

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

**Programmierter Zelltod humaner Erythrozyten durch
Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine**

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

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

vorgelegt von

Egler, Jasmin Yvonne

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ullrich

Tag der Disputation: 23.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1. Erythrozyten.....	2
1.1.1. Eigenschaften	2
1.1.2. Aufgaben.....	3
1.1.3. Anämie	4
1.2. Apoptose.....	5
1.2.1. Bedeutung.....	5
1.2.2. Merkmale	6
1.2.3. Ablauf der Apoptose	7
1.2.4. Caspasen.....	7
1.2.5. Induktionsmechanismen.....	8
1.3. Eryptose.....	11
1.3.1. Merkmale	11
1.3.2. Mechanismen	11
1.3.3. Physiologische Bedeutung	14
1.3.4. Erkrankungen, bei denen Eryptose von Bedeutung ist	15
1.3.5. Stimulatoren und Inhibitoren	18
1.4. Neue Medikamente, die Eryptose verursachen könnten.....	19
1.4.1. Licochalcone A	19
1.4.2. Manumycin A.....	20
1.4.3. Perifosine.....	21
1.5. Fragestellung der Dissertation	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Erythrozyten.....	25
2.1.2. Durchflusszytometer.....	25
2.1.3. Software.....	25
2.1.4. Lösungen, Chemikalien, Antikörper und Farbstoffe.....	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. Vorbereitung der Erythrozyten	27

2.2.2. Versuchsansatz	27
2.2.3. Bestimmung der Phosphatidylserinexposition	27
2.2.4. Quantifizierung der Zellgröße	28
2.2.5. Messung der Hämolyse	28
2.2.6. Quantifizierung des intrazellulären Calciums	29
2.2.7. Bestimmung des oxidativen Stresses	30
2.2.8. Bestimmung des Ceramidgehalts	30
2.2.9. Bestimmung der Beteiligung von Kinasen	31
2.3. Statistik.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Licochalcone A.....	33
3.1.1. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche	33
3.1.2. Zellvolumen.....	34
3.1.3. Hämolyse	35
3.1.4. Calciumkonzentration	36
3.1.5. Oxidativer Stress	41
3.1.6. Ceramid	41
3.1.7. Zusammenfassung der Ergebnisse zu Licochalcone A.....	42
3.2. Manumycin A	43
3.2.1. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche	43
3.2.2. Zellvolumen.....	45
3.2.3. Hämolyse	47
3.2.4. Calciumkonzentration	48
3.2.5. Oxidativer Stress	49
3.2.6. Ceramid	50
3.2.7. Kinasen	50
3.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zu Manumycin A	51
3.3. Perifosine	53
3.3.1. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche	53
3.3.2. Zellvolumen.....	54
3.3.3. Hämolyse	55
3.3.4. Calciumkonzentration	56
3.3.5. Oxidativer Stress	59
3.3.6. Ceramid	59
3.3.7. Kinasen	60

3.3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zu Perifosine	62
4. Diskussion.....	63
4.1. Methodendiskussion	63
4.2. Ergebnisdiskussion.....	65
4.2.1. Licochalcone A	65
4.2.2. Manumycin A	67
4.2.3. Perifosine	70
4.3. Klinische Relevanz	72
4.4. Schlussfolgerungen aus der Arbeit	73
5. Zusammenfassung	74
6. Literaturverzeichnis.....	76
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	88
8. Veröffentlichungen.....	89
9. Dank.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Effekt von Licochalcone A auf die Annexin-V-Bindung [209].....	33
Abbildung 2: Einfluss von Licochalcone A auf das Vorwärtsstreulicht [209].....	35
Abbildung 3: Einfluss von Licochalcone A auf die Hämolyse	36
Abbildung 4: Einfluss von Licochalcone A auf die Fluo3-Fluoreszenz [209].....	37
Abbildung 5: Calciuminsensitivität der Annexin-V-Bindung durch Licochalcone A [209].....	38
Abbildung 6: Einfluss der Entfernung von extrazellulärem Calcium auf die durch Licochalcone A hervorgerufenen Änderungen des Zellvolumens [209].....	39
Abbildung 7: Einfluss der Entfernung von extrazellulärem Calcium auf die von Licochalcone A hervorgerufene Hämolyse [209]	40
Abbildung 8: Einfluss von Licochalcone A auf oxidativen Stress	41
Abbildung 9: Einfluss von Licochalcone A auf den Ceramidgehalt der Zelloberfläche [209].....	42
Abbildung 10: Eigenfluoreszenz von Manumycin A ohne Einfluss auf die Messung der Annexin-V-Bindung	43
Abbildung 11: Effekt von Manumycin A auf die Annexin-V-Bindung [208].....	44
Abbildung 12: Einfluss von Manumycin A auf das Vorwärtsstreulicht [208].....	46
Abbildung 13: Hämolyse durch Manumycin A [208].....	47
Abbildung 14: Calciumsensitivität der Annexin-V-Bindung durch Manumycin A [208]	49
Abbildung 15: Einfluss von Staurosporine und SB 203580 auf die durch Manumycin A verursachte Annexin-V-Bindung [208]	51
Abbildung 16: Einfluss von Perifosine auf die Annexin-V-Bindung [207].....	53
Abbildung 17: Einfluss von Perifosine auf das Vorwärtsstreulicht [207].....	55
Abbildung 18: Hämolyse durch Perifosine [207].....	56
Abbildung 19: Einfluss von Perifosine auf die Fluo3-Fluoreszenz [207].....	57
Abbildung 20: Calciumsensitivität der Annexin-V-Bindung durch Perifosine [207]....	58
Abbildung 21: Einfluss von Perifosine auf oxidativen Stress [207]	59
Abbildung 22: Einfluss von Perifosine auf Ceramid an der Zelloberfläche [207]	60
Abbildung 23: Einfluss von SB 203580 und Staurosporine auf die durch Perifosine versursachte Annexin-V-Bindung [207]	61

