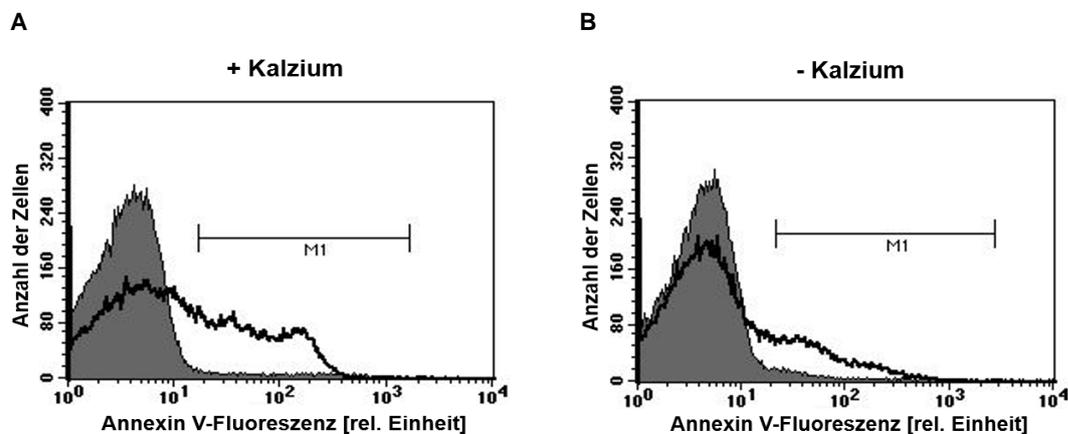


Abbildung 20: Effekt von Phenoxodiol auf die zytosolischen Kalziumionen modifiziert nach [108]. **A** Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für die zytosolischen Kalziumionen nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Phenoxodiol (100 µg/ml) (schwarze Linie) [108]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 27$) der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Phenoxodiol (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (100 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0,001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Phenoxodiol (ANOVA) [108].

3.2.4 Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC

Im Falle einer Kalzium-vermittelten Eryptose strömen diese Kationen aus dem Extrazellularraum durch die nicht-selektiven Kationenkanäle in die sterbenden Erythrozyten ein (Kapitel 1.3.3). Um herauszufinden, ob die durch Phenoxodiol induzierten Mechanismen des Zellmembranscrablings und der Eryptose ab-

hängig von extrazellulären Kalziumionen sind oder aber durch andere Signalwege hervorgerufen werden, führten wir den nachfolgend beschriebenen Versuch durch. Hierin erfolgte die Bestimmung der Phosphatidylserinexposition mittels der Annexin V-Fluoreszenz am Durchflusszytometer nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten entweder in einer Kalzium-haltigen oder in einer Kalzium-freien Ringer-Lösung mit oder ohne Zugabe des Isoflavons in einer Konzentration von 100 µg/ml. Wie in Abbildung 21 aufgezeigt wird, resultiert die Abwesenheit von extrazellulären Kalziumionen nicht in einer signifikanten Änderung der Phenoxodiol-vermittelten Annexin V-Bindung. Sowohl mit als auch ohne Kalziumionen im Extrazellularraum bewirkt das Xenobiotikum einen signifikanten Anstieg der Annexin V-Fluoreszenz. Die Original-Histogramme zeigen eine Steigerung der Annexin V-bedingten Fluoreszenz nach der Inkubation mit einer Phenoxodiolkonzentration von 100 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe sowohl in Kalzium-haltiger als auch in Kalzium-freier Ringer-Lösung. Diese Fluoreszenzzunahme ist sowohl in der Kalzium-haltigen als auch in der Kalzium-freien Ringer-Lösung ersichtlich. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 16$ für die Negativkontrolle mit Kalziumionen $0,88 \pm 0,08$, für die Exposition mit 100 µg/ml Phenoxodiol mit Kalziumionen $11,78 \pm 1,35$, für die Kontrollgruppe ohne Kalziumionen $0,57 \pm 0,07$ und für die Exposition mit 100 µg/ml Phenoxodiol ohne Kalziumionen $9,49 \pm 1,23$ [108].



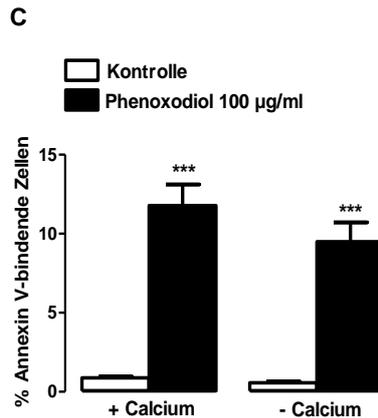


Abbildung 21: Kalziumsensitivität der Phenoxodiol-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten modifiziert nach [108]. **A** und **B** Original-Histogramme Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Flächen) und mit Phenoxodiol (100 µg/ml) (schwarze Linien). **A** stellt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalziumhaltiger Ringer-Lösung dar, **B** zeigt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalzium-freier Ringer-Lösung [108]. **C** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 16$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit Phenoxodiol (100 µg/ml) (schwarze Balken) unter Vorhandensein (linke Balken, + Kalzium) oder Abwesenheit von Kalzium (rechte Balken, - Kalzium). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Phenoxodiol (ANOVA) [108].

Aus den beiden oben beschriebenen Untersuchungen folgt, dass die durch Phenoxodiol bedingte Änderung der Phosphatidylserinexposition und die Auslösung der Eryptose nicht auf Kalziumionen und deren Einstrom aus dem Extrazellularräum beruhen [108].

3.2.5 Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA

Oxidativer Stress stellt einen möglichen Trigger der Eryptoseauslösung dar (Kapitel 1.3.3). Im Rahmen des hier durchgeführten Versuchs untersuchten wir deswegen, ob auch die Inkubation mit Phenoxodiol zu ROS führen kann und hierüber das Auftreten der Eryptose bedingt. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten mit einer Phenoxodiolkonzentration von 100 µg/ml bestimmten wir dazu durchflusszytometrisch die DCFDA-Fluoreszenz als Maß für das Vorhandensein von ROS. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 wiedergegeben und zeigen, dass das Isoflavon keine statistisch signifikante Veränderung der DCFDA-vermittelten Fluoreszenz und damit keine signifikante Entstehung von oxidativem Stress bewirkt. Im Original-Histogramm ähneln sich die DCFDA-abhängigen Fluoreszenzintensitäten der Kontrollgruppe und derjenigen Erythrozyten, welche mit 100µg/ml Phenoxodiol behandelt wurden. Das arithmetische

Mittel \pm SEM des geometrischen Mittels der DCFDA-bedingten Fluoreszenz beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 22$ für die Kontrollgruppe $18,76 \pm 0,48$ und für die Exposition mit $100 \mu\text{g/ml}$ Phenoxodiol $18,63 \pm 1,76$ [108].

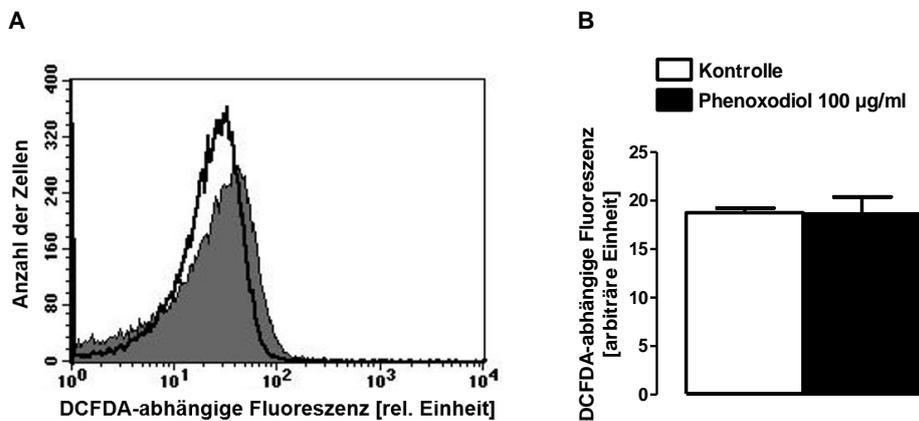


Abbildung 22: Einfluss von Phenoxodiol auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten modifiziert nach [108]. **A** Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für den oxidativen Stress nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Phenoxodiol ($100 \mu\text{g/ml}$) (schwarze Linie) [108]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 22$) der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Phenoxodiol ($100 \mu\text{g/ml}$) (schwarzer Balken) (T-Test) [108].

3.2.6 Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper

Ein häufig auftretender und von Kalziumionen unabhängiger Signalweg der Eryptose ist derjenige vermittelt über Ceramid (Kapitel 1.3.3). Da wir mithilfe der zuvor durchgeführten Versuche das Mitwirken von Kalziumionen an der Phenoxodiol-vermittelten Eryptose in großen Teilen ausschlossen, soll die nachfolgende Untersuchung klären, ob stattdessen Ceramid in die Auslösung des gesteuerten erythrozytären Zelltodes involviert ist. Dazu bestimmten wir die Ceramidhäufigkeit auf der Oberfläche der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Phenoxodiol in der Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ mithilfe der Durchflusszytometrie durch spezifische Primär- und fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper. Abbildung 23 stellt die Ergebnisse der Messung dar und zeigt auf, dass das Isoflavon die Ceramid-bedingte Fluoreszenz und damit das Ceramidvorkommen auf den roten Blutkörperchen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Im Original-Histogramm ist eine Steigerung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit $100 \mu\text{g/ml}$ Phenoxodiol im Vergleich zur Negativkontrolle aufgezeigt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geome-

trischen Mittels der Antikörper-bedingten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 13$ für die Kontrollgruppe $10,04 \pm 0,31$ und für die Exposition mit $100 \mu\text{g/ml}$ Phenoxodiol $17,13 \pm 0,75$ [108].

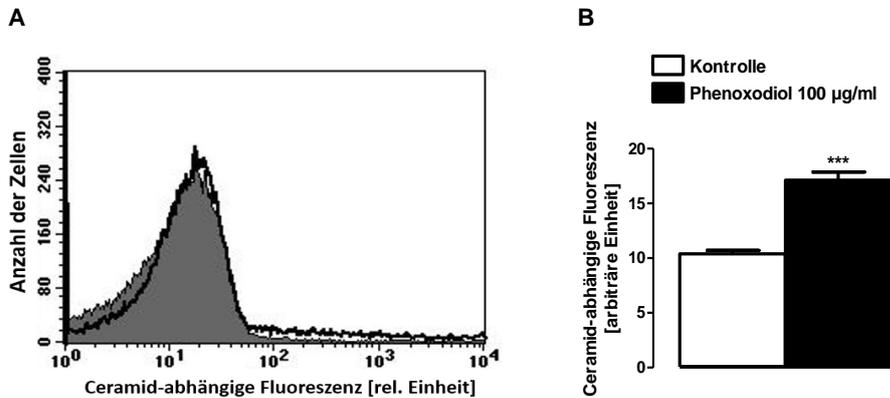


Abbildung 23: Effekt von Phenoxodiol auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche modifiziert nach [108]. **A** Original-Histogramm der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Phenoxodiol ($100 \mu\text{g/ml}$) (schwarze Linie) [108]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 13$) der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Phenoxodiol ($100 \mu\text{g/ml}$) (schwarzer Balken). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Phenoxodiol (T-Test) [108].

3.3 Einfluss von Raloxifen auf die Eryptose

Das folgende Kapitel zeigt die Beeinflussung der Eryptose durch den selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen auf. Das letztere Xenobiotikum ist in der klinischen Anwendung insbesondere in der Osteoporoseprophylaxe, in der Behandlung manifester Osteoporosen bei postmenopausalen Frauen und in der Chemoprävention von Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen bei risikobehafteten oder von Osteoporose betroffenen Frauen relevant. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden verschiedene Wirkkonzentrationen überprüft sowie die Wirkung auf die Phosphatidylserinexposition, die Zellgröße und die zytosolische Kalziumkonzentration, den Einfluss extrazellulärer Kalziumionen, die Entstehung von oxidativem Stress und die Anhäufung von Ceramid auf den Erythrozyten herausgearbeitet.

3.3.1 Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC

Zu den morphologischen Hauptkennzeichen des gesteuerten, erythrozytären Zelltodes zählt das Zellmembranscrambling, in dessen Folge das Lipid Phosphatidylserin auf das äußere Blatt der Zellmembran transloziert und dort exprimiert wird (Kapitel 1.3.1). Um herauszufinden, ob Raloxifen Auswirkungen auf die Eryptose zeigt, überprüften wir im ersten Schritt dieser Versuchsreihe daher die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten nach Einwirkung dieses Xenobiotikums. Hierzu erfolgte eine 48-stündige Inkubation der roten Blutkörperchen mit aufsteigenden Raloxifenkonzentrationen (15-60 µg/ml) und anschließend die durchflusszytometrische Bestimmung der Annexin V-Fluoreszenz als Maß für die Phosphatidylserinexposition. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 wiedergegeben und weisen für alle getesteten Konzentrationen des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators eine signifikante Steigerung der Annexin V-vermittelten Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Im Original-Histogramm ist die Zunahme der Annexin V-Fluoreszenz nach der Einwirkung von 60 µg/ml Raloxifen gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 16$ für die Kontrollgruppe $1,01 \pm 0,17$, für die Exposition mit 15 µg/ml Raloxifen $12,38 \pm 1,54$, für die Exposition mit 30 µg/ml Raloxifen $44,21 \pm 4,10$, für die Exposition mit 60 µg/ml Raloxifen $62,81 \pm 3,06$ und für die Kontrollgruppe mit 60 µg/ml DMSO $0,92 \pm 0,15$.

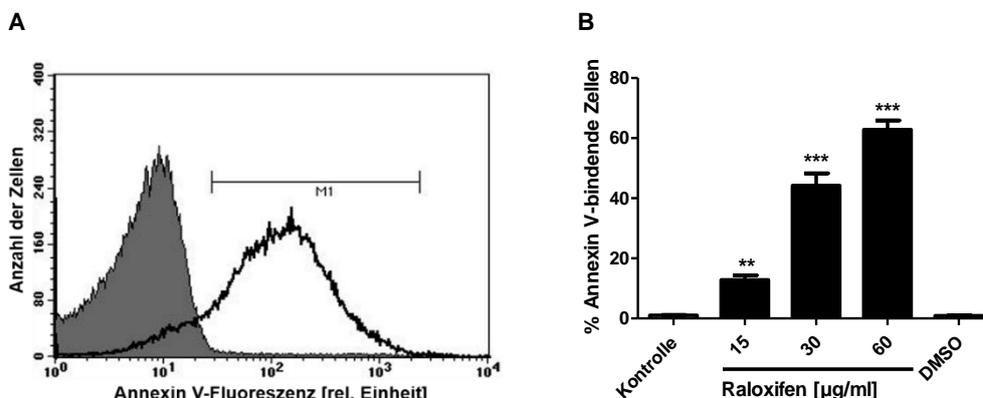


Abbildung 24: Effekt von Raloxifen auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten. **A** Original-Histogramm Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarze Linie). **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 16$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Raloxifen (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml)

(schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (60 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. **($p < 0.01$) und ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Raloxifen (ANOVA).

3.3.2 Zellgröße - Forward Scatter

Neben der Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten gehört auch die Reduktion der Zellgröße durch einen Kaliumchlorid- und Wasserverlust zu den Hauptcharakteristika der Eryptose (Kapitel 1.3.1). Folglich bestimmten wir zur Beurteilung der Raloxifenwirkung auf die Eryptose ebenfalls die Größe der roten Blutkörperchen. Dazu erfolgte die Messung des Forward Scatters am Durchflusszytometer nach einer 48-stündigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators (15-60 µg/ml). Wie in Abbildung 25 dargestellt ist, bewirkt Raloxifen eine Abnahme des Vorwärtsstreulichts und damit der Zellgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz erlangt diese Beobachtung ab einer Konzentration von 30 µg/ml des Xenobiotikums. Im Original-Histogramm ist eine Linksverschiebung hin zu kleineren Werten des Vorwärtsstreulichts nach Inkubation mit einer Raloxifenkonzentration von 60 µg/ml aufgezeigt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Vorwärtsstreulichtintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 16$ für die Kontrollgruppe $512,06 \pm 11,47$, für die Exposition mit 15 µg/ml Raloxifen $477,59 \pm 9,32$, für die Exposition mit 30 µg/ml Raloxifen $370,53 \pm 18,77$, für die Exposition mit 60 µg/ml Raloxifen $361,58 \pm 12,90$ und für die Kontrollgruppe mit 60 µg/ml DMSO $514,46 \pm 10,76$.

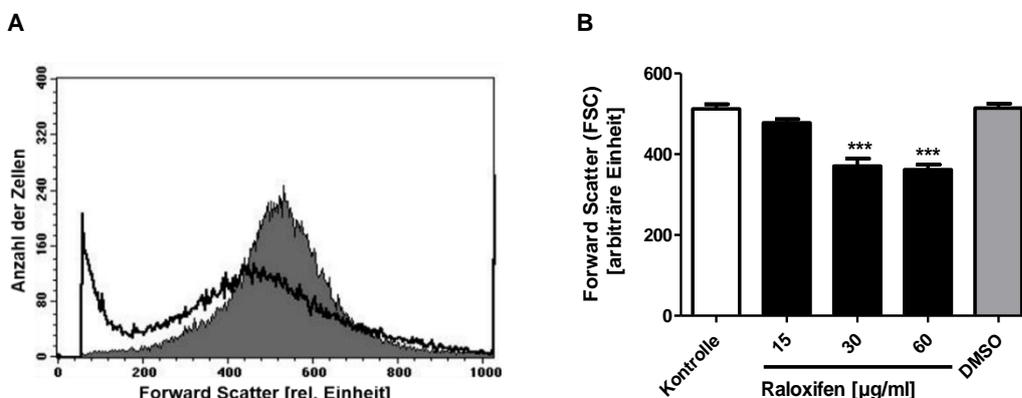


Abbildung 25: Effekt von Raloxifen auf die Zellgröße der Erythrozyten. A Original-Histogramm des Forward Scatters der Erythrozyten als Maß für die Zellgröße nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarze Linie). B Arithmetisches Mittel \pm SEM

*(n = 16) des Forward Scatters der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Raloxifen (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (60 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Raloxifen (ANOVA).*

Zusammen betrachtet legen die beiden oben aufgeführten Versuche dar, dass der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen sowohl eine Phosphatidylserinexposition als auch eine Abnahme der Zellgröße in den Erythrozyten hervorruft und somit in der Lage ist, die Eryptose zu bewirken. Das Bestreben der anschließenden Versuche ist deshalb, weiterführende Erkenntnisse über diejenigen Mechanismen und Signalwege zu erhalten, welche durch Raloxifen induziert werden.

3.3.3 Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM

Ein zentraler und frequent vorkommender Mechanismus der Eryptoseauslösung ist die Öffnung von erythrozytären, nicht-selektiven Kationenkanälen, welche zu einem Einströmen von Kalziumionen und folglich einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt (Kapitel 1.3.3). Durch den nachfolgenden Versuch soll daher abgeklärt werden, ob auch der durch Raloxifen induzierte gesteuerte Zelltod der roten Blutkörperchen mit einer Steigerung der intrazellulären Kalziumionen einhergeht. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten mit ansteigenden Konzentrationen des Xenobiotikums (15-60 µg/ml) bestimmten wir deshalb die zytosolische Kalziumkonzentration mithilfe der Fluo-3-AM-Fluoreszenz am Durchflusszytometer. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse aufgeführt und es ist ersichtlich, dass Raloxifen in allen getesteten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Fluo-3-Fluoreszenz und damit die Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen hervorruft. Im Original-Histogramm ist im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme der Fluo-3-Fluoreszenzintensität nach dem Einwirken von 60 µg/ml Raloxifen zu erkennen. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Fluo-3-AM-Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 16$ für die Negativkontrolle $20,79 \pm 0,51$, für die Exposition mit 15 µg/ml Raloxifen $27,95 \pm 1,34$, für die Exposition mit 30

$\mu\text{g/ml}$ Raloxifen $61,96 \pm 2,47$, für die Exposition mit $60 \mu\text{g/ml}$ Raloxifen $40,35 \pm 1,86$ und für die Kontrollgruppe mit $60 \mu\text{g/ml}$ DMSO $21,40 \pm 0,58$.