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma extra large
BD	Becton Dickinson
BH3	Bcl-2-homology-domain-3
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD95	Cluster of differentiation 95
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CK1 α	Caseinkinase 1 α
Cl ⁻	Chlorid
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CXCL16/SR-PSOX	CXC-Motiv-Chemokin-16/scavenger receptor für Phosphatidylserin und oxidiertes LDL
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCFDA	2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycon-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fe ²⁺	Eisenion
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H ⁺	Wasserstoffproton
HbA1c	Glykohämoglobin
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethanesulfonic acid
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IKK	IκB-Kinase
JAK3	Janus-aktivierte Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-Methylester
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEK-162	Binimetinib
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mTOR	mammalian target of Rapamycin
n	Anzahl getesteter Erythrozytenproben
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid

NADH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonooxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAK2	p21-aktivierte Kinase 2
PBS	Phosphatpuffersalzlösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
ROS	Reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SB	SB203580
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
StSp	Staurosporine
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
t-Bid	Truncated BH3 interacting-domain death agonist
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TSP	Thrombospondin-1
UV	Ultraviolettstrahlung

1. Einleitung

Ohne Blut gibt es kein Leben, es wird seit Jahrtausenden als Lebenselixier angesehen. Lebenswichtige Aufgaben wie der Transport von Sauerstoff aus der Lunge in den gesamten Körper durch die Erythrozyten, Blutstillung durch Thrombozyten und Immunabwehr durch Leukozyten sind ohne Blut nicht denkbar. Es besteht zu ca. 45 % aus Erythrozyten, die 99 % der Zellmasse ausmachen. Neben ihrer schieren Menge haben sie eine weitere wichtige Besonderheit: Sie verlieren während der Reifung alle Zellorganellen und ihren Zellkern [1].

Bereits seit Jahrzehnten ist bekannt, dass Zellen auf verschiedene Arten sterben können, und zwar zum einen durch die unkontrollierte Nekrose, welche eine Entzündungsreaktion nach sich zieht, zum anderen durch den programmierten Zelltod, die Apoptose. Deren Kennzeichen ist ein kontrollierter Abbau der sterbenden Zelle bei intakter Membran ohne Entzündungsreaktion [2]. Verschiedene Mechanismen der Apoptoseentstehung wurden entdeckt und man dachte lange Zeit, hierfür seien Zellorganellen wie Mitochondrien oder der Zellkern unabdingbar. Daher seien Erythrozyten hierzu nicht in der Lage und könnten nur durch die Mauserung in der Milz abgebaut werden [3].

Im Jahre 2001 wurde jedoch von Bratosin et. al. gezeigt, dass Erythrozyten trotz ihres Mangels an Mitochondrien zu einem kontrollierten Zelltod fähig sind [3]. Im Jahre 2005 führten Lang et. al. den Begriff „Eryptose“ ein, um den Besonderheiten des programmierten Zelltodes von Erythrozyten gerecht zu werden [4]. Seither wurde viel über die Mechanismen, über die Eryptose abläuft, geforscht und viele Inhibitoren und Stimulatoren entdeckt, wovon einige auch Apoptose stimulieren.

Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine sind potentielle Medikamente, welche unter anderem bei verschiedenen Tumorarten Apoptose verursachen [5-7]. Perifosine wurde bereits in klinischen Phase-II-Studien getestet, in welchen Anämien als Nebenwirkung auftraten [8].

In dieser Studie wurde deshalb überprüft, ob die vorliegenden potentiellen Medikamente Eryptose verursachen und wenn ja, in welchen Konzentrationen und über welche Mechanismen.

1.1. Erythrozyten

1.1.1. Eigenschaften

Erythrozyten sind kernlose und zellorganellfreie bikonkave Scheiben. Diese Form dient der Oberflächenvergrößerung und der guten Verformbarkeit bei der Passage von engen Kapillaren. Alte Erythrozyten, Elliptozyten, Sphärozyten und Sichelzellen haben eine geringere Verformbarkeit, weswegen die Gefahr besteht, dass sie in engen Kapillaren stecken bleiben. Sie werden daher in der Leber und vor allem in der Milz abgebaut [1, S. 483-485].

Da Erythrozyten keine Zellorganellen besitzen, fehlen ihnen auch Mitochondrien für die Energiegewinnung durch aerobe Glykolyse. Daher gewinnen sie nur mit der anaeroben Glykolyse Energie. Neben ATP, welches hauptsächlich für den Transport über die Zellmembran benötigt wird, entstehen die reduzierenden Stoffe NADH und NADPH. NADH wird benötigt, um spontan entstandenes Methämoglobin, welches ein Fe^{3+} im Zentrum trägt, wieder zu Fe^{2+} zu reduzieren; denn nur mit einem Fe^{2+} im Zentrum des Komplexes kann Sauerstoff transportiert werden. NADPH wird für die Reduktion von Glutathion benötigt, welches die intrazellulären Proteine, wie Hämoglobin, und Proteine in der Erythrozytenmembran vor Oxidation schützt.

Da Erythrozyten Kapillaren passieren, die einen geringeren Durchmesser als ihre $7,5 \mu\text{m}$ haben, müssen sie sich stark verformen. Hierzu ist ein spezielles Zytoskelett nötig, das aus Spektrin, Aktin, Ankyrin sowie Protein 4.1 und 4.2 besteht. Genetischer Mangel an einem dieser Proteine kann zu gesteigertem Erythrozytenabbau führen, was z. B. bei hereditärer Elliptozytose oder Sphärozytose von Bedeutung ist [1, S. 488].

Sämtliche Blutzellen entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, also auch die Erythrozyten. Die Erythropoese findet im Grunde ausschließlich im roten Mark der flachen und kurzen Knochen statt. Dabei entstehen aus pluripotenten Stammzellen zunächst myeloische Stammzellen, die über weitere Vorläuferzellen zu Retikulozyten und dann zu Erythrozyten reifen. Dabei verlieren die Zellen nach und nach ihren Kern und ihre Organellen. Retikulozyten werden ins Blut abgegeben, enthalten aber noch Bestandteile von Zellorganellen, die sie innerhalb von Tagen vollends verlieren. Die Lebenszeit von reifen Erythrozyten beträgt 100 bis 120 Tage, dann treten sie in die

Seneszenz ein und werden aufgrund ihrer geringeren Verformbarkeit in Leber und Milz abgebaut. Sie können allerdings auch schon früher geschädigt werden und durch Hämolyse oder Eryptose zugrunde gehen [9]. Auf diese Vorgänge wird in Kapitel 1.3 genauer eingegangen.

Die Regulation der Erythropoese erlaubt es, die Bildung von Erythrozyten um ein Vielfaches zu steigern. Hierzu wird vor allem in der Niere vermehrt das Glykoproteinormon Erythropoietin (EPO) gebildet. Es verhindert die Apoptose von erythrozytären Vorläuferzellen und regt die Proliferation und Differenzierung an, was zu einer vermehrten Bildung und Freisetzung von Retikulozyten und damit auch Erythrozyten führt. Ohne EPO können keine Erythrozyten gebildet werden. Die Wirkung von EPO wird durch die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 sowie durch Androgene und Somatomedine (insuline like growth factor) verstärkt [1, S. 485-486].

1.1.2. Aufgaben

Da Sauerstoff physikalisch sehr schlecht löslich ist und gleichzeitig enorme Bedeutung für den Energiestoffwechsel des menschlichen Körpers hat, muss er gebunden transportiert werden. Diese Aufgabe übernimmt das Hämoglobin in den Erythrozyten. In der Lunge gelangt Sauerstoff über passive Diffusion in die Kapillaren, wo er über eine Komplexbindung an Hämoglobin gebunden wird. Über den Blutkreislauf gelangt der gebundene Sauerstoff in die Körperperipherie, wo er wieder abgegeben wird, um den Zellen für lebenswichtige Stoffwechselprozesse, vor allem für die aerobe ATP-Gewinnung mittels Atmungskette, zur Verfügung zu stehen. Die Sauerstoffkapazität des Blutes, d.h. dessen maximale Aufnahmefähigkeit von Sauerstoff, steigt mit der Hämoglobinkonzentration. Davon ist die körperliche Leistungsfähigkeit zu einem großen Teil abhängig.