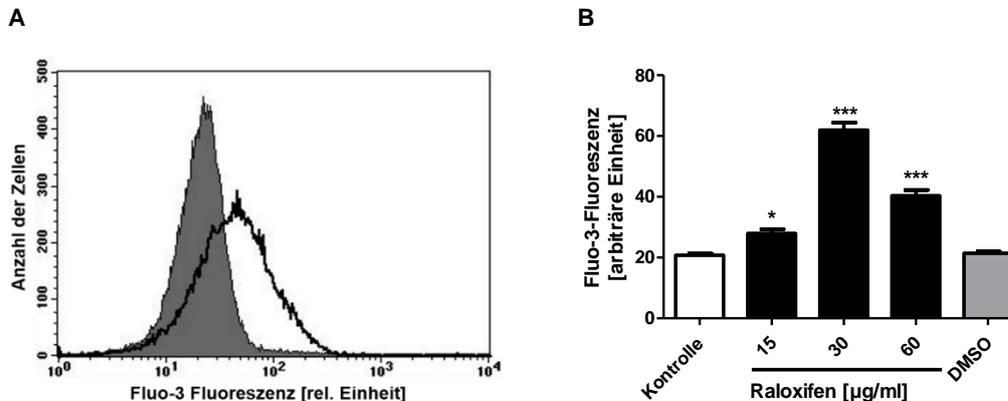


Abbildung 26: Effekt von Raloxifen auf die zytosolischen Kalziumionen. **A** Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für die zytosolischen Kalziumionen nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Raloxifen ($60 \mu\text{g/ml}$) (schwarze Linie). **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 16$) der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Raloxifen ($15 \mu\text{g/ml}$, $30 \mu\text{g/ml}$, $60 \mu\text{g/ml}$) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO ($60 \mu\text{g/ml}$) (grauer Balken) dargestellt. * ($p < 0.05$) und *** ($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Raloxifen (ANOVA).

3.3.4 Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC

Der Kalzium-abhängige Signalweg der Eryptose beruht auf dem Einstrom von extrazellulären Kalziumionen nach einer Öffnung der nicht-selektiven Kationenkanäle in der Erythrozytenmembran. Weiterhin kann der gesteuerte Zelltod der Erythrozyten jedoch auch losgelöst von Kalziumionen hervorgerufen werden (Kapitel 1.3.3). Um Aufschluss darüber zu erhalten, inwiefern die Raloxifen-vermittelte Phosphatidylserinexposition und die damit einhergehende Eryptose auf der Anwesenheit von extrazellulären Kalziumionen beruht und ob weitere, Kalzium-unabhängige Mechanismen mitwirken, erfolgte der untenstehende Versuch. Hierin ermittelten wir die Phosphatidylserinexposition mittels der Annexin V-Fluoreszenz am Durchflusszytometer, nachdem die Erythrozyten für 48 Stunden entweder in einer Kalzium-haltigen oder in einer Kalzium-freien Ringer-Lösung mit oder ohne $60 \mu\text{g/ml}$ Raloxifen inkubiert worden waren. Abbildung 27 gibt die Ergebnisse wieder und legt dar, dass der selektive Östrogenrezeptor-Modulator sowohl in Anwesenheit von extrazellulären Kalziumionen als auch bei deren Fehlen die Annexin V-Fluoreszenz und damit

die Phosphatidylserinexposition statistisch signifikant verstärkt. Zwar neigt die Annexin V-vermittelte Fluoreszenz zu einer Abschwächung unter Depletion der extrazellulären Kalziumionen, dieser Effekt erlangt allerdings keine statistische Signifikanz. In den Original-Histogrammen ist sowohl unter Anwesenheit von extrazellulären Kalziumionen als auch unter deren Absenz eine Steigerung der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation mit einer Raloxifenkonzentration von 60 µg/ml im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 12$ für die Negativkontrolle mit Kalziumionen $0,72 \pm 0,07$, für die Exposition mit 60 µg/ml Raloxifen mit Kalziumionen $56,74 \pm 1,61$, für die Negativkontrolle ohne Kalziumionen $0,51 \pm 0,05$ und für die Exposition mit 60 µg/ml Raloxifen ohne Kalziumionen $51,02 \pm 3,0$.

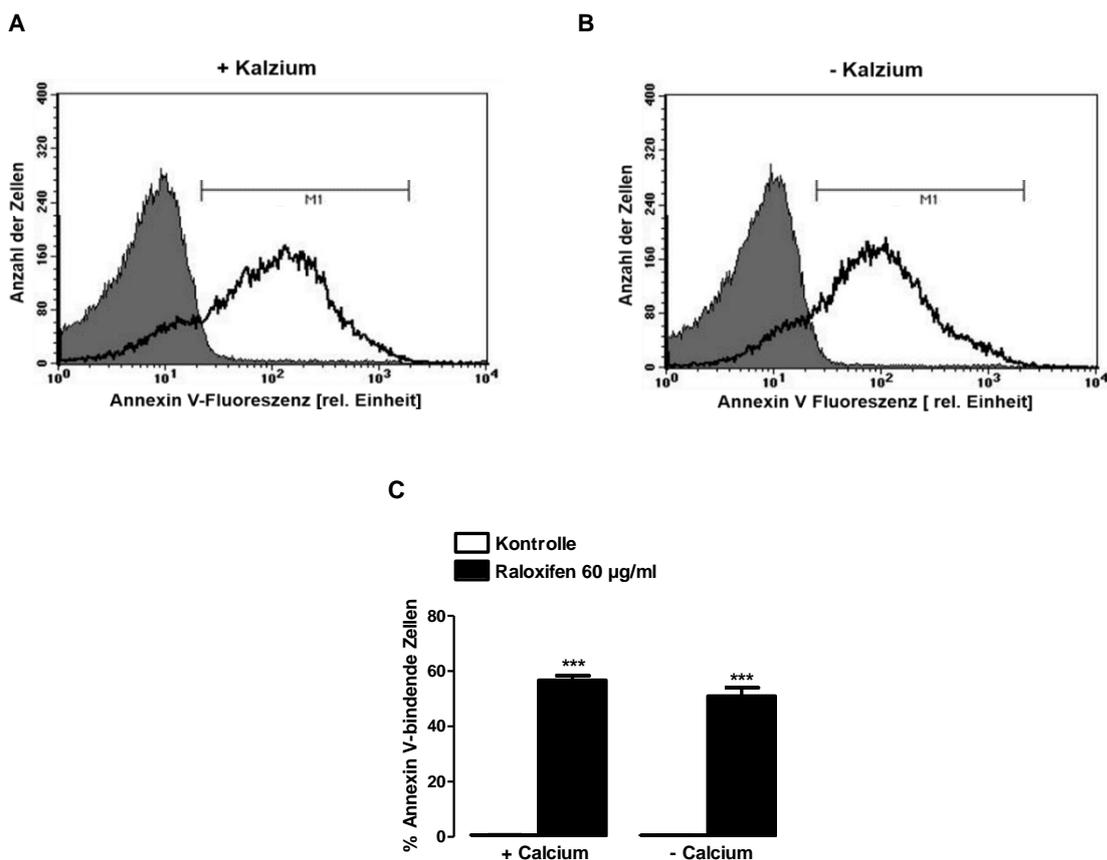


Abbildung 27: Kalziumsensitivität der Raloxifen-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten. **A** und **B** Original-Histogramme Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Flächen) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarze Linien). **A** stellt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalzium-haltiger Ringer-Lösung dar, **B** zeigt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalzium-freier Ringer-Lösung. **C** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 12$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-

Lösung ohne (weiße Balken) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarze Balken) unter Vorhandensein (linke Balken, + Kalzium) oder Abwesenheit von Kalzium (rechte Balken, - Kalzium). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Raloxifen (ANOVA).

Die beiden vorherigen Versuche zeigen auf, dass Raloxifen die Eryptoseauslösung sowohl über die Involvierung von Kalzium-abhängigen Mechanismen, als auch zu großen Teilen losgelöst von Kalzium über alternative Signalwege bewirkt.

3.3.5 Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA

Die Öffnung der nicht-selektiven Kationenkanäle und der anschließende Einstrom von Kalziumionen in die Erythrozyten kann unter anderem durch das Einwirken von oxidativem Stress bewirkt werden (Kapitel 1.3.3). Vor diesem Hintergrund untersuchten wir nachfolgend, ob auch die durch Raloxifen bedingte Erhöhung der Kalziumkonzentration – zumindest zum Teil – durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit durch oxidativen Stress vermittelt wird. Die Klärung erfolgte durch die durchflusszytometrische Messung der DCFDA-Fluoreszenz nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten mit 60 µg/ml des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators. Abbildung 28 gibt die Ergebnisse wieder und zeigt auf, dass Raloxifen gegenüber der Negativkontrolle eine statistisch signifikante Steigerung der DCFDA-vermittelten Fluoreszenz und damit die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bewirkt. Im Original-Histogramm ist eine Rechtsverschiebung hin zu erhöhten Werten der DCFDA-Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit 60 µg/ml Raloxifen im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der DCFDA-vermittelten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 15$ für die Negativkontrolle $21,50 \pm 0,88$ und für die Exposition mit 60 µg/ml Raloxifen $36,79 \pm 2,39$.

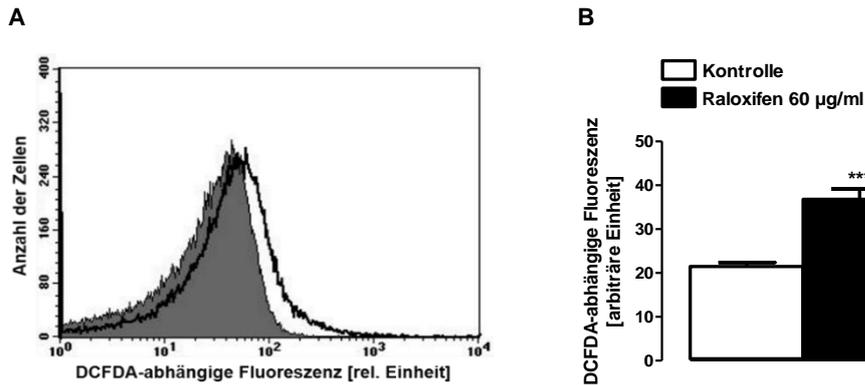


Abbildung 28: Einfluss von Raloxifen auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten. **A** Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für den oxidativen Stress nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarze Linie). **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 15$) der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarzer Balken). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Raloxifen (T-Test).

3.3.6 Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper

Weiterhin bietet das Lipid Ceramid eine wesentliche Möglichkeit zur Auslösung des gesteuerten Zelltodes der Erythrozyten (Kapitel 1.3.3). Dabei kann der Ceramid-bewirkte Signalweg sowohl zusammen mit als auch unabhängig von den Kalzium-vermittelten Mechanismen auftreten. Nachfolgend ermittelten wir aus diesem Grund, ob Ceramid auch für die durch Raloxifen ausgelöste Eryptose eine Relevanz besitzt. Dazu testeten wir die Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit 60 µg/ml des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators mithilfe des Durchflusszytometers auf ihr Ceramidvorkommen durch die Verwendung von spezifischen Primär- und fluoreszierenden Sekundärantikörpern. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass Raloxifen die Ceramid-bedingte Fluoreszenz und damit die Häufigkeit dieses Lipids an der Erythrozytenoberfläche signifikant steigert. Im Original-Histogramm ist diese Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit 60 µg/ml des Xenobiotikums im Vergleich zur Negativkontrolle aufgezeigt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Antikörper-bedingten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 6$ für die Kontrollgruppe $16,84 \pm 0,33$ und für die Exposition mit 60 µg/ml Raloxifen $45,06 \pm 4,50$.

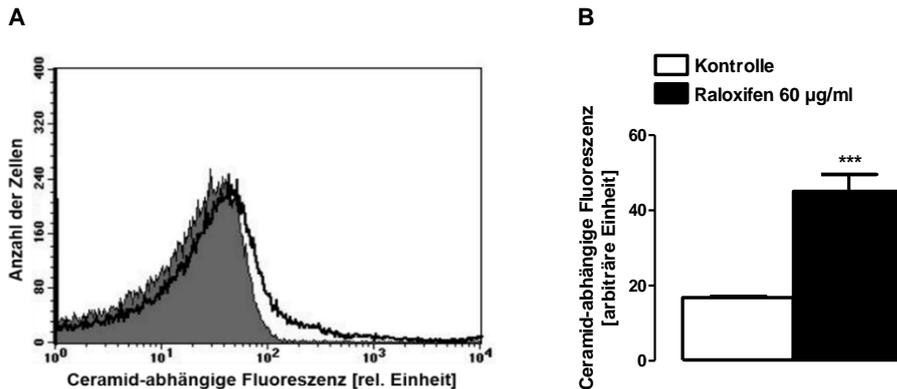


Abbildung 29: Effekt von Raloxifen auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche. A Original-Histogramm der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarze Linie). **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 6$) der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Raloxifen (60 µg/ml) (schwarzer Balken). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Raloxifen (T-Test).

3.4 Einfluss von Taurolidin auf die Eryptose

Schließlich werden die Ergebnisse der Untersuchung hinsichtlich der Beeinflussung der Eryptose durch das Taurinderivat Taurolidin aufgezeigt. Letztgenanntes Xenobiotikum ist in der klinischen Anwendung aufgrund seiner breiten antibakteriellen Wirkung und in der medizinischen Forschung in Bezug auf seine antineoplastische Aktivität bedeutsam. Untersucht wurden sowohl verschiedene Wirkkonzentrationen des Taurolidins als auch die Phosphatidylserinexposition, die Zellgröße, die zytosolische Kalziumkonzentration, der Einfluss extrazellulärer Kalziumionen, die Entstehung von oxidativem Stress sowie die Anhäufung von Ceramid auf den Erythrozyten in Folge einer Inkubation.

3.4.1 Phosphatidylserinexposition - Annexin V-FITC

Der Verlust der Membranasymmetrie und die damit einhergehende Translokation von Phosphatidylserin auf das äußere Blatt der Zellmembran ist eines der wesentlichen und kennzeichnenden Merkmale der Eryptose (Kapitel 1.3.1). Daher untersuchten wir zur Klärung der Frage nach dem Einfluss von Taurolidin auf den gesteuerten Zelltod der roten Blutkörperchen zunächst das Vorkommen des Lipids Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite. Nach einer 48-stündigen

Inkubation der Erythrozyten mit ansteigenden Konzentrationen des Taurinderivates (15-60 µg/ml) erfolgte dazu die Bestimmung der Phosphatidylserinexposition mithilfe der durchflusszytometrischen Bestimmung der Annexin V-bedingten Fluoreszenz. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 30 wiedergegeben und zeigen, dass Taurolidin in allen getesteten Konzentrationen eine statistisch signifikante Steigerung der Annexin V-Fluoreszenz und damit der Phosphatidylserinexposition bewirkt. Im Original-Histogramm ist eine Zunahme der Annexin V-Fluoreszenz nach der Einwirkung von 60 µg/ml Taurolidin im Vergleich zur Negativkontrolle aufgezeigt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes der Annexin-bindenden Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 15$ für die Negativkontrolle $0,74 \pm 0,08$, für die Exposition mit 15 µg/ml Taurolidin $7,36 \pm 1,20$, für die Exposition mit 30 µg/ml Taurolidin $9,96 \pm 1,76$, für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin $12,03 \pm 2,32$ und für die Kontrollgruppe mit 60 µg/ml DMSO $0,77 \pm 0,23$ [110].

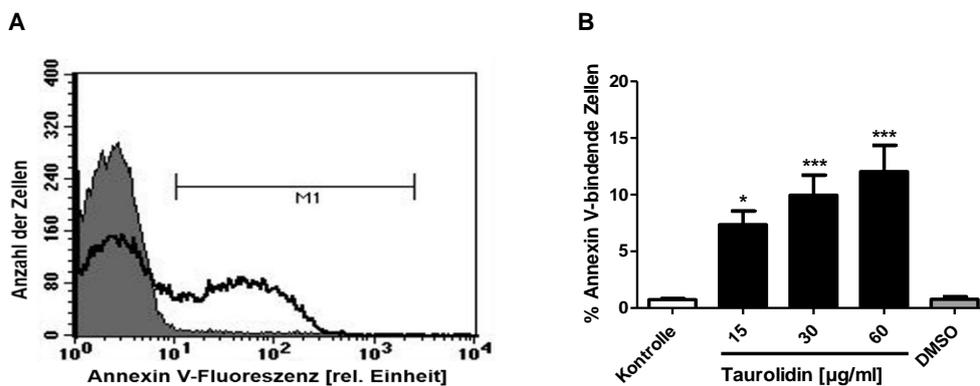


Abbildung 30: Effekt von Taurolidin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten modifiziert nach [110]. **A** Original-Histogramm Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Linie) [110]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 15$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Taurolidin (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (60 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. * ($p < 0,05$) und *** ($p < 0,001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Taurolidin (ANOVA) [110].

3.4.2 Zellgröße - Forward Scatter

Ebenso wie die Phosphatidylserinexposition stellt auch die Abnahme des Zellvolumens aufgrund eines Kaliumchloridverlustes mit einem osmotisch bedingt folgendem Wasserausstrom eines der Hauptmerkmale der Eryptose dar

(Kapitel 1.3.1). Daher erfolgte – zur Beurteilung der Taurolidin-vermittelten Wirkung auf den gesteuerten, erythrozytären Zelltod – im nächsten Schritt die Bestimmung der Zellgröße. Hierzu inkubierten wir die Erythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen des Xenobiotikums (15-60 µg/ml) für 48 Stunden, anschließend erfolgte die Bestimmung des Forward Scatters am Durchflusszytometer. In Abbildung 31 ist dargestellt, dass Taurolidin in allen getesteten Konzentrationen eine statistisch signifikante Reduktion des Vorwärtsstreulichts und damit auch der Zellgröße gegenüber der Negativkontrolle bewirkt. Im Original-Histogramm ist eine Linksverschiebung hin zu kleineren Werten der Vorwärtsstreulichtintensität nach der Einwirkung von 60 µg/ml Taurolidin aufgezeigt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Vorwärtsstreulichtintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 15$ für die Negativkontrolle $480,90 \pm 8,29$, für die Exposition mit 15 µg/ml Taurolidin $246,90 \pm 14,95$, für die Exposition mit 30 µg/ml Taurolidin $232,40 \pm 13,53$, für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin $228,80 \pm 9,86$ und für die Kontrollgruppe mit 60 µg/ml DMSO $446,70 \pm 23,73$ [110].

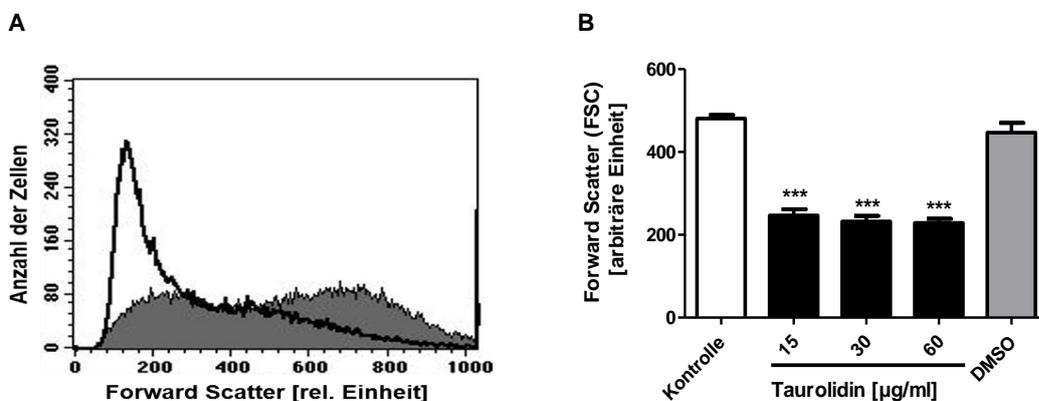


Abbildung 31: Effekt von Taurolidin auf die Zellgröße der Erythrozyten modifiziert nach [110]. **A** Original-Histogramm des Forward Scatters der Erythrozyten als Maß für die Zellgröße nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Linie) [110]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 17$) des Forward Scatters der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Taurolidin (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (60 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Taurolidin (ANOVA) [110].

Betrachtet man die Ergebnisse der beiden zuvor durchgeführten Versuche zusammen, so wird ersichtlich, dass das Taurinderivat Taurolidin, welches sowohl

ein Zellmembranscrambling als auch eine Zellschrumpfung bewirkt, die Eryptose auszulösen zu vermag. Im Rahmen der nachfolgenden Versuche überprüften wir das Mitwirken verschiedener Mechanismen und Signalwege am Taurolidin-vermittelten Zelltod.

3.4.3 Intrazelluläre Kalziumionen - Fluo-3-AM

In vielen Fällen erfolgt die Eryptose zumindest in Teilen durch eine Öffnung der nicht-selektiven Kationenkanäle in der Erythrozytenmembran mit einem anschließenden Einstrom von Kalziumionen und einer resultierenden Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration (Kapitel 1.3.3). An dieser Stelle erfolgt daher die Abklärung, ob auch der mittels Taurolidin hervorgerufene Zelltod durch eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumionen gekennzeichnet ist. Dazu überprüften wir die Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen des Taurinderivates (15-60 µg/ml) am Durchflusszytometer mithilfe der Fluo-3-AM-Fluoreszenz auf ihre intrazelluläre Kalziumkonzentration. Wie Abbildung 32 aufzeigt, bewirkt das Xenobiotikum in allen getesteten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Fluo-3-Fluoreszenz und damit der zytosolischen Kalziumionen. Im Original-Histogramm ist im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme der Fluo-3-Fluoreszenzintensität nach dem Einwirken von 60 µg/ml Taurolidin zu erkennen. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Fluo-3-AM-Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 15$ für die Negativkontrolle $19,54 \pm 0,70$, für die Exposition mit 15 µg/ml Taurolidin $56,50 \pm 4,68$, für die Exposition mit 30 µg/ml Taurolidin $59,19 \pm 4,90$, für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin $61,35 \pm 4,38$ und für die Kontrollgruppe mit 60 µg/ml DMSO $19,03 \pm 0,66$ [110].

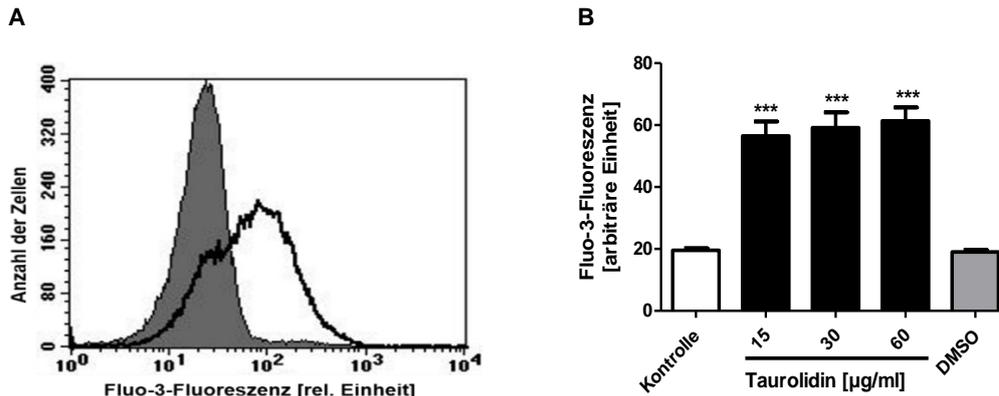


Abbildung 32: Effekt von Taurolidin auf die zytosolischen Kalziumionen modifiziert nach [110]. **A** Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für die zytosolischen Kalziumionen nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Linie) [110]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 15$) der Fluo-3-Fluoreszenz der Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Taurolidin (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml) (schwarze Balken). Zum Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO (60 µg/ml) (grauer Balken) dargestellt. ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Taurolidin (ANOVA) [110].

3.4.4 Phosphatidylserinexposition bei Kalziumdepletion - Annexin V-FITC

Aus der vorherigen Messung geht hervor, dass die Taurolidin-induzierte Eryptose mit einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration einhergeht. Diese Steigerung beruht auf dem Einströmen von extrazellulären Kalziumionen durch die nicht-selektiven Kationenkanäle der Erythrozyten (Kapitel 1.3.3). Im Rahmen des nachfolgenden Versuchs wurde daher untersucht, inwiefern eine Entfernung der extrazellulären Kalziumionen die Eryptoseauslösung durch Taurolidin beeinträchtigt und ob anderen, Kalzium-unabhängigen Mechanismen eine signifikante Wirkung zuzuschreiben ist. Hierfür inkubierten wir die Erythrozyten für 48 Stunden entweder in Kalzium-haltiger oder Kalzium-freier Ringer-Lösung mit oder ohne Zugabe von 60 µg/ml des Xenobiotikums und bestimmten anschließend die Phosphatidylserin-Exposition mittels der Annexin V-Fluoreszenz am Durchflusszytometer. Abbildung 33 gibt wieder, dass die Depletion der extrazellulären Kalziumionen die durch Taurolidin bewirkte Annexin V-Bindung der Erythrozyten signifikant inhibiert. Zwar neigt Taurolidin auch in der Kalzium-freien Ringer-Lösung dazu, die Annexin V-Bindung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu steigern, diese Wirkung erlangt aber keine statistische Signifikanz. In den Original-Histogrammen ist unter Anwesenheit von Kalziumionen eine Steigerung der Annexin V-Fluoreszenz nach der Inkubation mit einer Xenobiotikumkonzentration

von 60 µg/ml zu sehen. Im Falle einer Depletion der extrazellulären Kalziumionen ist diese Steigerung der Annexin V-Fluoreszenz weitaus schwächer ausgeprägt. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des Prozentsatzes Annexin V-bindender Erythrozyten beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 11$ für die Negativkontrolle mit Kalziumionen $0,66 \pm 0,10$, für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin mit Kalziumionen $9,34 \pm 1,85$, für die Kontrollgruppe ohne Kalziumionen $0,57 \pm 0,04$ und für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin ohne Kalziumionen $1,07 \pm 0,21$ [110].

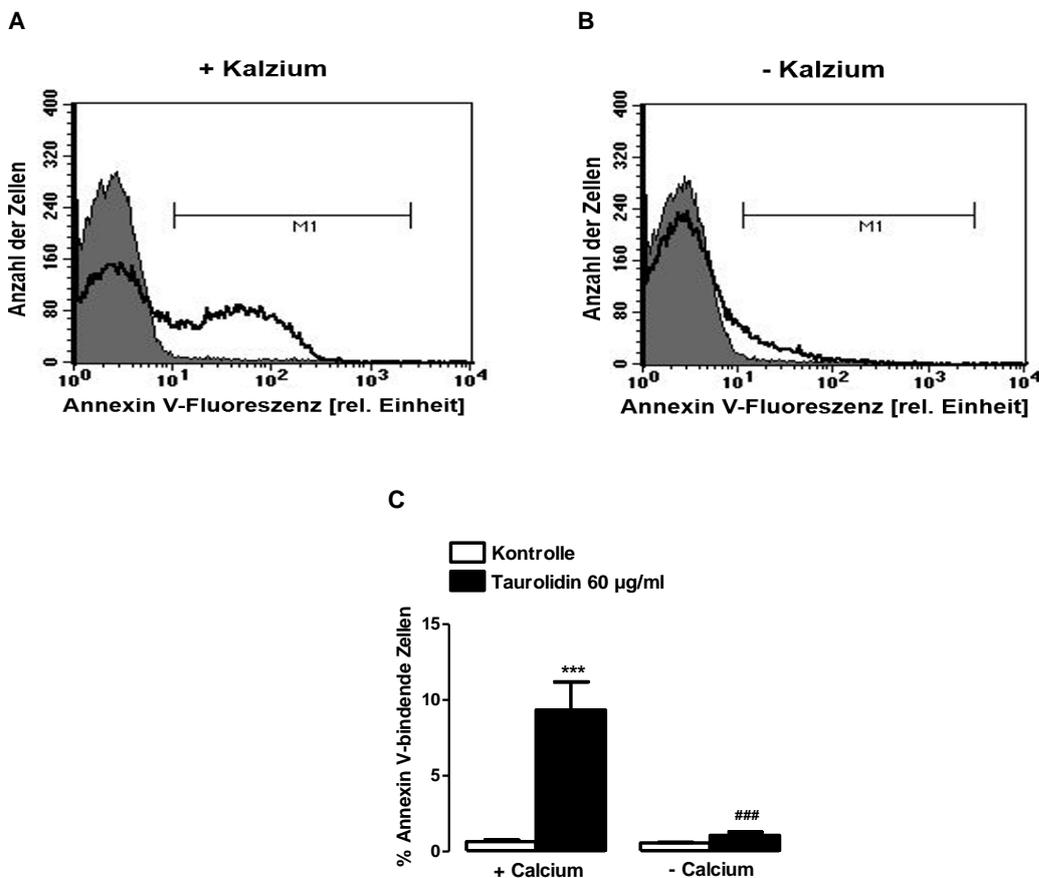


Abbildung 33: Kalziumsensitivität der Taurolidin-induzierten Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten modifiziert nach [110]. **A** und **B** Original-Histogramme Annexin V-bindender Erythrozyten als Maß für die Phosphatidylserinexposition nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Flächen) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Linien). **A** stellt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalziumhaltiger Ringer-Lösung dar, **B** zeigt die Annexin V-Fluoreszenz in Kalzium-freier Ringer-Lösung [110]. **C** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 11$) der Annexin V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Balken) unter Vorhandensein (linke Balken, + Kalzium) oder Abwesenheit von Kalzium (rechte Balken, - Kalzium). ***($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Taurolidin, ###($p < 0.001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zum Vorhandensein von Kalzium (ANOVA) [110].

Aus dem vorliegenden Versuch geht hervor, dass die durch Taurolidin bewirkte Eryptose zum Großteil auf den Kalzium-vermittelten Eryptosemechanismen und dem Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellularraum beruht [110].

3.4.5 Reaktive Sauerstoffspezies - DCFDA

Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit die Wirkung von oxidativem Stress ist ein möglicher Trigger zur Öffnung der erythrozytären, nicht-selektiven Kationenkanäle mit anschließender Erhöhung der zytosolischen Kalziumionen (Kapitel 1.3.3). Um auszumachen ob Taurolidin über die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies den zuvor festgestellten Kalziumeinstrom von extrazellulär bewirkt, bestimmten wir durchflusszytometrisch die DCFDA-Fluoreszenz nach einer 48-stündigen Inkubation der roten Blutkörperchen mit 60 µg/ml des Xenobiotikums. Wie in Abbildung 34 dargestellt, resultiert die Inkubation mit dem Taurinderivat in keiner signifikanten Veränderung der DCFDA-vermittelten Fluoreszenz und damit in keiner relevanten Entstehung von oxidativem Stress. Im Original-Histogramm ähneln sich die DCFDA-Fluoreszenzintensitäten der Kontrollgruppe und der mit 60 µg/ml Taurolidin inkubierten Erythrozyten. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der DCFDA-vermittelten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 15$ für die Negativkontrolle $19,86 \pm 0,75$ und für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin $22,48 \pm 1,58$ [110].

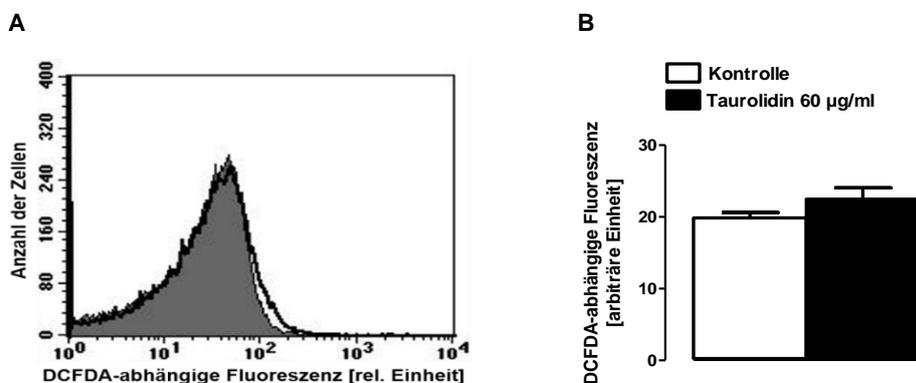


Abbildung 34: Einfluss von Taurolidin auf den oxidativen Stress in den Erythrozyten modifiziert nach [110]. **A** Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten als Maß für den oxidativen Stress nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Linie) [110]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 15$) der DCFDA-Fluoreszenz der Erythrozyten

nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarzer Balken). (T-Test) [110].

3.4.6 Ceramidhäufigkeit – Primär- und Sekundärantikörper

Neben den Kalzium-abhängigen Mechanismen ist auch der Ceramid-vermittelte Signalweg bedeutend und frequent im Ablauf der Eryptose vorkommend (Kapitel 1.3.3). Aus diesem Grund wird mit der folgenden Messung eine Beteiligung dieses Sphingolipids am gesteuerten, erythrozytären Zelltod durch Taurolidin untersucht. Dazu ermittelten wir durchflusszytometrisch das Ceramidvorkommen auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation mit 60 µg/ml des Taurinderivates mithilfe von Ceramid-spezifischen Primär- und fluoreszierenden Sekundärantikörpern. Abbildung 35 gibt die Ergebnisse dieses Versuchs wieder und legt dar, dass Taurolidin die Ceramid-bedingte Fluoreszenz der Erythrozyten und damit die Ceramidhäufigkeit statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Im Original-Histogramm ist eine Rechtsverschiebung und damit eine Zunahme der Ceramid-vermittelten Fluoreszenzintensität nach der Inkubation mit 60 µg/ml Taurolidin im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen. Der arithmetische Mittelwert \pm SEM des geometrischen Mittels der Antikörper-vermittelten Fluoreszenzintensität beträgt bei einer Gruppengröße von $n = 5$ für die Kontrollgruppe $10,64 \pm 0,22$ und für die Exposition mit 60 µg/ml Taurolidin $14,26 \pm 0,44$ [110].

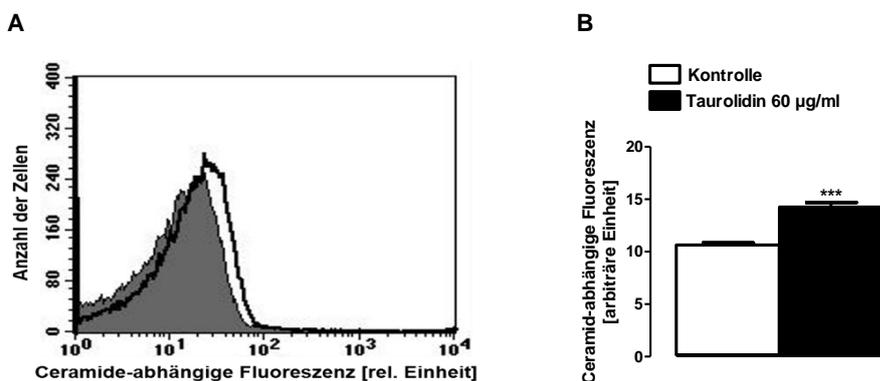


Abbildung 35: Effekt von Taurolidin auf die Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberflächen modifiziert nach [110]. **A** Original-Histogramm der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (graue Fläche) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarze Linie) [110]. **B** Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n = 5$) der Ceramidhäufigkeit auf der Erythrozytenoberfläche nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit Taurolidin (60 µg/ml) (schwarzer Balken). ***($p < 0,001$) zeigt die Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Taurolidin (T-Test) [110].

4 Diskussion

Die Eryptose als suizidaler Zelltod der roten Blutkörperchen ermöglicht eine frühzeitige und schonende Ausmusterung letzterer Zellen im Falle einer Schädigung, einer Infektion oder einer zahlenmäßigen Überschreitung des physiologischen Bedarfs [109] [110] [214] [223] [225] [315]. Als Folge des Eryptoseablaufs nehmen die roten Blutkörperchen dabei bedeutsame und kennzeichnende morphologische Veränderungen an: Zum einen verlieren die eryptotischen Zellen ihre physiologische Membranasymmetrie und exponieren in dieser Folge das Phospholipid Phosphatidylserin auf dem äußeren Blatt ihrer Zellmembran [50] [108] [109] [110] [224]. Durch dieses Merkmal können die entsprechenden roten Blutkörperchen von phagozytierenden Zellen erkannt sowie mittels der Phagozytose rasch ausgemustert und abgebaut werden [40] [85] [104] [109] [110] [152]. Durch die zeitnah ermöglichte Entfernung der sterbenden Erythrozyten wird das Eintreten ihrer schädigungsbedingten Hämolyse verhindert und daraus folgende Beschwerden werden umgangen [109] [110] [152] [185] [338]. Zum anderen wird durch den Eryptoseablauf eine Zellschrumpfung der roten Blutkörperchen ausgelöst [50] [109] [110] [224]: Die eryptotischen Zellen verlieren Kaliumchlorid zusammen mit osmotisch bedingt nach extrazellulär folgendem Wasser und werden dadurch in ihrem Volumen reduziert [55] [109] [110] [232]. Diese durch die Eryptose vermittelte Zellschrumpfung wird ebenfalls als Mechanismus angesehen, eine schädigungsbedingte Zellschwellung und letztlich eine Ruptur, also die Hämolyse der Erythrozyten, zu verhindern [109] [110] [208] [232].

Die Umgehung der Hämolyse ist von großer Relevanz, da eine unkontrollierte Zellruptur zu einer Freisetzung intrazellulärer Komponenten führt und somit über eine hohe schädigende Wirkung verfügt [109] [110]. Neben der Auslösung eines Entzündungsgeschehens [152] [334] ist dabei unter anderem eine Nierenschädigung durch das Ausfallen des freigesetzten Hämoglobins in den Nierentubuli [149] [334] oder eine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation [44] [72] [392] denkbar [109] [110].

Über diesen geschilderten Aspekt einer Vermeidung der Hämolyse hinaus unterstützt das Auftreten der Eryptose weiterhin die Ausmusterung der im Falle des Krankheitsbildes Malaria infizierten roten Blutkörperchen [109] [112]. Die ursächlichen Plasmodien üben auf die betroffenen Erythrozyten einen vermehrten oxidativen Stress aus [16] [29] [130] und bewirken dadurch eine gesteigerte Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin [49] [225]. In der Folge werden die Plasmodium-infizierten Zellen ausgesondert und dem Auftreten einer Parasitämie wird entgegengewirkt [109] [112] [225]. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs kommt als ein möglicher Therapieansatz zur Bekämpfung einer Malariainfektion die Anwendung Eryptose-fördernder Xenobiotika zur weiteren Steigerung des erythrozytären Zelltodes in Frage [220] [221]. Bei einem derartigen Ansatz wird als vorteilhaft angesehen, dass die eingesetzten Arzneimittel nicht an Zielstrukturen der Plasmodien angreifen und sich somit keine Resistenzen durch Mutationen auszubilden vermögen [112].

Auf der anderen Seite gilt es zu beachten, dass aus der zuvor geschilderten raschen Ausmusterung der eryptotischen und durch exponiertes Phosphatidylserin gekennzeichneten roten Blutkörperchen auch nachteilige Konsequenzen folgen können [109] [110]: Einerseits wird die Entwicklung einer Anämie bedingt, sobald die Erythrozytenneubildung mittels der Erythropoiese die vermehrte Zellaussonderung aufgrund der Eryptose nicht auszugleichen vermag [109] [110] [214] [223]. Andererseits können sich die sterbenden Erythrozyten aufgrund der Veränderungen innerhalb ihrer Zellmembran an die Endothelzellen, welche das Gefäßlumen auskleiden, anlagern [44] [72] [109]. Auf diese Weise ist vor allem bei einem stark ausgeprägten Eryptosegeschehen infolge einer Veränderung der Gerinnungsaktivität und der Ausbildung von Thromben mit einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation zu rechnen [44] [72] [109] [110] [392].