In umgekehrter Richtung muss das im Gewebe anfallende Kohlenstoffdioxid (CO_2) in die Lunge transportiert werden, damit es dort abgeatmet werden kann. CO_2 reagiert mit Wasser zu Kohlensäure, welche wiederum zu Bicarbonat (HCO_3^-) und einem Proton (H^+) dissoziiert. Diese Reaktion wird durch das in Erythrozyten reichlich vorhandene Enzym Carboanhydrase stark beschleunigt. Bicarbonat gelangt im Austausch mit Chlorid in das Blutplasma und über den Blutkreislauf in die Lunge. Die Protonen werden vom Hämoglobin gebunden und abgepuffert. Etwa 5 % des CO_2 wird in Form von

Carbaminverbindungen, vor allem Carbaminohämoglobin, transportiert. In der Lunge laufen die beschriebenen Prozesse in umgekehrter Richtung ab, und CO₂ wird abgeatmet.

In der Diagnostik und Therapiekontrolle des Diabetes mellitus ist das nicht enzymatisch mit Glukose gebundene Hämoglobinmolekül HbA1c von zentraler Bedeutung.

Erythrozyten sind also für den Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Transport im Blut verantwortlich und helfen mit der Pufferkapazität des Hämoglobins dabei, den pH-Wert des Blutes konstant zu halten [1, S. 743-749, 10].

1.1.3. Anämie

Eine Anämie liegt vor, wenn die Hämoglobinkonzentration bei Frauen geringer als 12,3 g/dl, bei Männern geringer als 14,0 g/dl ist oder der Hämatokrit bei Frauen auf unter 40 %, bei Männern auf unter 47 % sinkt. Die Anämie ist die häufigste Blutbildveränderung nach deren Ursache gesucht werden muss [11, S. 1162-1164].

Bei einer Anämie ist wegen der verringerten Sauerstoffkapazität die Sauerstoffversorgung des Körpers eingeschränkt. Daraus resultieren die typischen Symptome wie Blässe von Haut und Schleimhäuten, allgemeine Schwäche und Müdigkeit, Belastungsdyspnoe, Kopfschmerzen, Ohrensausen, Schwindel und Konzentrationsschwäche sowie kompensatorische Tachykardie, die sich als Herzklopfen bemerkbar machen kann [11, S. 1162-1164].

Anämien können sehr unterschiedliche Ursachen haben. Daher ist es für die Therapieentscheidung wichtig, diese genau zu ermitteln. Man unterscheidet prinzipiell zwischen Anämien durch eine gestörte Erythropoese und Anämien durch gesteigerten Erythrozytenverlust bzw. -abbau [11, S. 1162-1164].

Eine gestörte Erythropoese kann hervorgerufen werden durch eine klonale Störung der erythropoetischen Stammzellen bei aplastischer Anämie und myelodysplastischen Syndromen, durch die Verdrängung der Erythropoese im Knochenmark, durch maligne Prozesse und durch eine DNA-Synthesestörung bei Vitamin B12-, Folsäuremangelanämie oder sideroblastischen Anämien. Außerdem gehört die Hämoglobinsynthesestörung bei Eisenmangelanämie, Thalassämie oder durch Medikamente und Toxine zu dieser Gruppe. Auch EPO-Mangel bei Tumoranämie und

renaler Anämie führt zu einer verringerten Produktion von Erythrozyten [11, S. 1162-1164].

Zur Gruppe der Anämien aufgrund eines gesteigerten Erythrozytenverlustes oder -abbaus gehören die akute und chronische Blutungsanämie sowie der erhöhte Erythrozytenabbau durch Hämolyse [11, S. 1162-1164]. Dabei können Erythrozyten analog zur Nekrose kernhaltiger Zellen platzen (Hämolyse) oder schrumpfen, Phosphatidylserin auf der Zellmembran umlagern und von Makrophagen beseitigt werden. Diesen suizidalen Zelltod nennt man Eryptose. Zu vermehrter Hämolyse und/oder Eryptose führen unter anderem Kugelzellanämie, Sichelzellanämie, Thalassämie und Malaria, Sepsis, Vergiftungen mit z. B. Blei und Kupfer, Autoimmunreaktionen gegen Erythrozyten und Rhesusinkompatibilität. Auch verschiedene Medikamente können zu einem erhöhten Erythrozytenabbau und somit zu einer Anämie führen [1, S. 486-487].

1.2. Apoptose

1.2.1. Bedeutung

Um die Eryptose, den suizidalen Zelltod von Erythrozyten, zu verstehen, ist es sinnvoll, sich zunächst mit der Apoptose, dem suizidalen Zelltod von kernhaltigen Zellen, zu befassen.