Neben der eben diskutierten Bedeutung der Eryptose im Hinblick auf die klinischen Aspekte gilt es auch die Relevanz des gesteuerten, suizidalen Erythrozytentodes in Bezug auf die Grundlagenforschung zu bedenken: Die roten Blutkörperchen gelten aufgrund ihres weitestgehenden Fehlens von Zellorganellen, insbesondere des Zellkerns und der Mitochondrien, als zweckmäßig und einfach konstituiert [84] [219]. Trotz dieses Mangels zeigen die letzteren Zellen

als Konsequenz auf eine Einwirkung verschiedener Stressoren einen gesteuerten Zelltod ähnlich der Apoptose Organellen-haltiger Zellen und sind somit dazu in der Lage, ihr Überleben und Sterben aktiv und selbstständig zu regulieren [84] [212] [225]. Ihr programmierter Zelltod, die Eryptose, stellt einen Mitochondrien- und in großen Teilen auch Caspasen-unabhängigen Mechanismus des suizidalen Sterbens dar [31] [84] [225]. Da Organellen-haltige Zellen entbunden von Caspasen den programmierten Zelltod durchlaufen zu vermögen [43] [97] [159] [247] und einige der regulatorischen Moleküle innerhalb der Eryptose auch im Rahmen der Apoptose mitwirken [219], könnte die Eryptose als ein vereinfachtes Modell zur Erforschung Organellen- und Caspasen-unabhängiger Mechanismen der Apoptose angesehen werden [219] [225]. Als reizvoll ist bei einem solchen Ansatz anzusehen, dass die roten Blutkörperchen als frequente und leicht zu akquirierende Zellen der Forschung in großer Anzahl zur Verfügung stehen ohne dabei Probanden einer unvermeidbar hohen Gefahr auszusetzen [219]. *In vitro* können die gewonnenen Zellen dann ausgiebig untersucht werden [219]. Damit erscheint es weiterführend, Signalwege, Regulationen oder pathophysiologische Aspekte, welche im Rahmen der Eryptose auftreten, auf ihr Vorkommen und ihre Relevanz innerhalb der Apoptose hin zu überprüfen [219] [225]. Mittels eines tiefgehenden Einblickes und eines fundierten Verständnisses der Abläufe und Mechanismen, sowie der regelrechten Regulierung, der pathologischen Entkoppelung und der therapeutischen Manipulationsmöglichkeit des programmierten Erythrozytentodes könnte in dieser Sache zunächst die Grundlagen-, und gegebenenfalls nachfolgend die anwendungsbasierte, klinisch ausgerichtete Forschung auf dem Themengebiet der Apoptose vorangebracht werden [219] [225].

Die Zielsetzung dieser Dissertation liegt in der Feststellung und der anschließenden Untersuchung neuer, bislang unbekannter Regulatoren des programmierten Zelltodes der roten Blutkörperchen, um somit die derzeitigen Erkenntnisse über die Eryptose zu vertiefen und zu erweitern. Aus diesen grundlagenforschungsbezogenen Erkenntnissen vermag sich zukünftig die Möglichkeit zu ergeben, innerhalb der klinischen Praxis die Behandlung mit Arzneimitteln an

Begleiterkrankungen wie unter anderem Anämien, Tumorleiden, Organinsuffizienzen, Sepsis oder thromboembolische Ereignisse anzupassen. Ebenso können Eryptose-beeinflussende Medikamente gezielt eingesetzt werden, um Grunderkrankungen wie die Protozoonose Malaria oder Anämien zu therapieren. Entsprechend der Zielsetzung wurden das Sesquiterpenlacton Costunolid, das Isoflavon Phenoxodiol, der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen sowie das Taurinderivat Taurolidin auf ihre Beeinflussung des gesteuerten Erythrozytentodes hin überprüft [108] [109] [110]. Allen dieser angeführten Xenobiotika ist gemein, dass sie als Stimulatoren der Apoptose, also des programmierten Todes Zellkern- und Mitochondrien-haltiger Zellen, gelten [10] [160] [199] [243] [279] [282] [288] [349] [388]. Vor diesem Hintergrund erscheint daher auch eine Wirkung auf die Eryptose als möglich und denkbar [108] [109] [110].

Aus den im Rahmen der durchgeführten Versuche erhobenen Daten wird ersichtlich, dass Erythrozyten in Folge einer Inkubation mit den Xenobiotika Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen sowie Taurolidin lädiert und in ihrer Funktion beeinträchtigt werden und schließlich – wie in den vorherigen Kapiteln aufgezeigt – ihrem programmierten, suicidalen Zelltod unterliegen [108] [109] [110]. Sämtliche der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Xenobiotika bewirken jeweils sowohl eine Phosphatidylserinexposition auf der Zellaußenseite der roten Blutkörperchen als auch eine Schrumpfung dieser Zellen [108] [109] [110]. Beide der letzteren Veränderungen zählen zu den Hauptmerkmalen der Eryptose [50] [224] und weisen somit den proeryptotischen Effekt jener Xenobiotika nach [108] [109] [110].

Mittels weiterführender Untersuchungen der Wirkung von Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen oder Taurolidin auf die Erythrozyten wurde einerseits die Eryptose-fördernde Wirkung dieser Xenobiotika weiter bekräftigt und andererseits ein tieferer Einblick in die beteiligten Mechanismen und Signalwege angestrebt. Für das Sesquiterpenlacton Costunolid geht aus den Versuchen hervor, dass letzteres sowohl Kalzium-abhängig als auch -unabhängig die Eryptose bedingt und weiterhin die Entstehung von oxidativem Stress, sowie auch die Einwirkung des Sphingolipids Ceramid bewirkt [109]. Das Isoflavon Phenoxodiol zeigt in den Untersuchungen eine Verminderung der intrazellulären Kalziumionen und eine

vermehrte Ansammlung von Ceramid [108]. Im Falle des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators Raloxifen erfolgt die Eryptose teilweise abhängig von Kalziumionen und sowohl die Entstehung von oxidativem Stress, als auch die Ansammlung des Sphingolipids Ceramid wird durch dieses Xenobiotikum bewirkt. Für das Taurinderivat Taurolidin ergeben die erhobenen Daten, dass das letztere den gesteuerten, erythrozytären Zelltod Kalzium-abhängig auslöst und die Einwirkung von Ceramid bedingt [110]. Bei allen der vier Xenobiotika ergibt sich in den Experimenten für das Membranscrambling mit Phosphatidylserinexposition sowie für die Volumenreduktion eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit zunehmendem Effekt bei ansteigender Wirkstoffkonzentration [108] [109] [110].

Die in den Versuchen angewendeten Konzentrationen der untersuchten Xenobiotika wurden in vergleichbaren Höhen gewählt, wie sie zum einen erforderlich für die Apoptoseauslösung in Tumorzellen *in vitro* sind [2] [179] [190] [270] [282] [332] [355] [358] und zum anderen *in vivo* nach Wirkstoffadministration im Plasma entweder von Menschen oder von Ratten erreicht werden [108] [109] [110] [133] [180] [310] [332] [355] [358].

Von klinischer Relevanz sind diese aufgezeigten Ergebnisse zum einen im Hinblick auf eine mögliche Anwendung von Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen und Taurolidin im Bereich der Malariatherapie: Dadurch, dass die letztgenannten Xenobiotika das Auftreten des suizidalen Erythrozytentodes fördern, ist deren vorteilhafte Wirkung auf den Krankheitsverlauf durch Sensibilisierung für die Eryptose und damit durch die vermehrte Aussonderung infizierter Erythrozyten zumindest denkbar [108]. Zum anderen gilt es zu beachten, dass aus der geschilderten raschen Ausmusterung der eryptotischen und durch exponiertes Phosphatidylserin gekennzeichneten roten Blutkörperchen auch nachteilige Konsequenzen folgen können [109] [110]: Einerseits wird die Entwicklung einer Anämie bedingt, sobald die Erythrozytenneubildung mittels der Erythropoiese die vermehrte Absonderung aufgrund der Eryptose nicht auszugleichen vermag [109] [110] [214] [223]. Andererseits können sich die sterbenden Erythrozyten aufgrund der Veränderungen innerhalb ihrer Zellmembran an die Endothelzellen, welche das Gefäßlumen auskleiden, anlagern [44] [72] [109]. Auf diese Weise ist vor allem bei einem stark ausgeprägten Eryptosegeschehen infolge einer

Veränderung der Gerinnungsaktivität und der Ausbildung von Thromben mit einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation zu rechnen [44] [72] [109] [110] [392]. Diese nachteiligen Aspekte des Eryptosegeschehens sind im Falle einer Anwendung der Xenobiotika Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen und Taurolidin zu bedenken [109] [110]. Insbesondere bei gleichzeitigem Vorliegen weiterer Pathologien wie unter anderem einer Sepsis, einer Niereninsuffizienz oder einem Krebsleiden, wodurch die roten Blutkörperchen anfälliger auf die Auslösung der Eryptose reagieren, ist eine Wechselwirkung zwischen diesen Krankheitsbildern und den vier letzteren Testsubstanzen denkbar [109]. Ungünstigerweise könnte die Eryptose unter derartigen Umständen gesteigert auftreten und sodann vermehrt jene nachteiligen Folgen mit sich ziehen.

Die mittels der Untersuchungen erhobenen und in Kapitel 3.1 beschriebenen Daten legen dar, dass das Sesquiterpenlacton Costunolid eine proeryptotische Wirkung aufweist [109]: Eine Inkubation von Erythrozyten mit diesem Xenobiotikum bewirkt sowohl deren Verlust der physiologischen Membranasymmetrie und eine damit verbundene Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin auf das äußere Membranblatt als auch eine Schrumpfung deren Zellvolumens [109]. Da beide dieser erythrozytären Veränderungen Hauptmerkmale der Eryptose darstellen [50] [224], folgt aus den erläuterten Beobachtungen, dass Costunolid den programmierten, suizidalen Zelltod der roten Blutkörperchen hervorruft [109].

Die Durchmischung der Zellmembran mit dem Verlust der Membranasymmetrie und der Phosphatidylserinexposition stellt in vielen Fällen der Eryptose eine Folge einer Kalzium-vermittelten Aktivierung des Enzyms Phospholipid-Scramblase dar [225] [351] [391]. Passend zu diesem Mechanismus wird der Costunolid-vermittelte, programmierte erythrozytäre Zelltod von einer signifikanten Zunahme der Fluo-3-Fluoreszenz und damit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumaktivität begleitet [109]. Mittels weiterführender Versuche unter Depletion der extrazellulären Kalziumionen wird eine signifikante Abschwächung der Externalisierung von Phosphatidylserin ersichtlich [109]. Aus der Zusammenführung dieser gesammelten Beobachtungen folgt, dass die

Testsubstanz Costunolid das Membranscrambling mit der Externalisierung des Phosphatidylserins in weiten Teilen über eine Zunahme der intrazellulären Kalziumionen durch deren Einströmen aus dem Extrazellularraum hervorruft [109]. Da allerdings selbst im Kalzium-freien extrazellulären Milieu ein signifikanter, Eryptose-bedingender Effekt durch die Inkubation mit Costunolid auftritt, sind weitere, Kalzium-unabhängige Mechanismen in der Auslösung der Phosphatidylserinexposition durch Costunolid anzunehmen [109]. Vertiefend zeigt sich eine durch das letztere Xenobiotikum hervorgerufene Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit von oxidativem Stress [109]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies könnten – wie in Kapitel 1.3.3 aufgezeigt – auf die nicht selektiven Kationenkanäle einwirken, zu deren Öffnung führen und somit das Membranscrambling mit der Externalisierung des Phosphatidylserins mitbedingen [224] [225]. Als weiteren Mechanismus für die Durchmischung der Membranlipide und den Verlust der Zellmembranasymmetrie zeigt die Versuchsreihe für die Testsubstanz Costunolid eine vermehrte Anhäufung des Sphingolipids Ceramid [109]. Dabei sind sowohl die Mechanismen, welche zur Entstehung und Anhäufung dieses Sphingolipids beitragen, als auch die Signalwege über welche eine Wirkung auf die sterbenden Erythrozyten vermittelt werden, unvollständig verstanden [208] [218] (Kapitel 1.3.3). Angenommen wird eine sensibilisierende Wirkung des Ceramids auf die Kalzium-vermittelten Abläufe und insbesondere auf die Phospholipid-Scramblase [223] [225], so dass die im Falle von Costunolid beobachtete Phosphatidylserinexposition mitunter auch auf die erhöhte Ceramidhäufigkeit zurückgeführt werden kann [109]. Der Verlust der Membranasymmetrie und die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin ermöglicht eine rasche Erkennung und nachfolgende Entfernung der eryptotischen Zellen aus der Zirkulation [109] [152] [225].

Der im Rahmen der Eryptose auftretenden Zellschrumpfung liegt als Mechanismus ein Verlust an Kaliumchlorid und osmotisch nachfolgendem Wasser zugrunde [57] [232]. Entsprechend ist im Falle der Costunolid-vermittelten Eryptose eine durch die zuvor beschriebene Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen bedingte Aktivierung der Kalzium-sensitiven Gárdos-Kanäle anzunehmen [109]. Durch diese Kanalöffnung wird ein Kaliumverlust aus den Erythrozyten

heraus mit einer nachfolgenden Hyperpolarisation an deren Zellmembran ausgelöst [56] [109] [225] [232]. In deren Folge verlassen aufgrund ihres veränderten elektrochemischen Gradienten auch Chloridionen die geschädigten Zellen und Wasser folgt aufgrund der Osmose [55] [109] [232]. Die Zellschrumpfung im Verlauf der Eryptose erfüllt dabei die Funktion, die roten Blutkörperchen vor einer schädigungsbedingten Schwellung und einer schließlichen Ruptur zu schützen und somit die Hämolyse zu verhindern [109] [208] [232].

Aus den durch die entsprechenden Versuche erhaltenen und in Kapitel 3.2 dargestellten Daten ergibt sich für das Isoflavon Phenoxodiol ein proeryptotischer Einfluss auf die roten Blutkörperchen [108]: In Folge einer Inkubation der letzteren Zellen mit jener Testsubstanz durchmischt sich zum einen die Zellmembran der Erythrozyten, sodass das im physiologischen Zustand streng internalisierte Phospholipid Phosphatidylserin auf das äußere Blatt der Zellmembran transportiert wird [108]. Zum anderen reduziert sich das Zellvolumen der behandelten roten Blutkörperchen [108]. Mit diesen beiden Veränderungen werden zwei der Hauptmerkmale des programmierten, suizidalen Erythrozytens todes erfüllt [50] [224], sodass das Xenobiotikum Phenoxodiol die Eryptose bewirkt [108].

Im Hinblick auf die involvierten Mechanismen der durch Phenoxodiol hervorgerufenen Eryptose zeigen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen eine Beteiligung des Sphingolipids Ceramid auf: Als Folge der Inkubation von Erythrozyten mit jenem Isoflavon sammelt sich das letztere Lipid vermehrt auf der Oberfläche jener Zellen [108]. Dieses Sphingolipid gilt als einer der beiden hauptsächlichen Signalwege der Eryptoseauslösung [208]. Diesbezüglich sind weder die genauen Abläufe der Ceramidentstehung und -ansammlung auf dem äußeren Membranblatt, noch dessen eindeutige Wirkungsweise vollständig verstanden [208] (Kapitel 1.3.3). Nichtsdestoweniger stellt das Ceramid einen geläufigen und bedeutsamen Auslöser der erythrozytären Membrandurchmischung mit Phosphatidylserinexposition dar [108] [223] [226]. Als eine mögliche Wirkungsweise dieses Sphingolipids ist dessen sensibilisierender Einfluss auf das Kalzium-vermittelte Membranscrambling bekannt [108] [225].

Allerdings kann aus den durchgeführten Versuchen nicht abgeleitet werden, ob das Ceramid auch im Falle der Phenoxodiol-vermittelten Eryptose sensibilisierend wirkt und ob weitere Wirkungsweisen des Ceramids beteiligt sind [108].

Gleichzeitig lässt sich aus den Ergebnissen der Erythrozyteninkubation mit Phenoxodiol ableiten, dass dieses Isoflavon eine Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration hervorruft [108]. Zusätzlich resultiert auch die Depletion extrazellulärer Kalziumionen in keiner signifikanten Abschwächung der Phosphatidylserinexposition [108]. Folglich ist anzunehmen, dass Phenoxodiol seinen proeryptotischen Effekt auf die roten Blutkörperchen unabhängig von einem Einstrom von und einer zytoplasmatischen Erhöhung der Kalziumionen vermittelt [108]. Ebenfalls übt das letztere Xenobiotikum auch keinen Einfluss auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies aus, so dass auch der oxidative Stress nicht als Mechanismus des durch Phenoxodiol hervorgerufenen programmierten Erythrozytentodes gilt [108]. Da im Rahmen der durchgeführten Versuche nur die zuvor besprochenen Mechanismen des Eryptoseablaufes überprüft wurden, sind weitere Signalwege nicht auszuschließen [108].

Die innerhalb der Versuche erhobenen und in Kapitel 3.3 aufgezeigten Daten legen einen proeryptotischen Effekt des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators Raloxifen dar: In Folge einer Inkubation mit der letzteren Testsubstanz weisen die entsprechenden roten Blutkörperchen sowohl ein Membranscrambling mit der Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin als auch eine Abnahme ihrer Zellgröße auf. Beide dieser morphologischen Veränderungen stellen bedeutende Hauptmerkmale der Eryptose dar [50] [224] und belegen somit den fördernden Einfluss von Raloxifen auf den programmierten, erythrozytären Zelltod.

Die Durchmischung der Zellmembran und die damit verbundene Externalisierung des Membranlipids Phosphatidylserin wird in vielen Fällen des Eryptosevorkommens hervorgerufen durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionen und einer resultierenden Aktivierung des Enzyms Phospholipid-Scramblase [225]

[351] [391]. Übereinstimmend hiermit sind auch die behandelten Erythrozyten in Folge der Raloxifen-vermittelten Wirkung durch eine signifikant erhöhte Fluo-3-Fluoreszenz und somit durch eine vermehrte intrazelluläre Kalziumaktivität gekennzeichnet. Auffallend ist in diesem Versuchsteil, dass keine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Raloxifenkonzentration und der Intensität der Fluo-3-Fluoreszenz vorliegt: wird die Konzentration der letzteren Testsubstanz erhöht, so erniedrigt sich die Fluo-3-Fluoreszenz nach einem initialen Anstieg im Vergleich zu geringeren Testsubstanzkonzentrationen wieder. Depletiert man in anschließenden Versuchen die extrazellulären Kalziumionen der Inkubationslösung, so zeigt sich keine signifikante Abschwächung des Membranscrablings und der Phosphatidylserinexposition. Diese Beobachtung ermöglicht die Folgerung, dass zum einen die erhöhte intrazelluläre Kalziumaktivität nicht maßgeblich auf einen Ioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum beruht, sondern beispielsweise von intrazellulären Ionenspeichern herrührt und zum anderen eine Involvierung weiterer Signalwege der Membrandurchmischung als wahrscheinlich erscheint. Vertiefend zu den bisherigen Erkenntnissen zeigen die Erythrozyten im Anschluss an eine Inkubation mit Raloxifen eine Zunahme der DCFDA-Fluoreszenz und somit eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Die letztere Testsubstanz induziert folglich oxidativen Stress für die roten Blutkörperchen. Weiterhin ergibt sich für die Raloxifen-vermittelte Eryptose, dass die getesteten Erythrozyten eine vermehrte Ansammlung des Sphingolipids Ceramid auf ihrer Zellmembran aufweisen. Auch wenn weder die Mechanismen der Ceramidentstehung, noch der eindeutige Wirkort und die Wirkweise des letzteren Lipids genau verstanden sind, so gilt Ceramid als ein wichtiger Auslöser des Membranscrablings [208] [226] (Kapitel 1.3.3). Bisher wird diesem Sphingolipid eine sensibilisierende, stimulierende Wirkung auf das Enzym Phospholipid-Scramblase zugeschrieben [225] [226], so dass auch im Falle von Raloxifen eine Beteiligung an der Membrandurchmischung mit Phosphatidylserinexposition als naheliegend erscheint. In Folge des Verlustes der physiologischen Membranasymmetrie und der Externalisierung des Phosphatidylserins können die eryptotischen roten Blutkörperchen effizient erkannt und rasch aus der Zirkulation entfernt werden [152] [225].