Bei mehrzelligen Lebewesen besteht ein beständiges Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zelltod. In der Embryonalperiode spielt bei der Bildung von Organen und Körperteilen neben der Zellteilung, -motilität und -differenzierung auch der Zelltod eine wichtige Rolle [2]. So entstehen zum Beispiel die Finger durch programmierten Zelltod der Zellen in den Fingerzwischenräumen. Bei Frauen entstehen aus dem Müller-Gang der Uterus und die Tuben, bei Männern wird er jedoch nicht benötigt und deshalb abgebaut [12]. Eine weitere Funktion des programmierten Zelltodes stellen Qualitätskontrolle und Reparaturmechanismen dar, da fehlerhafte Zellen so entfernt werden können [12]. Wenn dieses Gleichgewicht aus Zellproliferation und Zelltod nicht mehr vorhanden ist, können verschiedene Krankheiten entstehen. Überwiegt die Zellteilung den Zelltod, können Tumore wachsen, welche teilweise aktiv die Apoptose hemmen [13]. Gewinnt der Zelltod die Überhand und wird nicht durch Zellteilung kompensiert, entstehen degenerative Prozesse, z. B. bei

neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer [2, 14, 15].

Andererseits kann vermehrte Apoptose auch aggressiven Tumorzellklonen Platz schaffen und somit ihr Wachstum anregen oder den Selektionsdruck von Tumorzellklonen erhöhen und die aggressiveren Klone begünstigen [16].

1.2.2. Merkmale

Die beiden bekanntesten Zelltodtypen sind Apoptose und Nekrose, die klar voneinander abgegrenzt werden können. Nekrose beinhaltet eine unspezifische Schwellung der gesamten Zelle und der einzelnen Organellen, wodurch die Zellmembran undicht wird und Zellinhalt in die Umgebung gelangt. Dies führt zu einer Immunreaktion und damit zu einem entzündlichen Prozess. Im Gegensatz dazu bleibt bei der Apoptose die Zellmembran intakt, und es gelangt kein Zellinhalt nach außen, wodurch auch die Immunreaktion ausbleibt. Vielmehr schrumpft die Zelle, teilt sich in kleine „apoptotic bodies“ und verlagert Phosphatidylserin an die Zelloberfläche. Dies stellt für Nachbarzellen bzw. für Makrophagen das Signal dar, diese Zelle oder Zellteile zu phagozytieren und damit geordnet abzubauen [2, 17, 18].

Mittlerweile wurden zudem weitere Formen des programmierten Zelltodes erforscht, die sich sowohl in den Mechanismen als auch morphologisch unterscheiden [2]. So kann die Apoptose noch weiter unterteilt werden in Apoptose von Interphasezellen, in die Mitotische Katastrophe und Anoikis. Von der Apoptose unterscheiden lässt sich dagegen der Zelltod durch Autophagie, Necroptose und der Tod von terminal differenzierten Zellen, wie zum Beispiel Keratinozyten (Cornifikation) und Erythrozyten (Eryptose) [19]. Zudem gibt es weitere alternative Arten von Zelltod, wie zum Beispiel Paraptose, Pyroptose, Oncose, Pyronecrose, Zellkannibalismus und Methuose [2]. Hier erfolgt eine Einschränkung auf die Apoptose und natürlich die Eryptose.

Der programmierte Zelltod kann entweder einen Suizid oder einen von anderen Zellen hervorgerufenen Tod bedeuten. Außerdem kann die Zelle entweder in einem bestimmten Entwicklungsstatus geplant in den Zelltod übergehen, oder sie wurde verletzt, bzw. es sind DNA-Schäden entstanden, welche nicht ausreichend repariert werden konnten. Diese Verletzungen können von endogenen Botenstoffen wie dem Zytokin TNF, Ceramid

oder aber durch exogene Einflüsse verursacht werden. Hierzu gehören z. B. Ricin, Retinolsäure, aber auch ionisierende Strahlung und extreme Temperaturen [2].

1.2.3. Ablauf der Apoptose

Die Apoptose lässt sich in folgende Hauptschritte einteilen: 1. Induktion eines apoptotischen Programms, 2. Aktivierung proapoptotischer Proteine, 3. Aktivierung einer Caspase-Kaskade und damit Spaltung von Proteinen, 4. Zersetzung bzw. Neuorganisation von intrazellulären Organellen, 5. Zellfragmentierung in „apoptotic bodies“, 6. Vorbereitung der Zelle und ihrer Fragmente für die Phagozytose durch Makrophagen bzw. Nachbarzellen [2].