Dem Eryptosehauptmerkmal der Zellschrumpfung wird als zugrundeliegender Mechanismus der Verlust an Kaliumchlorid und osmotisch-gekoppeltem Wasser zugeschrieben [55] [232] (Kapitel 1.3.3). Entsprechend ist auch bei Betrachtung der Ergebnisse der Raloxifen-induzierten Eryptose davon auszugehen, dass die zuvor diskutierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumaktivität eine Öffnung der erythrozytären Gárdos-Kanäle hervorruft und somit einen Kaliumausstrom aus der Zelle bewirkt. Hieraus resultiert dann eine Hyperpolarisation der Erythrozyten, welche als treibende Kraft einen Chloridionenverlust nach extrazellulär bedingt [55] [225] [232]. Insgesamt betrachtet kommt es somit zu einem Verlust an Kaliumchlorid, Wassermoleküle folgen den ausströmenden Ionen und die roten Blutkörperchen schrumpfen [232]. Diese erythrozytäre Volumenreduktion besitzt im Kontext der Eryptose eine schützende Funktion, indem einer möglichen Hämolyse aufgrund einer schädigungsbedingten Zellschwellung entgegengewirkt wird [208] [232].

Aus den im Rahmen der Versuchsdurchführung erhobenen und in Kapitel 3.4 aufgezeigten Daten wird ein proeryptotischer Effekt des Taurinderivates Tauro-
lidin ersichtlich [110]: Die Inkubation von roten Blutkörperchen mit dem letztgenannten Xenobiotikum führt zum einen zu einer Membrandurchmischung mit der Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin und bewirkt zum anderen eine Schrumpfung des Erythrozytenvolumens [110]. Beide dieser Veränderungen zählen zu den Hauptmerkmalen der Eryptose [50] [224] und zeigen somit die stimulierende, eryptotische Wirkung auf, welche Tauro-
lidin auf die roten Blutkörperchen ausübt [110].

Das eryptotische Membranscrumbling mit dem Verlust der physiologischen Membranasymmetrie beruht bei einer Vielzahl der Eryptosegeschehnisse auf einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit nachfolgender Aktivierung des Enzyms Phospholipid-Scramblase [225] [351] [391]. Auch im Falle des getesteten Taurinderivates weisen die behandelten und inkubierten roten Blutkörperchen eine signifikante Zunahme der Fluo-3-Fluoreszenz und somit indirekt eine Zunahme der intrazellulären Kalziumaktivität auf [110]. Dabei verhält sich die Tauro-
lidin-vermittelte Zunahme der zytosolischen Kalzium-

aktivität in weiten Teilen abhängig von einem Einstrom extrazellulärer Kalziumionen in die sterbenden Erythrozyten hinein [110]: Erfolgt eine Kalziumdepletion im extrazellulären Milieu, so wird die Taurolidin-induzierte Phosphatidylserinexposition in signifikantem Ausmaß abgeschwächt [110]. Weiterhin ist in Folge einer Inkubation mit der letzteren Testsubstanz durchflusszytometrisch eine vermehrte Anhäufung des Membranlipids Ceramid zu beobachten [110]. Auch wenn der genaue Entstehungsmechanismus und die Wirkungsweise dieses Sphingolipids nicht vollständig verstanden sind, so zählt Ceramid aufgrund seines sensibilisierenden Einflusses auf die Phospholipid-Scramblase als ein wichtiger Stimulator des Zellmembranscrablings [208] [225] [226] (Kapitel 1.3.3). In Folge dieser diskutierten Membrandurchmischung werden die sterbenden roten Blutkörperchen durch das externalisierte Phosphatidylserin erkannt, wodurch deren rasche Entfernung aus der Zirkulation ermöglicht wird [110].

Die Zellschrumpfung als Hauptmerkmal der Eryptose wird mechanistisch auf einen Verlust an intrazellulärem Kaliumchlorid und osmotisch verknüpftem Wasser zurückgeführt [55] [232]. Auch für die Testsubstanz Taurolidin ist aufgrund der Versuchsergebnisse anzunehmen, dass die gesteigerte Kalziumaktivität in den roten Blutkörperchen eine aktivierende Wirkung auf die membranständigen Gárdos-Kanäle ausübt und somit den Ausstrom von Kaliumionen bewirkt [110]. Hieran anschließend strömen zum einen erythrozytäre Chloridionen aufgrund ihres elektrochemischen Gradienten sowie zum anderen osmotisch bedingt Wassermoleküle in den Extrazellularraum [55] [110] [232]. Die somit bewirkte Volumenreduktion der roten Blutkörperchen in Folge der Eryptose dient der Verzögerung und bestenfalls dem Schutz vor einer unkontrollierten, hämolytischen Zellruptur der beschädigten Erythrozyten [110] [208] [232].

Ein Einfluss des Xenobiotikums Taurolidins auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies ist aus den aufgeführten Ergebnissen nicht ersichtlich, so dass anzunehmen ist, dass die letztere Testsubstanz keinen signifikanten oxidativen Stress auf die Erythrozyten ausübt [110].

Alle der im Rahmen dieser Dissertation bewerkstelligten Experimente stellen Untersuchungen *in vitro* dar [108]. Ausführungen entsprechender tierexperimenteller Studien oder Testungen *in vivo* wurden nicht unternommen [108]. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkung muss eine Übertragung der gewonnenen Daten auf den lebenden, menschlichen Organismus und eine mögliche Anwendung der Erkenntnisse im klinischen Bereich mit entsprechendem Vorbehalt stattfinden.

Für die Versuchsdurchführung wurden rote Blutkörperchen gesunder Probanden eingesetzt [108] [109] [110]. Allerdings erscheint denkbar, dass Erythrozyten *in vivo* im Falle von Krankheiten, welche mit gesteigerten Eryptoseraten einhergehen, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Stressoren und so auch den getesteten Xenobiotika aufzuweisen vermögen [109]. Diese mögliche, vermehrte Eryptosesensibilität wird durch den vorliegenden Versuchsaufbau nicht berücksichtigt und folglich nicht erfasst, sollte aber dennoch für die weitere Interpretation und Verwendung der Daten bedacht werden.

Die ausgeführten Untersuchungen erfolgten durchweg für alle der getesteten Xenobiotika unter einheitlichen, konstant bleibenden Umständen [108] [109] [110]. Um fehlerhafte Ergebnisse durch mögliche Kontaminationen zu vermeiden, wurde die für die Versuche notwendige Auftrennung und Behandlung der roten Blutkörperchen, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, unter einer Sterilbank in zuvor desinfizierter Umgebung durchgeführt. Weiterhin fanden die Untersuchungen der Xenobiotika jeweils in Versuchsreihen unter Einschluss von Kontrollgruppen statt und wurden für jede Testsubstanz mehrfach unter Verwendung roter Blutkörperchen verschiedener Probanden wiederholt [108] [109] [110] (Kapitel 2.5). Auf diese Weise wird ermöglicht, fehlerhafte und abweichende Messwerte zu erkennen, um somit das Risiko verfälschter, ungültiger Ergebnisse zu reduzieren.

Ferner wurde angestrebt, die Versuchsbedingungen für die zu untersuchenden Erythrozyten so physiologisch wie im Rahmen der Experimente möglich zu gestalten. Entsprechend wurde in der als Nährstoffmedium verwendeten Ringer-

Lösung und im genutzten Waschpuffer eine Einstellung auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 vorgenommen. Ebenso wurde für die Versuchsdurchführung eine Inkubationstemperatur von physiologischen 37° C gewählt und die Erythrozyten wurden vor lichtbedingter Schädigung geschützt. Zu bedenken gilt es allerdings, dass die roten Blutkörperchen in isolierter Form in den Untersuchungen verwendet wurden. Physiologischerweise *in vivo* auftretende Interaktionen, Prozesse und Regulationen zwischen den Erythrozyten und weiteren Zellarten oder dem Blutplasma und seinen Bestandteilen können daher in den Studien nicht erzielt und berücksichtigt werden. Auch der Erythrokrit, also der Anteil der roten Blutkörperchen am gesamten Blutvolumen, wurde messtechnisch bedingt auf einen Wert von 0,4% anstatt der regelhaften, im Organismus vorherrschenden 42% für Frauen und 47% für Männer eingestellt, um die Genauigkeit der Messergebnisse zu erhöhen. Bei der Verwendung von Versuchsansätzen mit höheren Erythrozytenanteilen bestünde die Gefahr verschlechterter Flusseigenschaften dieser Ansätze mit einer möglichen Verfälschung der durchflusszytometrisch erhaltenen Messwerte.

Die Inkubationszeit der roten Blutkörperchen mit den verschiedenen Testsubstanzen wurde jeweils auf 48 Stunden festgelegt, um somit auch möglicherweise auftretende langsame oder verzögerte Mechanismen und Signalwege des eryptotischen Zelltodes ausmachen zu können [109]. Auch an dieser Stelle ist nichtsdestotrotz zu beachten, dass die alleinige Zugabe der Xenobiotika zu den Erythrozyten *in vitro* nicht den Abläufen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik *in vivo* entspricht: Weder die vielschichtig beeinflusste und möglicherweise verzögerte Medikamentenabsorption noch die kontinuierliche Elimination innerhalb des lebenden Organismus wird mittels der Versuchsansätze dargestellt. Ebenso vermag der Versuchsaufbau eine Distribution der Xenobiotika durch beispielsweise Einlagerung in Fettgewebe oder intrazelluläre Ansammlung sowie eine Wechselwirkung mit und Bindung an Plasmaproteine nicht darzustellen. Ein möglicherweise vorhandener Einfluss wiederholter Exposition der roten Blutkörperchen über deren Lebensspanne hinweg mit den Testsubstanzen genauso wie eine denkbare Konsequenz bei paralleler Ein-

wirkung weiterer Stressoren und Eryptosetrigger wird durch die ausgeführten Untersuchungen nicht beachtet.

Bei der Durchflusszytometrie einschließlich der angewandten Fluoreszenzfärbungen als Untersuchungsmethodik dieser Dissertation handelt es sich um eine etablierte und gängige Methode zur Zellvermessung [24] [89] [153] [205] [278] [306] [364] [368] [369]. Sowohl die Markierung der roten Blutkörperchen mit den Fluoreszenzfarbstoffen, als auch die durchflusszytometrische Messung der verschiedenen Erythrozytenparameter wurden anhand von modifizierten und etablierten Methodenprotokollen vorgenommen.

Weiterhin müssen als Einschränkungen der vorliegenden Dissertation bedacht werden, dass die durch die Testsubstanzen hervorgerufene Eryptose nicht auf alle bisher bekannten Mechanismen des erythrozytären, programmierten Zelltodes hin untersucht wurde [108] [109] [110]. So erfolgte beispielsweise keine Überprüfung einer – wenn auch seltenen – Beteiligung von Caspasen an der Eryptose aufgrund von Inkubation mit Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen oder Taurolidin, und die am Zelltod involvierten Ionenkanäle wurden nicht ausdrücklich bestimmt. Für keines der getesteten Xenobiotika erfolgte eine Festlegung eines direkten molekularen Ziel- und Wirkungspunktes [108]. Entsprechend ergibt sich die Möglichkeit einer tiefergehenden Untersuchung der aufgezeigten Testsubstanzen in Bezug auf ihre eryptotische Wirkung mittels weiterführender Versuche.

Mit der Entdeckung der Eryptose als programmierter erythrozytärer Zelltod wurde den roten Blutkörperchen eine komplexe, beträchtliche Funktionalität beigegeben und die letzteren Zellen erlangten ein beachtliches Interesse in der Forschung [223] [225]. Seither wird der programmierte Zelltod der Erythrozyten eindringlich untersucht, so dass bedeutende Erkenntnisse sowohl über den Todesablauf mit dessen involvierten Signalwegen als auch über die physiologische Bedeutung der Eryptose erlangt wurden [223] [225]. Weiterhin erfolgte auch eine Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung und eine Zuordnung des suizidalen Erythrozytentodes in der Pathogenese oder der Symptomatik

verschiedener Grunderkrankungen [223]. Eine Vielzahl an endogenen Molekülen und exogenen Xenobiotika, welche einen fördernden oder einen hemmenden Einfluss auf das Auftreten der Eryptose nehmen, wurden untersucht und dokumentiert [212]. Trotz der großen Bemühungen dieser ausgiebigen Untersuchungen sind allerdings einige Mechanismen und Zusammenhänge in der Physiologie der Eryptose ebenso wie weitere Stimulatoren und Inhibitoren bislang verborgen geblieben [214] [219] [221] [223] [315]. Für die aufkommende Forschung liegt die Relevanz daher darin, einerseits die Signalwege der Eryptose vertiefend zu charakterisieren und bisher unbekannte oder unvollständig verstandene Mechanismen wie beispielsweise die Beeinflussung der Eryptose durch das Sphingolipid Ceramid offenzulegen [208] [214] [218] [221] [223] [315]. Derartige neue Erkenntnisse über die Physiologie und den Ablauf des programmierten erythrozytären Zelltodes könnten unter Berücksichtigung der zuvor dargelegten Annahmen weiterführend auch auf das Themengebiet der Apoptose übertragen werden und somit deren Verständnis und vertiefende Erforschung voranbringen [219] [225]. Andererseits nimmt die Untersuchung weiterer Xenobiotika bezüglich einer möglichen Auswirkung auf die Eryptoseauslösung sowie die Verknüpfung weiterer Grunderkrankungen mit dem Auftreten der Eryptose insbesondere in klinischer Hinsicht eine hohe Wichtigkeit für die Forschung ein [214]. Solches weiterführendes Wissen kann beispielsweise eine Berücksichtigung der Medikamentenauswahl bei einem Vorliegen von Begleitkrankheiten oder -medikationen sowie ein tieferes Verständnis und somit gezieltere Therapien von Erkrankungen, welche von einem erhöhten Eryptosevorkommen begleitet werden, ermöglichen [212] [315]. Als besonders erwähnenswert gilt in diesem Zusammenhang das Krankheitsbild der Malaria [112]: Gelingt es zukünftig, Xenobiotika auszumachen, welche gezielt Plasmodieninfizierte Erythrozyten für deren Eryptose sensibilisieren ohne dabei gesunde rote Blutkörperchen nachteilig zu beeinflussen, so könnte eine Malariainfektion durch eine wirtsbezogene therapeutische Manipulation angegangen werden [112] [212]. Da die Plasmodien in einem solchen Fall nicht selbst den Wirkort der Therapie darstellen, ermöglichte sich durch dieses Vorgehen die Umgehung eines Selektionsdruckes mit daraus resultierenden pathogenspezifischen

Resistenzen und somit eine andauernde und effektive Behandlungsmöglichkeit [112].

In Bezug auf die im Rahmen dieser Dissertation erlangten Erkenntnisse ist zukünftig eine Überprüfung der Xenobiotika Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen und Taurolidin *in vivo* sowie im klinischen Bereich beispielsweise durch prospektive Studien konstruktiv und wünschenswert. Auf diese Weise kann erfasst werden, ob und in welchem Ausmaß die Eryptose als Anwendungsfolge auch im lebenden Organismus auftritt und weiterhin, ob es eine Beeinflussung durch Begleitumstände wie Krankheiten oder Medikationen zu beachten gilt. Aus diesen Ergebnissen könnten dann einerseits Empfehlungen für das Vorgehen der entsprechenden medikamentösen Therapie abgeleitet sowie andererseits eine mögliche Anwendung in der Malariatherapie überlegt und bewertet werden [108].

5 Zusammenfassung

Ausgereifte, humane rote Blutkörperchen vermögen trotz ihres Mangels an Zellorganellen einen programmierten, suizidalen Zelltod – ähnlich der Apoptose – zu durchlaufen. In Abgrenzung zur Apoptose, welche grundlegend auf dem Vorhandensein des Zellkerns und der Mitochondrien beruht, wird der suizidale, erythrozytäre Zelltod als Eryptose bezeichnet. Ausgelöst wird der suizidale Erythrozytentod unter anderem durch einen osmotischen Schock, oxidativen Stress oder eine Energiedepletion. Ebenso wird ein Auftreten der Eryptose auch in Folge multipler Erkrankungen beobachtet und durch eine Vielzahl an Xenobiotika entweder stimulierend oder aber inhibierend beeinflusst.

Die vorliegende Dissertation verfolgt das Bestreben, neue Regulatoren der Eryptose darzulegen und ermittelt daher die Wirkung von Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen sowie Taurolidin auf den suizidalen Zelltod der roten Blutkörperchen.

Die ausgeführten Untersuchungen erfolgten durchflusszytometrisch, indem die Phosphatidylserinexposition auf der Zelloberfläche anhand der Annexin V-vermittelten Fluoreszenz, das Zellvolumen anhand des Vorwärtsstreulichts, die intrazelluläre Kalziumkonzentration anhand der Fluo-3-vermittelten Fluoreszenz, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies anhand der DCFDA-vermittelten Fluoreszenz und das Ceramidvorkommen anhand spezifischer Antikörper ermittelt wurden.

Nach einer 48 stündigen Inkubation mit Costunolid in der Konzentration 15 µg/ml binden die Erythrozyten signifikant erhöht Annexin V, weisen ein signifikant verringertes Vorwärtsstreulicht auf, zeigen eine signifikant erhöhte Fluo-3-Fluoreszenz und DCFDA-vermittelte Fluoreszenz auf und zeichnen sich durch ein vermehrtes Ceramidvorkommen aus. Eine 48 stündige Inkubation mit Phenoxodiol in der Konzentration 100 µg/ml resultiert in einer signifikant erhöhte Annexin V-Bindung der roten Blutkörperchen, führt zu einer signifikanten Reduktion des Vorwärtsstreulichts, bewirkt eine signifikant verminderte Fluo-3-Fluoreszenz und zeigt ein vermehrtes Ceramidvorkommen, wohingegen sich die DCFDA-vermittelte Fluoreszenz nicht signifikant verändert. Nach einer 48 stündigen Inkubation mit Raloxifen in der Konzentration 60 µg/ml binden die roten Blutkörperchen

vermehrt Annexin V, zeigen ein signifikant vermindertes Vorwärtsstreulicht, weisen eine signifikant gesteigerte Fluo-3-Fluoreszenz sowie DCFDA-vermittelte Fluoreszenz auf und legen eine vermehrte Ceramidhäufigkeit dar. Eine 48 stündige Inkubation mit Taurolidin in der Konzentration 60 µg/ml führt zu einer gesteigerten Annexin V-Bindung der roten Blutkörperchen, bewirkt eine Abnahme des Vorwärtsstreulichts, erhöht die Fluo-3-Fluoreszenz und steigert die Ceramidhäufigkeit, verändert die DCFDA-vermittelte Fluoreszenz allerdings nicht signifikant.

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation geht hervor, dass alle der hierin getesteten Xenobiotika einen stimulierenden Einfluss auf die Eryptose der roten Blutkörperchen ausüben: Eine Inkubation der Erythrozyten mit Costunolid, Phenoxodiol, Raloxifen oder Taurolidin bewirkt sowohl den Verlust der Membranasymmetrie mit der Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, als auch die Zellschrumpfung. Mechanistisch liegt der Eryptose-fördernden Wirkung des Costunolids dabei zumindest in Teilen ein intrazellulärer Kalziumanstieg, eine Ausübung von oxidativem Stress sowie die Bildung von Ceramid zugrunde. Phenoxodiol stimuliert den suizidalen, erythrozytären Zelltod mindestens teilweise durch die Ansammlung von Ceramid. Die Auslösung der Eryptose durch Raloxifen ist zumindest zum Teil durch einen intrazellulären Kalziumanstieg sowie die Entstehung von oxidativem Stress und Ceramid bedingt. Taurolidin fördert den gesteuerten Erythrozytentod mindestens in Teilen durch eine Steigerung der intrazellulären Kalziumaktivität und durch eine Ceramidansammlung.