1.2.4. Caspasen

Caspasen sind cysteinabhängige Aspartat-spezifische Peptidasen, d.h. sie haben Cystein im aktiven Zentrum und schneiden hinter Aspartat [20]. Eingeteilt werden können Caspasen in inflammatorische Caspasen (Caspase-1,-4 und -5) und apoptotische Caspasen, die wiederum nach ihren Aufgaben in Initiatorcaspasen (Caspase-2,-8,-9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3,-6 und -7) zu unterteilen sind [2, 21]. Sie liegen in inaktiver Form im Zytosol vor und können durch Dimerisierung bzw. limitierte Proteolyse aktiviert werden. Wenn in der Zelle die „Entscheidung“ gefallen ist, zu sterben, werden durch verschiedene Mechanismen, die im nächsten Kapitel beleuchtet werden, Initiatorcaspasen aktiviert, welche dann wiederum Effektorcaspasen sowie andere Proteine für den Zellabbau, wie Gelsolin oder Endonukleasen, aktivieren. Effektorcaspasen zerschneiden daraufhin strukturgebende und regulatorische Zellproteine. Außerdem führt diese Kaskade zum Abbau intranukleärer Lamina, zur Beeinträchtigung der DNA-Integrität, zur Chromatinverdichtung und zum Abbau von zytoskelettalen Proteinen, Mitochondrien, Golgiapparat, endoplasmatischem Retikulum und vielen weiteren Zielen [2, 21].

Somit sind Caspasen die Hauptverantwortlichen für die Ausführung der Apoptose, da sie die meisten morphologischen Veränderungen der Apoptose verursachen. Dazu zählt die Zellschrumpfung, die durch die Spaltung von zytoskelettalen Proteinen ermöglicht wird. Ihre Bedeutung für die Apoptose wird auch dadurch klar, dass durch ihre Blockade Zellen vor dem Zelltod bewahrt werden können [22]. Neben der Regulation von Zellüberleben

und Zelltod spielen Caspasen bei Entzündung, Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle [2, 21].

1.2.5. Induktionsmechanismen

Wenn die Caspasenkaskade einmal in Gang gesetzt ist, ist sie nicht mehr rückgängig zu machen und läuft sehr schnell ab. Daher muss die Entscheidung über die Aktivierung von Initiatorcaspasen, und somit die Entscheidung über Leben und Tod, sorgfältig getroffen werden. Es gibt verschiedene Mechanismen für die Apoptoseinduktion. Der extrinsische Signalweg wird durch die Interaktion von extrazellulären Signalmolekülen mit einem Oberflächenrezeptor ausgelöst, wodurch die zytosolische Caspase-Kaskade in Gang gesetzt wird. Beim intrinsischen Signalweg erfolgt dies durch die Freisetzung von proapoptischen Proteinen aus verschiedenen Organellen wie dem Mitochondrium, dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgiapparat oder durch Induktion von Genen, die proapoptische Proteine kodieren [2]. Dabei kommt der intrinsische mitochondriale Weg am häufigsten vor [16].

1.2.5.1. *Extrinsischer Signalweg*

Der extrinsische Signalweg der Apoptose kann auch rezeptorassoziierter Signalweg genannt werden, da hierbei ein Zytokin der TNF-Familie als Ligand mit einem Todesrezeptor der TNF-Rezeptor-Familie interagiert und somit das Todessignal in Gang bringt. Die Zytokine können entweder membrangebunden vorliegen oder durch limitierte Proteolyse aus membrangebundenen Proteinen freigesetzt werden. Es gibt ungefähr 40 spezifische Ligand-Rezeptor-Paare [23]. Die membrangebundenen Rezeptoren besitzen intrazellulär eine Todesdomäne („death domain“), welche mit Adapterproteinen interagiert und einen Signalkomplex bildet, der den Zelltod einleitet. Dieser Signalkomplex wird „death-inducing signaling complex“ (DISC) genannt und interagiert mit den Initiatorprocaspasen-8 oder -10 [24]. Diese werden durch „induced proximity“ [22], also durch Annäherung der Procaspasen, autokatalytisch aktiviert. Die Initiatorcaspasen-8 und -10 wiederum aktivieren Effektorcaspasen [2]. Dabei kann Caspase-8 das Protein Bid spalten und damit das aktive t-Bid bilden, woraufhin dieses wiederum Bax aktiviert, welches Apoptose über den mitochondrialen Weg verursacht [25, 26]. Hierdurch wird eine Verbindung zwischen diesen beiden Wegen hergestellt.

Es gibt auch einige Rezeptoren der TNF-Familie, die nur über kurze zytosolische Domänen verfügen und damit nicht in der Lage sind, mit Adapterproteinen zu interagieren und einen Signalweg hervorzurufen. Diese Rezeptoren sind allerdings in der Lage, Zytokine zu binden und somit in Konkurrenz zu den normalen Rezeptoren zu treten. Daher wird angenommen, dass sie normale Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von Todesliganden schützen [26].

1.2.5.2. Intrinsischer Signalweg

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptose [25]. Dabei ist die Freisetzung von Cytochrom c und anderen Proteinen aus Mitochondrien in das Zytosol durch erhöhte Membranpermeabilität von großer Bedeutung. Cytochrom c wird für die Bildung des Apoptosoms benötigt, welches sich außerdem aus dem oligomeren Protein Apaf-1, der Procaspase-9 und aus dATP zusammensetzt. Es aktiviert die Procaspase-9 zu Caspase-9, diese wiederum aktiviert andere Procaspasen-9 und Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 und setzt somit die Caspasenkaskade in Gang [2, 27].