Literaturverzeichnis

1. Abed M, Artunc F, Alzoubi K, Honisch S, Baumann D, Föller M, Lang F (2014) Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med* 92(8): 871–879
2. Aguero MF, Facchinetti MM, Sheleg Z, Senderowicz AM (2005) Phenoxodiol, a novel isoflavone, induces G1 arrest by specific loss in cyclin-dependent kinase 2 activity by p53-independent induction of p21WAF1/CIP1. *Cancer Res* 65(8): 3364–3373
3. Aguero MF, Venero M, Brown DM, Smulson ME, Espinoza LA (2010) Phenoxodiol inhibits growth of metastatic prostate cancer cells. *Prostate* 70(11): 1211–1221
4. Ahmed MSE, Abed M, Voelkl J, Lang F (2013) Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol* 14: 244
5. Ahmed MSE, Langer H, Abed M, Voelkl J, Lang F (2013) The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press Res* 37(2-3): 158–167
6. Al Mamun Bhuyan A, Bissinger R, Cao H, Lang F (2016) Triggering of suicidal erythrocyte death by bexarotene. *Cell Physiol Biochem* 40(5): 1239–1251
7. Alfrey CP, Rice L, Udden MM, Driscoll TB (1997) Neocytolysis: physiological down-regulator of red-cell mass. *Lancet* 349(9062): 1389–1390
8. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2): 171
9. Alvero AB, Brown D, Montagna M, Matthews M, Mor G (2007) Phenoxodiol-topotecan co-administration exhibit significant anti-tumor activity without major adverse side effects. *Cancer Biol Ther* 6(4): 612–617
10. Alvero AB, Kelly M, Rossi P, Leiser A, Brown D, Rutherford T, Mor G (2008) Anti-tumor activity of phenoxodiol: from bench to clinic. *Future Oncol* 4(4): 475–482
11. Alvero AB, O'Malley D, Brown D, Kelly G, Garg M, Chen W, Rutherford T, Mor G (2006) Molecular mechanism of phenoxodiol-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer* 106(3): 599–608
12. Amer J, Goldfarb A, Fibach E (2003) Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *Eur J Haematol* 70(2): 84–90
13. Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou S-C, Papassideri IS (2011) Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics* 74(11): 2441–2452
14. Arese P, Turrini F, Schwarzer E (2005) Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 16(4-6): 133–146
15. Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381): 1305–1308
16. Atamna H, Ginsburg H (1993) Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 61(2): 231–242
17. Atkinson MA, Furth SL (2011) Anemia in children with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 7(11): 635–641
18. Attanasio P, Bissinger R, Haverkamp W, Pieske B, Wutzler A, Lang F (2015) Enhanced suicidal erythrocyte death in acute cardiac failure. *Eur J Clin Invest* 45(12): 1316–1324
19. Attri S, Sharma N, Jahagirdar S, Thapa BR, Prasad R (2006) Erythrocyte metabolism and antioxidant status of patients with Wilson disease with hemolytic anemia. *Pediatr Res* 59(4 Pt 1): 593–597
20. Bahadir I, Oncel M, Kement M, Sahip Y (2007) Intra-abdominal use of taurolidine or heparin as alternative products to an antiadhesive barrier (Septrafilm) in adhesion prevention: an experimental study on mice. *Dis Colon Rectum* 50(12): 2209–2214
21. Bandeira SM, Guedes GS, da Fonseca, L. J. S., Pires AS, Gelain DP, Moreira JCF, Rabelo LA, Vasconcelos SML, Goulart MOF (2012) Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 819310
22. Barrero AF, Oltra JE, Alvarez M, Raslan DS, Saúde DA, Akssira M (2000) New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia* 71(1): 60–64

23. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK (2006) Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 355(2): 125–137
24. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130(4): 1910–1917
25. Bassé F, Stout JG, Sims PJ, Wiedmer T (1996) Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. *J Biol Chem* 271(29): 17205–17210
26. Basu S, Banerjee D, Chandra S, Chakrabarti A (2008) Loss of phospholipid membrane asymmetry and sialylated glycoconjugates from erythrocyte surface in haemoglobin E beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 141(1): 92–99
27. Basu S, Banerjee D, Ghosh M, Chakrabarti A (2010) Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology* 15(4): 236–239
28. BD Biosciences (2002) Introduction to flow cytometry: a learning guide: 11-11032-03 rev. A. Courtesy and © Becton, Dickinson and Company
29. Becker K, Gui M, Traxler A, Kristen C, Schirmer RH (1994) Redox processes in malaria and other parasitic diseases. Determination of intracellular glutathione. *Histochemistry* 102(5): 389–395
30. Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA (1991) Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 3(6): 568–575
31. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2001) Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 8(12): 1197–1206
32. Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E (1986) Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 6(7): 2571–2575
33. Bevers TB (2006) Raloxifene and the prevention of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 7(16): 2301–2307
34. Bhavsar SK, Bobbala D, Xuan NT, Föllner M, Lang F (2010) Stimulation of suicidal erythrocyte death by α -lipoic acid. *Cell Physiol Biochem* 26(6): 859–868
35. Bissinger R, Bouguerra G, Stockinger K, Abbès S, Lang F (2015) Triggering of suicidal erythrocyte death by topotecan. *Cell Physiol Biochem* 37(4): 1607–1618
36. Bissinger R, Schumacher C, Qadri SM, Honisch S, Abaid M, Götz F, Kopp H-G, Lang F (2016) Enhanced eryptosis contributes to anemia in lung cancer patients. *Oncotarget* 7(12): 14002–14014
37. Bitbol M, Fellman P, Zachowski A, Devaux PF (1987) Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 904(2): 268–282
38. Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Kauffmann RF, Knadler MP, Christiansen C (2000) Raloxifene reduces atherosclerosis: studies of optimized raloxifene doses in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Clin Endocrinol* 52(2): 225–233
39. (1912) Blut und Blutkrankheiten. In: Bach-Marburg L, Mohr L, Staehelin R (eds) *Harnwege und Sexualstörungen - Blut - Bewegungsorgane - Drüsen mit Innerer Sekretion, Stoffwechsel- und Konstitutionskrankheiten - Erkrankungen aus Äusseren Physikalischen Ursachen*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 92–347
40. Boas FE, Forman L, Beutler E (1998) Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6): 3077–3081
41. Bobrich E, Braumann C, Opitz I, Menenakos C, Kristiansen G, Jacobi CA (2007) Influence of intraperitoneal application of taurolidine/heparin on expression of adhesion molecules and colon cancer in rats undergoing laparoscopy. *J Surg Res* 137(1): 75–82
42. Bonomini M, Sirolli V, Settefrati N, Dottori S, Di Liberato L, Arduini A (1999) Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 10(9): 1982–1990
43. Borner C, Monney L (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6(6): 497–507

44. Borst O, Abed M, Alesutan I, Towhid ST, Qadri SM, Föller M, Gawaz M, Lang F (2012) Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(4): C644-51
45. Bosman GJCGM, Willekens FLA, Werre JM (2005) Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 16(1-3): 1–8
46. Boss SM, Huster WJ, Neild JA, Glant MD, Eisenhut CC, Draper MW (1997) Effects of raloxifene hydrochloride on the endometrium of postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 177(6): 1458–1464
47. Bossi D, Giardinat B (1996) Red cell physiology. *Mol Aspects Med* 17(2): 117-128
48. Brand V, Koka S, Lang C, Jendrossek V, Huber SM, Gulbins E, Lang F (2008) Influence of amitriptyline on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei*-infected mice. *Cell Physiol Biochem* 22(5-6): 405–412
49. Brand VB, Sandu CD, Durantou C, Tanneur V, Lang KS, Huber SM, Lang F (2003) Dependence of *Plasmodium falciparum* in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem* 13(6): 347–356
50. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier J-P, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart J-J, Montreuil J, Ameisen J (2001) Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8(12): 1143–1156
51. Bratosin D, Mazurier J, Tissier J-P, Estaquier J, Huart J-J, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80(2): 173–195
52. Braumann C, Tangermann J, Jacobi CA, Müller JM, Dubiel W (2008) Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini Rev in Med Chem* 8(5): 421–428
53. Braumann C, Winkler G, Rogalla P, Menenakos C, Jacobi CA (2006) Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case. *World J Surg Oncol* 4(34): 34
54. Braun M, Föller M, Gulbins E, Lang F (2009) Eryptosis triggered by bismuth. *Biometals* 22(3): 453–460
55. Browning JA, Ellory JC, Gibson JS (2006) Pathophysiology of red cell volume. *Contrib Nephrol* 152: 241–268
56. Brugnara C (1997) Erythrocyte membrane transport physiology. *Curr Opin Hematol* 4(2): 122–127
57. Brugnara C, Franceschi L de, Alper SL (1993) Inhibition of Ca²⁺-dependent K⁺ transport and Cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 92(1): 520–526
58. Bryant HU, Glasebrook AL, Yang NN, Sato M (1996) A pharmacological review of raloxifene. *J Bone Miner Metab* 14: 1–9
59. Butturini E, Di Paola R, Suzuki H, Paterniti I, Ahmad A, Mariotto S, Cuzzocrea S (2014) Costunolide and dehydrocostuslactone, two natural sesquiterpene lactones, ameliorate the inflammatory process associated to experimental pleurisy in mice. *Eur J Pharmacol* 730: 107–115
60. Cai H, He X, Yang C (2018) Costunolide promotes imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells via the Bcr/Abl-Stat5 pathway. *Phytother Res* 32(9): 1764–1769
61. Calabresi P, Goulette FA, Darnowski JW (2001) Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent. *Cancer Res* 61(18): 6816–6821
62. Calderón-Salinas JV, Muñoz-Reyes EG, Guerrero-Romero JF, Rodríguez-Morán M, Bracho-Riquelme RL, Carrera-Gracia MA, Quintanar-Escorza MA (2011) Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem* 357(1-2): 171–179
63. Callender ST, Powell EO, Witts LJ (1945) The life-span of the red cell in man. *J Pathol* 57: 129–139
64. Cateni F, Zilic J, Zacchigna M, Bonivento P, Frausin F, Scarcia V (2006) Synthesis and biological properties of new alpha-methylene-gamma-butyrolactones and alpha,beta-unsaturated delta-lactones. *Eur J Med Chem* 41(2): 192–200

65. Chaurio RA, Janko C, Muñoz LE, Frey B, Herrmann M, Gaipf US (2009) Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* 14(12): 4892–4914
66. Chen H-C, Chou C-K, Lee S-D, Wang J-C, Yeh S-F (1995) Active compounds from *Saussurea lappa* Clarke that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research* 27(1-2): 99–109
67. Chen Y, Cass SL, Kutty SK, Yee EMH, Chan DSH, Gardner CR, Vittorio O, Pasquier E, Black DS, Kumar N (2015) Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship studies of isoflavene based Mannich bases with potent anti-cancer activity. *Bioorg Med Chem Lett* 25(22): 5377–5383
68. Cheon Y-H, Song MJ, Kim J-Y, Kwak SC, Park JH, Lee CH, Kim JJ, Kim JY, Choi MK, Oh J, Kim Y-C, Yoon K-H, Kwak HB, Lee MS (2014) Costunolide inhibits osteoclast differentiation by suppressing c-Fos transcriptional activity. *Phytother Res* 28(4): 586–592
69. Choi YK, Cho S-G, Woo S-M, Yun YJ, Jo J, Kim W, Shin YC, Ko S-G (2013) *Saussurea lappa* Clarke-derived costunolide prevents TNF α -induced breast cancer cell migration and invasion by inhibiting NF- κ B activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 936257
70. Choueiri TK, Mekhail T, Hutson TE, Ganapathi R, Kelly GE, Bukowski RM (2006) Phase I trial of phenoxodiol delivered by continuous intravenous infusion in patients with solid cancer. *Ann Oncol* 17(5): 860–865
71. Choueiri TK, Wesolowski R, Mekhail T (2006) Phenoxodiol: isoflavone analog with antineoplastic activity. *Curr Oncol Rep* 8(2): 104–107
72. Chung S-M, Bae O-N, Lim K-M, Noh J-Y, Lee M-Y, Jung Y-S, Chung J-H (2007) Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(2): 414–421
73. Clark DA, Butler SA, Braren V, Hartmann RC, Jenkins DE (1981) The kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 57(1): 83–89
74. Clossé C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR (1999) Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br J Haematol* 107(2): 300–302
75. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326(Pt 1): 1–16
76. Comfurius P, Williamson P, Smeets EF, Schlegel RA, Bevers EM, Zwaal RFA (1996) Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. *Biochemistry* 35(24): 7631–7634
77. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9): 647–656
78. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Wacławski MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, Gladwin MT (2003) Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 9(12): 1498–1505
79. Da Costa ML, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ (2001) Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery. *J Surg Res* 101(2): 111–119
80. Daigeler A, Chromik AM, Geisler A, Bulut D, Hilgert C, Krieg A, Klein-Hitpass L, Lehnhardt M, Uhl W, Mittelkötter U (2008) Synergistic apoptotic effects of taurolidine and TRAIL on squamous carcinoma cells of the esophagus. *Int J Oncol* 32(6): 1205–1220
81. Daleke DL, Huestis WH (1985) Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 24(20): 5406–5416
82. Damonte G, Guida L, Sdraffa A, Benatti U, Melloni E, Forteleoni G, Meloni T, Carafoli E, Flora A de (1992) Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell Calcium* 13(10): 649–658
83. Darnowski JW, Goulette FA, Cousens LP, Chatterjee D, Calabresi P (2004) Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 54(3): 249–258
84. Daugas E, Candé C, Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 8(12): 1131–1133
85. Dekkers DWC, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA (2002) Comparison between Ca²⁺-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem J* 362(Pt 3): 741–747

86. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux A-C, Shah AS, Huster W. J., Draper M., Christiansen C. (1997) Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337(23): 1641–1647
87. 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(5): 382–388
88. Dinkla S, Wessels K, Verdurmen WPR, Tomelleri C, Cluitmans JCA, Fransen J, Fuchs B, Schiller J, Joosten I, Brock R, Bosman GJCGM (2012) Functional consequences of sphingomyelinase-induced changes in erythrocyte membrane structure. *Cell Death Dis* 3(10): e410
89. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1133(3): 275–285
90. Doshi N, Zahr, Alisar, S., Bhaskar S, Lahann J, Mitragotri S (2009) Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(51): 21495–21499
91. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1): 33–42
92. Dupire J, Socol M, Viallat A (2012) Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(51): 20808–20813
93. Durantou C, Huber SM, Lang F (2002) Oxidation induces a Cl(-)- dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 539(Pt 3): 847–855
94. Durantou C, Huber SM, Tanneur V, Lang KS, Brand V, Sandu CD, Lang F (2003) Electrophysiological properties of the Plasmodium falciparum-induced cation conductance of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 13(4): 189-198
95. Dzierzak E, Philipsen S (2013) Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(4): a011601
96. Elabbadi N, Ancelin ML, Vial HJ (1997) Phospholipid metabolism of serine in Plasmodium-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochem J* 324(Pt 2): 435–445
97. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495–516
98. Erpek H, Tuncyurek P, Soyder A, Boylu S (2006) Hyaluronic acid/carboxymethylcellulose membrane barrier versus taurolidine for the prevention of adhesions to polypropylene mesh. *Eur Surg Res* 38(4): 414–417
99. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbrocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Glüer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert, S. Ensrud, K. E., Avioli LV, Lips P, Cummings SR (1999) Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* 282(7): 637-645
100. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott, J., Y., Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101(4): 890–898
101. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405(6782): 85–90
102. Fadok VA, Chimini G (2001) The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* 13(6): 365–372
103. Fadok VA, Laszlo DJ, Noble PW, Weinstein L, Riches DWH, Henson PM (1993) Particle digestability is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol* 151(8): 4274–4285
104. Fadok VA, Voelker DR, Campbell P A, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148(7): 2207–2216
105. Fahrner R, Möller A, Press AT, Kortgen A, Kiehntopf M, Rauchfuss F, Settmacher U, Mosig AS (2017) Short-term treatment with taurolidine is associated with liver injury. *BMC Pharmacol Toxicol* 18(1): 61
106. Fazio A, Briglia M, Faggio C, Alzoubi K, Lang F (2015) Oxaliplatin induced suicidal death of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 37(6): 2393–2404

107. Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle LE (2011) Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 27(5): 557–564
108. Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Nürnberg B, Faggio C, Lang F (2019) Triggering of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, by phenoxodiol. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 392(10): 1311–1318
109. Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Zacharopoulou N, Lang F (2018) Stimulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, by costunolide. *Cell Physiol Biochem* 50(6): 2283–2295
110. Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Zacharopoulou N, Lang F (2018) Taurolidine sensitivity of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 51(2): 501–512
111. Floride E, Föller M, Ritter M, Lang F (2008) Caffeine inhibits suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 22(1-4): 253–260
112. Föller M, Bobbala D, Koka S, Huber SM, Gulbins E, Lang F (2009) Suicide for survival -- death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem* 24(3-4): 133–140
113. Föller M, Braun M, Qadri SM, Lang E, Mahmud H, Lang F (2010) Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. *Eur J Clin Invest* 40(6): 534–540
114. Föller M, Harris IS, Elia A, John R, Lang F, Kavanagh TJ, Mak TW (2013) Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo. *Cell Death Differ* 20(10): 1350–1358
115. Föller M, Huber SM, Lang F (2008) Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* 60(10): 661–668
116. Föller M, Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F, Huber SM (2008) TRPC6 contributes to the Ca²⁺ leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 21(1-3): 183–192
117. Föller M, Mahmud H, Gu S, Floride E, Kucherenko Y, Luik S, Laufer S, Lang F (2009) Participation of leukotriene C₄ in the regulation of suicidal erythrocyte death. *J Physiol Pharmacol* 60(3): 135–143
118. Föller M, Mahmud H, Qadri SM, Gu S, Braun M, Bobbala D, Hoher B, Lang F (2010) Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death. *FASEB J* 24(9): 3351–3359
119. Föller M, Shumilina E, Lam RS, Mohamed W, Kasinathan RS, Huber SM, Chakraborty T, Lang F (2007) Induction of suicidal erythrocyte death by listeriolysin from *Listeria monocytogenes*. *Cell Physiol Biochem* 20(6): 1051–1060
120. Föller M, Sopjani M, Mahmud H, Lang F (2008) Vanadate-induced suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press Res* 31(2): 87–93
121. Fotopoulou C, Vergote I, Mainwaring P, Bidzinski M, Vermorken JB, Ghamande SA, Harnett P, Del Prete SA, Green JA, Spaczynski M, Blagden S, Gore M, Ledermann J, Kaye S, Gabra H (2014) Weekly AUC2 carboplatin in acquired platinum-resistant ovarian cancer with or without oral phenoxodiol, a sensitizer of platinum cytotoxicity: the phase III OVATURE multicenter randomized study. *Ann Oncol* 25(1): 160–165
122. Franco RS, Palascak M, Thompson H, Rucknagel DL, Joiner CH (1996) Dehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium. *Blood* 88(11): 4359–4365
123. Gallagher PG, Chang SH, Rettig MP, Neely JE, Hillery CA, Smith BD, Low PS (2003) Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis. *Blood* 101(11): 4625–4627
124. Gárdos G (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30(3): 653–654
125. Gaspar BL, Sharma P, Das R (2015) Anemia in malignancies: pathogenetic and diagnostic considerations. *Hematology* 20(1): 18–25
126. Geiger C, Föller M, Herrlinger KR, Lang F (2008) Azathioprine-induced suicidal erythrocyte death. *Inflamm Bowel Dis* 14(8): 1027–1032
127. Ghashghaeinia M, Bobbala D, Wieder T, Koka S, Brück J, Fehrenbacher B, Röcken M, Schaller M, Lang F, Ghoreschi K (2010) Targeting glutathione by dimethylfumarate protects against experimental malaria by enhancing erythrocyte cell membrane scrambling. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(4): C791-804