Zudem werden weitere Proteine aus dem Mitochondrium freigesetzt, die Apoptoseinhibitoren abbauen (z. B. Smac) und so die Aktivierung von Caspasen unterstützen oder die eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung verursachen (z. B. Endonuklease G) [2].

Die Freisetzung von Cytochrom c und anderen Molekülen aus dem Intermembranraum von Mitochondrien führt unweigerlich zum Tod der Zelle durch Apoptose. Daher muss dieser Vorgang streng reguliert sein, wobei Proteine der Bcl-2-Familie eine wichtige Rolle spielen. Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen: Zum einen die proapoptotischen Bax und Bak, dann die antiapoptotischen Bcl-2, Bcl-X_L und Mcl-1 und zuletzt noch die BH3-only-Proteine. Diese kontrollieren entweder die pro- und antiapoptotischen Proteine oder spezifisch ein Mitglied einer Gruppe. Die genaue Interaktion und die Wirkmechanismen dieser Proteine sind Gegenstand der Forschung [25].

Auch das endoplasmatische Retikulum spielt eine Rolle bei der Auslösung von Apoptose. Es ist die Zellorganelle, in der neu synthetisierte Proteine durch Modifizierung, Faltung und Oligomerisierung in ihre korrekte Tertiärstruktur gebracht werden. Durch extra- und

intrazelluläre Stimuli kann dieser Prozess allerdings gestört werden, weswegen dann viele Proteine im endoplasmatischen Retikulum nicht oder falsch gefaltet vorliegen. Dies wird Stress des endoplasmatischen Retikulums genannt (ER-Stress) und kann das Überleben der Zelle gefährden. Daher gibt es drei Strategien der Zelle, diesen Stress zu beseitigen: zum einen durch eine geringere Translation von Proteinen, zum anderen durch eine erhöhte Transkription von Genen, die Chaperone kodieren, welche die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen, und zuletzt durch einen „ER-associated degradation pathway“, welcher zum Abbau fehlgefalteter Proteine führt. Sofern Zellen längere Zeit ER-Stress ausgesetzt sind, gehen sie durch Apoptose zugrunde [2, 28].

Auch der Golgiapparat kann bei Apoptose eine Rolle spielen, was jedoch nicht gut erforscht ist. Seine Membran enthält Proteine, die an Apoptose beteiligt sind, wie zum Beispiel der TNF-Rezeptor-1, CD95 und TRAIL-Rezeptor-1 [2].

Lysosomen können bei erhöhter Permeabilität ihrer Membran zu Apoptose führen, wobei der genaue Mechanismus unklar bleibt. Oxidativer Stress und verschiedene Medikamente können zu solch einer erhöhten Membranpermeabilität führen. Sauerstoffradikale, die bei oxidativem Stress entstehen, können mit Lysosomenmembranen reagieren und sie damit beschädigen. Außerdem kann es zur erleichterten Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in Lysosomen und zur Beeinflussung von Enzymen wie der Phospholipase A2 kommen, wodurch Phospholipide abgebaut werden [2].

Auch der Zellkern kann Apoptose verursachen, wofür es zwei Hauptwege gibt. Beim ersten führt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 zur Expression von proapoptischen Proteinen wie Bax und damit zur Aktivierung des mitochondrialen Weges. P53 wird dabei durch verschiedene Faktoren aktiviert, wie z. B. UV- und ionisierende Strahlung, oxidativen Stress, Hitze, Sauerstoffmangel, niedrige Temperaturen, DNA-Schäden und Replikationsfehler. Dies führt zunächst zu Reparaturvorgängen, und erst wenn diese gescheitert sind, wird das apoptotische Programm gestartet. Der zweite nukleäre Mechanismus ist mit der Aktivierung der Caspase-2 verbunden, welche Bid schneiden kann und es damit aktiviert. Dies führt über die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien zur Aktivierung der Apoptose [2].

1.3. Eryptose

Da Erythrozyten keinen Zellkern und keine Mitochondrien besitzen und ihnen damit wichtige Elemente für die Apoptose fehlen, dachte man lange Zeit, sie seien nicht zum suizidalen Zelltod in der Lage und würden nur durch andere Mechanismen eliminiert [4]. Hierzu gehört die Seneszenz, die Alterung von Erythrozyten. Gealterte Erythrozyten sind nicht mehr so verformbar wie junge, und es besteht die Gefahr, dass sie in Kapillaren steckenbleiben und diese damit verstopfen. Daher werden in der Milz die Erythrozyten auf ihre Beweglichkeit hin getestet und die unelastischen aussortiert [29].