128. Ghashghaeinia M, Cluitmans JCA, Akel A, Dreischer P, Toulany M, Köberle M, Skabytska Y, S. M, Biedermann T, Duszenko M, Lang F, Wieder T, Bosman GJCGM (2012) The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br J Haematol* 157(5): 606–614
129. Gilreath JA, Stenehjem DD, Rodgers GM (2014) Diagnosis and treatment of cancer-related anemia. *Am J Hematol* 89(2): 203–212
130. Ginsburg H, Atamna H (1994) The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. *Parasite* 1(1): 5–13
131. Givan AL (2004) Flow cytometry: an introduction. In: Hawley TS, Hawley RG (eds) *Flow cytometry protocols, Second Edition*. Humana Press, pp 1–30
132. Golstein P, Ojcius DM, Young JD (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121: 29–65
133. Gong L, Greenberg HE, Perhach JL, Waldman SA, Kraft WK (2007) The pharmacokinetics of taurolidine metabolites in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 47(6): 697–703
134. Goñi FM, Alonso A (2002) Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett* 531(1): 38–46
135. Görtz G (1997) Local antiseptic and anti-endotoxin measures in intraabdominal infections. *Langenbecks Arch Chir* 382(1): 37–41
136. Gougeon M-L (2003) Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 3(5): 392–404
137. Grassmé H, Riethmüller J, Gulbins E (2007) Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog Lipid Res* 46(3-4): 161–170
138. Green DR (2003) Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol Rev* 193: 5–9
139. Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684): 626–629
140. Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381): 1309–1312
141. Grimsley C, Ravichandran KS (2003) Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 13(12): 648–656
142. Grygorczyk R., J. F., Schwarz W (1983) Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* 4(5-6): 499–510
143. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassmé H, Lang F (2000) Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(4): F605–615
144. Ham A, Lee S-J, Shin J, Kim K-H, Mar W (2012) Regulatory effects of costunolide on dopamine metabolism-associated genes inhibit dopamine-induced apoptosis in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 507(2): 101–105
145. Hamasaki N, Yamamoto M (2000) Red blood cell function and blood storage. *Vox Sang* 79(4): 191–197
146. Hanada K, Mitamura T, Fukasawa M, Magistrado PA, Horii T, Nishijima M (2000) Neutral sphingomyelinase activity dependent on Mg²⁺ and anionic phospholipids in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 346(Pt3): 671–677
147. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57–70
148. Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2): 139–150
149. Harrison HE, Bunting H, Ordway NK, Albrink WS (1947) The pathogenesis of the renal injury produced in the dog by hemoglobin or methemoglobin. *J Exp Med* 86(4): 339–356
150. Hayashi M, Inomata M, Saito Y, Ito H, Kawashima S (1991) Activation of intracellular calcium-activated neutral proteinase in erythrocytes and its inhibition by exogenously added inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1094(3): 249–256
151. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11(19): R795–805
152. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 627–633
153. Hingorani R, Deng J, Elia J, McIntyre C, Mittar D (2011) Detection of apoptosis using the BD annexin V FITC assay on the BD FACSVerser™ system. *BD Biosci*
154. Hochner-Celnikier D (1999) Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85(1): 23–29
155. Hokschi B, Rufer B, Gazdhar A, Bilici M, Beshay M, Gugger M, Schmid RA (2009) Taurolidine in the prevention and therapy of lung metastases. *Eur J Cardiothorac Surg* 36(6): 1058–1063

156. Hu F, Feng S, Wu Y, Bi Y, Wang C, Li W (2011) Quantitative analysis of costunolide and dehydrocostuslactone in rat plasma by ultraperformance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Biomed Chrom* 25(5): 547–554
157. Hua P, Zhang G, Zhang Y, Sun M, Cui R, Li X, Li B, Zhang X (2016) Costunolide induces G1/S phase arrest and activates mitochondrial-mediated apoptotic pathways in SK-MES 1 human lung squamous carcinoma cells. *Oncol Lett* 11(4): 2780–2786
158. Huber SM, Gamper NL, Lang F (2001) Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 441(4): 551–558
159. Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2(4): 277–288
160. Jacobi CA, Menenakos C, Braumann C (2005) Taurolidine -- a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs* 16(9): 917–921
161. Jacobi CA, Peter FJ, Wenger FA, Ordemann J, Müller JM (1999) New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat. *Dig Surg* 16(5): 393–399
162. Jacobi CA, Sabat R, Ordemann J, Wenger F, Volk HD, Müller JM (1997) Peritoneale Instillation von Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von intraperitonealem Tumorwachstum und Trokarmetastasen bei laparoskopischen Operationen im Rattenmodell. *Langenbecks Arch Chir* 382(4 Suppl 1): S31–S36
163. Jacobi J, Lang E, Bissinger R, Frauenfeld L, Modicano P, Faggio C, Abed M, Lang F (2014) Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mitotane. *Cell Physiol Biochem* 33(5): 1516–1526
164. Jäger U, Chomienne C, Cools J, Smand C (2016) Blood disorders stepping into the limelight. *Haematologica* 101(2): 101–103
165. Jelkmann W (2011) Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 589(Pt 6): 1251–1258
166. Jelkmann W (2012) Functional significance of erythrocytes. In: Lang F, Foller M (eds) *Erythrocytes: physiology and pathophysiology*. Imperial College Press, London, pp 1–56
167. Jenkins RW, Canals D, Hannun YA (2009) Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* 21(6): 836–846
168. Jensen BS, Hertz M, Christophersen P, Madsen LS (2002) The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a possible target for immune suppression. *Expert Opin Ther Targets* 6(6): 623–636
169. Jiang X, Wang X (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 275(40): 31199–31203
170. Jilani K, Lang F (2013) Carmustine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane. *Toxins (Basel)* 5(4): 703–716
171. Joiner CH (1993) Cation transport and volume regulation in sickle red blood cells. *Am J Physiol* 264(2 Pt 1): C251–270
172. Jolobe OMP (2000) Prevalence of hypochromia (without microcytosis) vs microcytosis (without hypochromia) in iron deficiency. *Clin Lab Haematol* 22(2): 79–80
173. Joza N, Susin, S. A., Daugas, E., Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Plücker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410(6828): 549–554
174. Jurewitsch B, Lee T, Park J, Jeejeebhoy K (1998) Taurolidine 2% as an antimicrobial lock solution for prevention of recurrent catheter-related bloodstream infections. *JPEN J Parentere Enteral Nutr* 22(4): 242–244
175. Kaestner L, Bernhardt I (2002) Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry* 55(1-2): 71–74
176. Kaestner L, Christophersen P, Bernhardt I, Bennekou P (2000) The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation. *Bioelectrochemistry* 52(2): 117–125
177. Kaestner L, Tabellion W, Lipp P, Bernhardt I (2004) Prostaglandin E2 activates channel-mediated calcium entry in human erythrocytes: an indication for a blood clot formation supporting process. *Thromb Haemost* 92(6): 1269–1272
178. Kaji DM (1990) Nifedipine inhibits calcium-activated K transport in human erythrocytes. *Am J Physiol* 259(2 Pt 1): C332–339

179. Kamsteeg M, Rutherford T, Sapi E, Hanczaruk B, Shahabi S, Flick M, Brown D, Mor G (2003) Phenoxodiol--an isoflavone analog--induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 22(17): 2611–2620
180. Kanade R, Boche M, Pokharkar V (2018) Self-assembling raloxifene loaded mixed micelles: formulation optimization, in vitro cytotoxicity and in vivo pharmacokinetics. *AAPS PharmSciTech* 19(3): 1105–1115
181. Kataoka S, Tsuruo T (1996) Physician Education: Apoptosis. *Oncologist* 1(6): 399–401
182. Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256(1): 42–49
183. Kellen JA (2001) Raloxifene. *Curr Drug Targets* 2(4): 423–425
184. Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, Friedrich B, Dreischer P, Wolz C, Schumacher U, Peschel A, Götz F, Döring G, Wieder T, Gulbins E, Lang F (2007) Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med* 85(3): 273–281
185. Kempe DS, Lang PA, Durantion C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T, Lang F (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J* 20(2): 368–370
186. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): 2013–2026
187. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239–257
188. Kichko TI, Pfirrmann RW, Reeh PW (2016) Taurolidine and congeners activate hTRPA1 but not hTRPV1 channels and stimulate CGRP release from mouse tracheal sensory nerves. *Pharmacol Res Perspect* 4(1): e00204
189. Kiefer CR, Snyder LM (2000) Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 7(2): 113–116
190. Kim DY, Choi BY (2019) Costunolide—a bioactive sesquiterpene lactone with diverse therapeutic potential. *Int J Mol Sci* 20(12): 2926
191. Kim SH, Kang SN, Kim HJ, Kim T. S. (2002) Potentiation of 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells into monocytes by costunolide, a germacranolide sesquiterpene lactone. *Biochem Pharmacol* 64(8): 1233–1242
192. Kirk K (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* 81(2): 495–537
193. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Gremer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22): 5579–5588
194. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F (2006) Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Cell Physiol* 290(1): C244-253
195. Kluger HM, McCarthy MM, Alvero AB, Sznol M, Ariyan S, Camp RL, Rimm DL, Mor G (2007) The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by phenoxodiol is associated with carboplatin sensitization. *J Transl Med* 5(6)
196. Koka S, Lang C, Boini KM, Bobbala D, Huber SM, Lang F (2008) Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cell Physiol Biochem* 22(1-4): 261–268
197. Koka S, Lang C, Niemoeller OM, Boini KM, Nicolay JP, Huber SM, Lang F (2008) Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cell Physiol Biochem* 21(5-6): 481–488
198. Koury MJ, Bondurant MC (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248(4953): 378–381
199. Kretschmer N, Rinner B, Stüendl N, Kaltenecker H, Wolf E, Kunert O, Boechzelt H, Leithner A, Bauer R, Lohberger B (2012) Effect of costunolide and dehydrocostus lactone on cell cycle, apoptosis, and ABC transporter expression in human soft tissue sarcoma cells. *Planta Med* 78(16): 1749–1756
200. Kristoff J (2007) Malaria stage-specific vaccine candidates. *Curr Pharm Des* 13(19): 1989
201. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy B,

- Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1): 3–11
202. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière J-L, Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9(13): 1277–1287
 203. Kucherenko YV, Geiger C, Shumilina E, Föller M, Lang F (2008) Inhibition of cation channels and suicidal death of human erythrocytes by zidovudine. *Toxicology* 253(1-3): 62–69
 204. Kucherenko YV, Lang F (2012) Inhibitory effect of furosemide on non-selective voltage-independent cation channels in human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 30(4): 863–875
 205. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, Lubin BH (1996) Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 87(3): 1179–1187
 206. Kwack C, Balakrishnan VS (2006) Managing erythropoietin hporesponsiveness. *Semin Dial* 19(2): 146–151
 207. Lachant NA, Zerez CR (1988) Inhibitory effect of mannose on erythrocyte defense against oxidants. *Biochim Biophys Acta* 964(1): 96–104
 208. Lang E, Bissinger R, Gulbins E, Lang F (2015) Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Apoptosis* 20(5): 758–767
 209. Lang E, Bissinger R, Qadri SM, Lang F (2017) Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: A potential target in the treatment of tumor-associated anemia. *Int J Cancer* 141(8): 1522–1528
 210. Lang E, Gatidis S, Freise NF, Bock H, Kubitz R, Lauermann C, Orth HM, Klindt C, Schuier M, Keitel V, Reich M, Liu G, Schmidt S, Xu HC, Qadri SM, Herebian D, Pandyra AA, Mayatepek E, Gulbins E, Lang F, Häussinger D, Lang KS, Föller M, Lang PA (2015) Conjugated bilirubin triggers anemia by inducing erythrocyte death. *Hepatology* 61(1): 275–284
 211. Lang E, Lang F (2015) Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol* 39: 35–42
 212. Lang E, Lang F (2015) Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int* 2015: 513518
 213. Lang E, Pozdeev VI, Gatidis S, Qadri SM, Häussinger D, Kubitz R, Herebian D, Mayatepek E, Lang F, Lang KS, Lang PA (2016) Bile acid-induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 38(4): 1500–1509
 214. Lang E, Qadri SM, Lang F (2012) Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 44(8): 1236–1243
 215. Lang E, Qadri SM, Zelenak C, Gu S, Rotte A, Draeger A, Lang F (2011) Inhibition of suicidal erythrocyte death by blebbistatin. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(2): C490-498
 216. Lang F, Bissinger R, Abed M, Artunc F (2017) Eryptosis - the Neglected Cause of Anemia in End Stage Renal Disease. *Kidney Blood Press Res* 42(4): 749–760
 217. Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78(1): 247-306
 218. Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Föller M (2010) Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 26(1): 21–28
 219. Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Föller M (2008) Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 22(5-6): 373–380
 220. Lang F, Jilani K, Lang E (2015) Therapeutic potential of manipulating suicidal erythrocyte death. *Expert Opin Ther Targets* 19(9): 1219–1227
 221. Lang F, Lang E, Föller M (2012) Physiology and pathophysiology of eryptosis. *Transfus Med Hemother* 39(5): 308–314
 222. Lang F, Lang PA, Lang KS, Brand V, Tanneur V, Duranton C, Wieder T, Huber SM (2004) Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria. *Pflugers Arch* 448(3): 319–324
 223. Lang F, Qadri SM (2012) Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif* 33(1-3): 125–130
 224. Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM (2003) Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 10(2): 249–256
 225. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15(5): 195–202

226. Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F, Wieder T (2004) Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 11(2): 231–243
227. Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F, Durantion C (2004) Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(6): F1046-1053
228. Lang KS, Myssina S, Tanneur V, Wieder T, Huber SM, Lang F, Durantion C (2003) Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 367(4): 391–396
229. Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter H-G, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber M, Wieder T (2002) Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 12(5-6): 366–372
230. Lang PA, Beringer O, Nicolay JP, Amon O, Kempe DS, Hermle T, Attanasio P, Akel A, Schäfer R, Friedrich B, Risler T, Baur M, Olbricht CJ, Zimmerhackl LB, Zipfel PF, Wieder T, Lang F (2006) Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med* 84(5): 378–388
231. Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, Niemoeller OM, Dreischer P, Eisele K, Klarl BA, Gulbins E, Lang F, Wieder T (2006) Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem* 18(1-3): 151–164
232. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM (2003) Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(6): C1553-15560
233. Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, Niemoeller OM, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F, Durantion C (2005) Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 372(3): 228–235
234. Lang PA, Kempe DS, Myssina S, Tanneur V, Birka C, Laufer S, Lang F, Wieder T, Huber SM (2005) PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 12(5): 415–428
235. Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klarl BA, Myssina S, Jendrossek V, Ishii S, Shimizu T, Waidmann M, Hessler G, Huber SM, Lang F, Wieder T (2005) Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 118(Pt 6): 1233–1243
236. Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rübber H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Häussinger D, Gulbins E, Lang F (2007) Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 13(2): 164–170
237. Lang PA, Warskulat U, Heller-Stilb B, Huang DY, Grenz A, Myssina S, Duszenko M, Lang F, Häussinger D, Vallon V, Wieder T (2003) Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice. *Cell Physiol Biochem* 13(6): 337–346
238. Lapolla A, Reitano R, Seraglia R, Sartore G, Ragazzi E, Traldi P (2005) Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 49(7): 685–690
239. Laufer S (2003) Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15(5): 623–627
240. Lee YS, Choi EM (2011) Costunolide stimulates the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int Immunopharmacol* 11(6): 712–718
241. Li LY, Luo X, Wan X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842): 95–99
242. Li Q, Wang Z, Xie Y, Hu H (2020) Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family. *Biomed Pharmacother* 125: 109955
243. Lin X, Peng Z, Su C (2015) Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostus lactone. *Int J Mol Sci* 16(5): 10888–10906
244. Linder MM, Ott W, Wesch G (1980) Die antibakterielle Behandlung der eitrigen Peritonitis: Prospektiver randomisierter Vergleich von Antibiotica mit dem neuen Chemotherapeuticum und Antiendotoxin Taurolin. In: Linder F, Röher H-D, Mittmann U et al. (eds) *Chirurgisches Forum'80. Für experimentelle und klinische Forschung*, 97. Kongreß der Deutschen

- Gesellschaft für Chirurgie, München, 14. Bis 17. Mai 1980. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 67–71
245. Lippuner K, Buchard PA, Geyter C de, Imthurn B, Lamy O, Litschgi M, Luzuy F, Schiessl K, Stute P, Birkhäuser M (2012) Recommendations for raloxifene use in daily clinical practice in the Swiss setting. *Eur Spine J* 21(12): 2407–2417
 246. Liu C-Y, Chang H-S, Chen I-S, Chen C-J, Hsu M-L, Fu S-L, Chen Y-J (2011) Costunolide causes mitotic arrest and enhances radiosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Radiat Oncol* 6: 56
 247. Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23(16): 2766–2773
 248. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L (2016) Iron deficiency anaemia. *Lancet* 387(10021): 907–916
 249. Loudianos G, Gitlin JD (2000) Wilson's disease. *Semin Liver Dis* 20(3): 353–364
 250. Lowe SW, Lin AW (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3): 485–495
 251. Luengo-Fernandez R, Burns R, Leal J (2016) Economic burden of non-malignant blood disorders across Europe: a population-based cost study. *Lancet Haematol* 3(8): e371–e378
 252. Lufkin EG, Withtaker MD, Nickelsen T, Argueta R, Calpan RH, Knickerbrocker RK, Riggs BL (1998) Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res* 13(11): 1747–1754
 253. Luna-Herrera J, Costa MC, González HG, Rodrigues AI, Castilho PC (2007) Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. *J Antimicrob Chemother* 59(3): 548–552
 254. Lupescu A, Shaik N, Jilani K, Zelenak C, Lang E, Pasham V, Zbidah M, Plate A, Bitzer M, Föller M, Qadri SM, Lang F (2012) Enhanced erythrocyte membrane exposure of phosphatidylserine following sorafenib treatment: an in vivo and in vitro study. *Cell Physiol Biochem* 30(4): 876–888
 255. Lutz HU (2004) Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol* 50(2): 107–116
 256. Maellaro E, Leoncini S, Moretti D, Del Bello B, Tanganelli I, Felice C de, Ciccoli L (2013) Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol* 50(4): 489–495
 257. Mager J, Glaser G, Razin A, Izak G, Bien S, Noam M (1965) Metabolic effects of pyrimidines derived from fava bean glycosides on human erythrocytes deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 20(2): 235–240
 258. Maher AD, Kuchel PW (2003) The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35(8): 1182–1197
 259. Mahmud H, Föller M, Lang F (2008) Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by methyl dopa. *Kidney Blood Press Res* 31(5): 299–306
 260. Mahmud H, Föller M, Lang F (2008) Suicidal erythrocyte death triggered by cisplatin. *Toxicology* 249(1): 40–44
 261. Mahmud H, Mauro D, Qadri SM, Föller M, Lang F (2009) Triggering of suicidal erythrocyte death by amphotericin B. *Cell Physiol Biochem* 24(3-4): 263–270
 262. Mahmud H, Ruifrok WPT, Westenbrink BD, Cannon MV, Vreeswijk-Baudoin I, van Gilst WH, Silljé HHW, Boer RA de (2013) Suicidal erythrocyte death, eryptosis, as a novel mechanism in heart failure-associated anaemia. *Cardiovasc Res.* 98(1): 37–46
 263. Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(1): 3–15
 264. Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, Basu J (2003) Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem* 278(52): 52551–52558
 265. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J (2005) Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 280(47): 39460–39467
 266. Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J (2002) Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 513(2-3): 184–188

267. Marcinkiewicz J, Kurnyta M, Biedroń R, Bobek M, Kontny E, Maśliński W (2006) Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 583: 481–492
268. Marengo-Rowe AJ (2006) Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc* 19(3): 239–245
269. Matarrese P, Straface E, Pietraforte D, Gambardella L, Vona R, Maccaglia A, Minetti M, Malorni W (2005) Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J* 19(3): 416–418
270. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP (2000) Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol* 7(9): 685–691
271. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, Benoist B de (2009) Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr* 12(4): 444–454
272. Melloni E, Michetti M, Salamino F, Minafra R, Pontremoli S (1996) Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 229(1): 193–197
273. Melloni E, Saratora R, Salamino F, Michetti M, Pontremoli S (1982) Cytosolic calcium dependent neutral proteinase of human erythrocytes: the role of calcium ions on the molecular and catalytic properties of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 107(3): 1053–1059
274. Messmer UK, Pfeilschifter J (2000) New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *BioEssays* 22(10): 878–881
275. Michetti M, Salamino F, Minafra R, Melloni E, Pontremoli S (1997) Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochem J* 325(Pt 3): 721–726
276. Migliaccio AR (2010) Erythroblast enucleation. *Haematologica* 95(12): 1985–1988
277. Mills JC, Stone NL, Pittman RN (1999) Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol* 146(4): 703–708
278. Minta A, Kao J. P. Y., Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264(14): 8171–8178
279. Möhler H, Pfirrmann RW, Frei K (2014) Redox-directed cancer therapeutics: taurolidine and piperlongumine as broadly effective antineoplastic agents (review). *Int J Oncol* 45(4): 1329–1336
280. Mor G, Fu H-H, Alvero AB (2006) Phenoxodiol, a novel approach for the treatment of ovarian cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs* 7(6)
281. Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW (2003) Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinet* 42(4): 361–372
282. Morishima S, Shibata M-A, Ohmichi M, Otsuki Y (2008) Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, induces mitochondria-mediated apoptosis in human endometrial carcinoma cells. *Med Mol Morphol* 41(3): 132–138
283. Morrot G, Zachowski A, Devaux PF (1990) Partial purification and characterization of the human erythrocyte Mg²⁺(+) -ATPase. A candidate aminophospholipid translokase. *FEBS Lett.* 266(1-2): 29–32
284. Muchmore DB (2000) Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects. *Oncologist* 5(5): 388–392
285. Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M, Murakami T (1980) Intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul* 19: 407–424
286. Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T, Lang F (2003) Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 14(11): 2750–2757
287. Nagasaka H, Inoue I, Inui A, Komatsu H, Sogo T, Murayama K, Murakami T, Yorifuji T, Asayama K, Katayama S, Uemoto S, Kobayashi K, Takayanagi M, Fujisawa T, Tsukahara H (2006) Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. *Pediatr Res* 60(4): 472–477
288. Neary PM, Hallihan P, Wang JH, Pfirrmann RW, Bouchier-Hayes DJ, Redmond HP (2010) The evolving role of taurolidine in cancer therapy. *Ann Surg Oncol* 17(4): 1135–1143
289. Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8): 299–306

290. Nici L, Monfils B, Calabresi P (2004) The effect of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 10(22): 7655–7661
291. Nicolay JP, Bentzen PJ, Ghashghaeinia M, Wieder T, Lang F (2007) Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by amiodarone. *Cell Physiol Biochem* 20(6): 1043–1050
292. Nicolay JP, Gatz S, Liebig G, Gulbins E, Lang F (2007) Amyloid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 19(1-4): 175–184
293. Nicolay JP, Liebig G, Niemoeller OM, Koka S, Ghashghaeinia M, Wieder T, Haendeler J, Busse R, Lang F (2008) Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch* 456(2): 293–305
294. Nicolay JP, Schneider J, Niemoeller OM, Artunc F, Portero-Otin M, Haik Jr. G, Thornalley PJ, Schleicher E, Wieder T, Lang F (2006) Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem* 18(4-5): 223–232
295. Niemoeller OM, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T, Sobiesiak M, Wieder T, Lang F (2006) Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 374(1): 41–49
296. Niemoeller OM, Bentzen PJ, Lang E, Lang F (2007) Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. *Pflugers Arch* 454(3): 427–439
297. Niemoeller OM, Mahmud H, Föller M, Wieder T, Lang F (2008) Ciglitazone and 15d-PGJ2 induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 22(1-4): 237–244
298. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23: 73–87
299. Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Kerr PG (2007) Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *Br J Biomed Sci* 64(1): 35–43
300. O'Brien GC, Cahill RA, Bouchier-Hayes DJ, Redmond HP (2006) Co-immunotherapy with interleukin-2 and taurolidine for progressive metastatic melanoma. *Ir J Med Sci* 175(1): 10–14
301. Oonishi T, Sakashita K, Ishioka N, Suematsu N, Shio H, Uyesaka N (1998) Production of prostaglandins E1 and E2 by adult human red blood cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 56(2-3): 89–101
302. Opferman JT, Korsmeyer SJ (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4(5): 410–415
303. Opitz I, Sigrist B, Hillinger S, Lardinois D, Stahel R, Weder W, Hopkins-Donaldson S (2007) Taurolidine and povidone-iodine induce different types of cell death in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 56(3): 327–336
304. Pandolfi A, Di Pietro N, Siroli V, Giardinelli A, Di Silvestre S, Amoroso L, Di Tomo P, Capani F, Consoli A, Bonomini M (2007) Mechanisms of uremic erythrocyte-induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 213(3): 699–709
305. Pant HC, Virmani M, Gallant PE (1983) Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 117(2): 372–377
306. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46(3): 143–151
307. Park E, Song JH, Kim MS, Park S-H, Kim TS (2016) Costunolide, a sesquiterpene lactone, inhibits the differentiation of pro-inflammatory CD4+ T cells through the modulation of mitogen-activated protein kinases. *Int Immunopharmacol* 40: 508–516
308. Park J-B, Lee C-K, Park HJ (1997) Anti-Helicobacter pylori effect of costunolide isolated from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *Arch Pharm Res* 20(3): 275–279
309. Pasquet J-M, Dachary-Prigent J, Nurden AT (1996) Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem* 239(3): 647–654
310. Peng Z, Wang Y, Gu X, Guo X, Yan C (2014) Study on the pharmacokinetics and metabolism of costunolide and dehydrocostus lactone in rats by HPLC-UV and UPLC-Q-TOF/MS. *Biomed Chromatogr* 28(10): 1325–1334
311. Pinzón-Díaz CE, Calderón-Salinas JV, Rosas-Flores MM, Hernández G, López-Betancourt A, Quintanar-Escorza MA (2018) Eryptosis and oxidative damage in hypertensive and dyslipidemic patients. *Mol Cell Biochem* 440(1-2): 105–113
312. Pittiruti M, Bertoglio S, Scoppettuolo G, Biffi R, Lamperti M, Dal Molin A, Panocchia N, Petrosillo N, Venditti M, Rigo C, DeLutio E (2016) Evidence-based criteria for the choice and

- the clinical use of the most appropriate lock solutions for central venous catheters (excluding dialysis catheters): a GAVeCeLT consensus. *J Vasc Access* 17(6): 453–464
313. Polak-Jonkisz D, Purzyc L (2012) Ca²⁺ influx versus efflux during eryptosis in uremic erythrocytes. *Blood Purif* 34(3-4): 209-10; author reply 210
 314. Pollock JS, Pollock DM (2008) Endothelin and NOS1/nitric oxide signaling and regulation of sodium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17(1): 70–75
 315. Qadri SM, Bissinger R, Solh Z, Oldenburg P-A (2017) Eryptosis in health and disease: a paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Rev* 31(6): 349–361
 316. Qadri SM, Föller M, Lang F (2009) Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol. *Life Sci* 85(1-2): 33–38
 317. Qadri SM, Mahmud H, Föller M, Lang F (2009) Inhibition of suicidal erythrocyte death by xanthohumol. *J Agric Food Chem* 57(16): 7591–7595
 318. Qian EW, Ge DT, Kong S-K (2012) Salidroside protects human erythrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *J Nat Prod* 75(4): 531–537
 319. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4(3): 138–144
 320. Rao SA, Kelkar GR, Bhattacharyya SC (1960) Terpenoids --XXI: the structure of costunolide, a new sesquiterpene lactone from *costus* root oil. *Tetrahedron* 9(3-4): 275–283
 321. Rasul A, Bao R, Malhi M, Zhao B, Tsuji I, Li J, Li X (2013) Induction of apoptosis by costunolide in bladder cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Molecules* 18(2): 1418–1433
 322. Rasul A, Parveen S, Ma T (2012) Costunolide: a novel anti-cancer sesquiterpene lactone. *Bangladesh J Pharmacol* 7(1): 6–13
 323. Rathmell JC, Thompson CB (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 17: 781–828
 324. Reed JC (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17(9): 2941–2953
 325. Ren Y, Savill J (1998) Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death Differ* 5(7): 563–568
 326. Renehan AG, Booth C, Potten CS (2001) What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322(7301): 15336-1538
 327. Repsold L, Joubert AM (2018) Eryptosis: an erythrocyte's suicidal type of cell death. *Biomed Res Int* 2018: 9405617
 328. Reutlingsperger CPM, van Heerde WL (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 53(6): 527–532
 329. Rice L, Alfrey CP (2005) The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cell Physiol Biochem* 15(6): 245–250
 330. Richardson LC, Parker CS, Tsai J (2014) Blood disorders and public health. *Am J Prev Med* 47(5): 656–657
 331. Rifkind RA (1966) Destruction of injured red cells in vivo. *Am J Med* 41(5): 711-723
 332. Rodak R, Kubota H, Ishihara H, Eugster H-P, Könü D, Möhler H, Yonekawa Y, Frei K (2005) Induction of reactive oxygen intermediates-dependent programmed cell death in human malignant ex vivo glioma cells and inhibition of the vascular endothelial growth factor production by taurolidine. *J Neurosurg* 102(6): 1055–1068
 333. Romero PJ, Romero EA (1999) The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: a proposal. *Blood Cells Mol Dis* 25(1): 9–19
 334. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Galdwin MT (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 293(13): 1653–1662
 335. Roy A, Manikkam R (2015) Cytotoxic impact of costunolide isolated from *costus speciosus* on breast cancer via differential regulation of cell cycle-an in-vitro and in-silico approach. *Phytother Res* 29(10): 1532–1539
 336. Saelens X, Festjens N, Walle LV, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16): 2861–2874
 337. Saraswati S, Alhaider AA, Abdelgadir AM (2018) Costunolide suppresses an inflammatory angiogenic response in a subcutaneous murine sponge model. *APMIS* 126(3): 257–266

338. Savill J, Fadok VA, Henson PM, Haslett C (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14(3): 131–136
339. Scarponi C, Butturini E, Sestito R, Madonna S, Cavani A, Mariotto S, Albanesi C (2014) Inhibition of inflammatory and proliferative responses of human keratinocytes exposed to the sesquiterpene lactones dehydrocostuslactone and costunolide. *PLoS ONE* 9(9): e107904
340. Schneider J, Nicolay JP, Föller M, Wieder T, Lang F (2007) Suicidal erythrocyte death following cellular K⁺ loss. *Cell Physiol Biochem* 20(1-4): 35–44
341. Schroit AJ, Zwaal RFA (1991) Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta* 1071(3): 313–329
342. Seeman E (2001) Raloxifene. *J Bone Miner Metab* 19(2): 65–75
343. Seigneuret M, Devaux PF (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(12): 3751–3755
344. Sendt W, Mansouri E, Schmitt-Graeff A, Wolff-Vorbeck G, Schöffel U (2002) Influence of antiseptic agents on interleukin-8 release and transmigration of polymorphonuclear neutrophils in a human in vitro model of peritonitis. *Surg Infect* 3(3): 235–244
345. Shah CB, Mittelman MW, Costerton JW, Parenteau S, Pelak M, Arsenault R, Mermel LA (2002) Antimicrobial activity of a novel catheter lock solution. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6): 1674–1679
346. Shaik N, Lupescu A, Lang F (2012) Sunitinib-sensitive suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 30(3): 512–522
347. Shaik N, Zbidah M, Lang F (2012) Inhibition of Ca²⁺ entry and suicidal erythrocyte death by naringin. *Cell Physiol Biochem* 30(3): 678–686
348. Sherertz RJ, Boger MS, Collins CA, Mason L, Raad II (2006) Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. *Antimicrob Agents Chemother* 50(5): 1865–1868
349. Silasi D-A, Alvero AB, Rutherford TJ, Brown D, Mor G (2009) Phenoxodiol: pharmacology and clinical experience in cancer monotherapy and in combination with chemotherapeutic drugs. *Expert Opin Pharmacother* 10(6): 1059–1067
350. Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276(10): 7320–7326
351. Smeets EF, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA (1994) Calcium-induced transbilayer scrambling of fluorescent phospholipid analogs in platelets and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1195(2): 281–286
352. Smith JB, Ingermann C, Kocsis JJ, Silver MJ (1973) Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *J Clin Invest* 52(4): 965–969
353. Snyder KR, Sparano N, Malinowski JM (2000) Raloxifene hydrochloride. *Am J Health Syst Pharm* 57(18): 1669–1675
354. Solá E, Vayá A, Martínez M, Moscardó A, Corella D, Santaolaria M-L, España F, Hernández-Mijares A (2009) Erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure in obesity. *Obesity* 17(2): 318–322
355. Souza PLd, Liauw W, Links M, Pirabhahar S, Kelly G, Howes LG (2006) Phase I and pharmacokinetic study of weekly NV06 (Phenoxodiol), a novel isoflav-3-ene, in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 58(4): 427–433
356. Sowemimo-Coker SO (2002) Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev* 16(1): 46–60
357. Stendel R, Picht T, Schilling A, Heidenreich J, Loddenkemper C, Jänisch W, Brock M (2004) Treatment of glioblastoma with intravenous taurolidine. First clinical experience. *Anticancer Res* 24(2C): 1143–1148
358. Stendel R, Scheurer L, Schlatterer K, Stadler U, Pfirrmann RW, Fiss I, Möhler H, Bigler L (2007) Pharmacokinetics of taurolidine following repeated intravenous infusions measured by HPLC-ESI-MS/MS of the derivatives taurultame and taurinamide in glioblastoma patients. *Clin Pharmacokinet* 46(6): 513–524
359. Stendel R, Scheurer L, Stoltenburg-Didinger G, Brock M, Möhler H (2003) Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine. *Anticancer Res* 23(3B): 2309–2314
360. Sun BS, Wang JH, Liu LL, Gong SL, Redmond HP (2007) Taurolidine induces apoptosis of murine melanoma cells in vitro and in vivo by modulation of the Bcl-2 family proteins. *J Surg Oncol* 96(3): 241–248

361. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T., Prévost M-C, Brothers G, Mak TW, Penninger JM, Earnshaw WC, Kroemer G (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192(4): 571–580
362. Svetina S (2012) Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. *Cell Mol Biol Lett* 17(2): 171–181
363. Tanneur V, Duranton C, Brand VB, Sandu CD, Akkaya C, Kasinathan RS, Gachet C, Sluyter R, Barden JA, Wiley JS, Lang F, Huber SM (2006) Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *FASEB J* 20(1): 133–135
364. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(3): R431-444
365. Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 1456–1462
366. Thornalley PJ (1988) Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J* 254(3): 751–755
367. Torres-Viera C, Thauvin-Eliopoulos C, Souli M, DeGirolami P, Farris MG, Wennerstwn CB, Sofia RD, Eliopoulos GM (2000) Activities of taurolidine in vitro and in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1720–1724
368. Vandenberghe PA, Ceuppens JL (1990) Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3, a new fluorescent calcium indicator. *J Immunol Methods* 127(2): 197–205
369. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 184(1): 39–51
370. Vial HJ, Thuét MJ, Philippot JR (1982) Phospholipid biosynthesis in synchronous *Plasmodium falciparum* cultures. *J Protozool* 29(2): 258–263
371. Voelkl J, Alzoubi K, Mamar AK, Ahmed MSE, Abed M, Lang F (2013) Stimulation of suicidal erythrocyte death by increased extracellular phosphate concentrations. *Kidney Blood Press Res* 38(1): 42–51
372. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Aktins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Wade JL, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N (2006) Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* 295(23): 2727-2741
373. Voll RE, Hermann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390(6658): 350–351
374. Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW (1998) Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *JAMA* 279(18): 1445–1451
375. Walters DK, Muff R, Langsam B, Gruber P, Born W, Fuchs B (2007) Taurolidine: a novel anti-neoplastic agent induces apoptosis of osteosarcoma cell lines. *Invest New Drugs* 25(4): 305–312
376. Wang Y, Zhang X, Zhao L, Shi M, Wei Z, Yang Z, Guo C, Fu Y (2017) Costunolide protects lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice by inhibiting NF-κB signaling pathway. *J Surg Res* 220: 40–45
377. Weil M, Jacobson MD, Raff MC (1998) Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci* 111(Pt 18): 2707–2715
378. Werre JM, Willekens FLA, Bosch FH, Haan LD de, van der Vegt, S. G. L., van den Bos, A. G., Bosman GJCGM (2004) The red cell revisited -- matters of life and death. *Cell Mol Biol* 50(2): 139–145
379. Williamson P, Kulick A, Zachowski A, Schlegel RA, Devaux PF (1992) Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31(27): 6355–6360

380. Wood BL, Gibson DF, Tait JF (1996) Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88(5): 1873–1880
381. Wood WG (1976) Haemoglobin synthesis during human fetal development. *Br Med Bull* 32(3): 282–287
382. Woon LA, Holland JW, Kable EPW, Roufogalis BD (1999) Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 25(4): 313–320
383. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83(1): 59–67
384. Yang Y-I, Kim J-H, Lee K-T, Choi J-H (2011) Costunolide induces apoptosis in platinum-resistant human ovarian cancer cells by generating reactive oxygen species. *Gyn Oncol* 123(3): 588–596
385. Yazdanbakhsh K, Lomas-Francis C, Reid ME (2000) Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane. *Transfus Med Rev* 14(4): 364–374
386. Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407(6805): 802–809
387. Zachowski A, Favre E, Cribier S, Hervé P, Devaux PF (1986) Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry* 25(9): 2585–2590
388. Zhang C, Lu T, Wang G-D, Ma C, Zhou Y-F (2016) Costunolide, an active sesquiterpene lactone, induced apoptosis via ROS-mediated ER stress and JNK pathway in human U2OS cells. *Biomed Pharmacother* 80: 253–259
389. Zheng H, Chen Y, Zhang J, Wang L, Jin Z, Huang H, Man S, Gao W (2016) Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation. *Cell Biol Interact* 250: 68–77
390. Ziegler U, Groscurth P (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19: 124–128
391. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM (1993) Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochem Soc Trans* 21(2): 248–253
392. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 62(9): 971–988

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Physiologie der Universität Tübingen, Abteilung Vegetative und Klinische Physiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz durchgeführt.

Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Zacharopoulou N, Lang F (2018) Stimulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, by costunolide. Cell Physiol Biochem 50(6): 2283–2295:

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Lang. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan. Das Manuskript der Publikation wurde durch Herrn Prof. Dr. Dr. Lang verfasst und durch Frau Nefeli Zacharopoulou mit Referenzen versehen.

Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Zacharopoulou N, Lang F (2018) Taurolidine sensitivity of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 51(2): 501–512

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Lang. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan. Das Manuskript der Publikation wurde durch Herrn Prof. Dr. Dr. Lang verfasst und durch Frau Nefeli Zacharopoulou mit Referenzen versehen.

Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Nürnberg B, Faggio C, Lang F (2019) Triggering of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, by phenoxodiol. Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol 392(10): 1311–1318:

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Lang, Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg und Frau Prof. Dr. Caterina Faggio. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan durch mich. Das Manuskript der Publikation wurde durch Herrn Prof. Dr. Dr. Lang verfasst.

Studie zur Testsubstanz Raloxifen:

Die Konzeption der Studien erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Lang. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Abdulla Al Mamun Bhuyan von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript der Dissertation selbstständig nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Lang verfasst und nach Anleitung durch Frau Dr. Tatsiana Castor korrigiert zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Veröffentlichungen

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

Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Zacharopoulou N, Lang F (2018) Stimulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, by costunolide. Cell Physiol Biochem 50(6): 2283–2295

The final, published version of this article is available at
<https://www.karger.com/?doi=10.1159/000495088>.

Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Zacharopoulou N, Lang F (2018) Taurolidine sensitivity of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 51(2): 501–512

The final, published version of this article is available at
<https://www.karger.com/?doi=10.1159/000495272>.

Fink M, Al Mamun Bhuyan A, Nürnberg B, Faggio C, Lang F (2019) Triggering of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, by phenoxodiol. Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol 392(10): 1311–1318

The final, published version of this article is available at
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-019-01681-8>.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Florian Lang, der mich für die Eryptose begeistert und mir die Möglichkeit gegeben hat, mich im Physiologischen Institut der Universität Tübingen mit diesem Thema wissenschaftlich zu beschäftigen. Er stand mir mit seinem beachtlichen Wissen und seiner großen Erfahrung stets mit Rat und Tat zur Seite.

Sehr verbunden bin ich ebenso Herrn Professor Meinrad Gawaz für seine Bereitschaft, mir einen Doktorandenplatz zu gewähren, meine Betreuung zu übernehmen und damit mein Doktorvater zu sein. Ohne ihn wäre die Dissertation nicht möglich gewesen.

Also, Mr. Abdulla Al Mamun Bhuyan's support was an essential component of my achievement. I am very grateful that he perfectly taught and accompanied me on my way through the challenges of setting up test series and doing analysis. He has been a great tutor.

Für die Durchsicht der schriftlichen Ausarbeitung und die hervorragenden Hinweise zu deren Fertigstellung danke ich Frau Dr. Tatsiana Castor.

Ebenfalls geht mein Dank an Frau Professorin Susanne Ullrich für die freundliche Durchführung des Zweitgutachtens.

Zusätzlich bedanke ich mich herzlich bei Frau Lejla Subasic und Frau Tanja Loch, die mich bei den organisatorischen Hürden unterstützt und mit größter Sorgfalt die Manuskripte der Publikationen bearbeitet haben.

Noch vor dem Anfang meiner Doktorarbeit stand Frau PD Dr. Evi Stegmann vom IMIT der Universität Tübingen. Durch Sie durfte ich Herrn Professor Lang persönlich kennenlernen und schließlich in seinem Labor wissenschaftlich tätig werden. Dafür danke ich ihr sehr.

Not forgetting Mr. Khalid Nady who supported me in lab and always had a sympathetic hearing for me. I really appreciate it.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Philipp Mangold bedanken, die stets an meiner Seite waren und mir jegliche Unterstützung zukommen ließen.