1.3.1. Merkmale

Es konnte aber gezeigt werden, dass Erythrozyten, wenn sie dem Calciumionophor Ionomycin ausgesetzt sind, schrumpfen, Mikrovesikel der Zellmembran bilden und Phosphatidylserin an ihrer Zelloberfläche tragen. Dies alles sind typische Merkmale der Apoptose kernhaltiger Zellen [3]. Um den suizidalen Zelltod der kernlosen Erythrozyten von der Apoptose kernhaltiger Zellen zu unterscheiden, wurde 2005 von Lang et. al. der Begriff „Eryptose“ eingeführt [4].

Grundsätzlich kann man sagen, dass die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei der Entstehung der Eryptose von zentraler Bedeutung ist. Die Zellschrumpfung kommt dadurch zustande, dass Calcium den Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanal („Gardos“-Kanal) aktiviert, wodurch Kalium aus der Zelle strömt. Daraufhin hyperpolarisiert die Zellmembran, und da die Membran für Chlorid sehr durchlässig ist, folgt es dem elektrischen Gradienten und strömt ebenfalls nach extrazellulär. Wasser folgt dem osmotischen Gradienten aus der Zelle, und es kommt zur Zellschrumpfung [30]. Es konnte eine calciumsensitive Scramblase nachgewiesen werden, die Phosphatidylserin vom inneren Blatt der Erythrozytenmembran auf das äußere überführt [31]. Diese Vorgänge sind nicht auf das Vorhandensein von Caspasen angewiesen [4]. Zudem aktiviert Calcium die Cysteinendopeptidase Calpain, ein Enzym, das das Zellskelett abbaut und damit die Bildung von Mikrovesikeln fördert [32].

1.3.2. Mechanismen

Abgesehen vom Calciumeinstrom kann Eryptose über weitere Mechanismen ausgelöst werden, hierzu gehört die Ceramidbildung in der Membran, der oxidative Stress, die

Stimulation von Caspasen, die Aktivierung von Calpain, der Energiemangel und verschiedene Kinasen [33]. In diesem Kapitel wird auf diese Vorgänge genauer eingegangen.

1.3.2.1. Calcium

Wie bereits ausgeführt, ist Calcium zentral bei der Entstehung von Eryptose. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration kommt durch unterschiedliche Trigger, wie zum Beispiel eine osmotische Zellschrumpfung, oxidativen Stress, Prostaglandine und Amilorid zustande. Durch diese Trigger werden unselektive Kationenkanäle geöffnet, welche unter anderem für Natriumionen (Na^+) und Calciumionen (Ca^{2+}) permeabel sind [4, 34]. Calcium strömt in die Zelle, was, wie oben beschrieben zur Zellschrumpfung und zum Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie führt [4, 30, 31].

1.3.2.2. Ceramid

Ein weiterer wichtiger Mechanismus für Eryptose ist Ceramid, welches bei verschiedenen Zelltypen auch Apoptose verursacht. Ceramid wird durch die Bindung von Sphingosin an eine Fettsäure gebildet. Das aus Ceramid und einer hydrophilen Phosphorylcholin-Kopfgruppe bestehende Sphingomyelin ist das in Zellmembranen am häufigsten vorkommende Sphingolipid. Ceramid kann neu synthetisiert oder durch die von Sphingomyelinase katalysierte Hydrolyse von Sphingomyelin gebildet werden [32].

In Erythrozyten wird Ceramid bei osmotischem Schock durch Sphingomyelinspaltung gebildet und macht Erythrozyten empfindlicher gegenüber einer erhöhten Calciumkonzentration. Durch Hinzugeben von C-6-Ceramid, C-16-Ceramid oder bakterieller Sphingomyelinase konnte die Eryptose durch osmotischen Schock imitiert werden [35]. Ceramid beeinflusst die Interaktion der Zellmembran mit dem Zytoskelett und verringert die Membranstabilität. Letzten Endes führen die durch Ceramid verursachten Veränderungen in der Membran zu Vesikelbildung, Verlust an Elastizität und erhöhter Membrandurchlässigkeit [32]. Erhöhte Ceramidbildung ist bei der Eryptose durch verschiedene Erkrankungen wie Fieber, Sepsis, hämolytischer Anämie, HUS, Niereninsuffizienz im Endstadium, Leberversagen und Morbus Wilson beteiligt und wird gehemmt durch Amitriptylin und Harnstoff. Der Plättchen-aktivierende-Faktor (PAF),

der z. B. bei osmotischer Zellschrumpfung entsteht, bindet an PAF-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Erythrozyten, wodurch die Bildung von Ceramid stimuliert wird [32].

1.3.2.3. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress (reactive oxygen species; ROS) kann ebenfalls ein Mechanismus für die Entstehung von Eryptose sein. Er stimuliert den Calciumeinstrom über unselektive Kationenkanäle und aktiviert Chloridkanäle, wodurch die Schrumpfung von Erythrozyten erleichtert wird [27]. Zudem werden Aspartyl- und Cysteinylproteasen, sowie oxidantien-sensitive Caspasen aktiviert, welche den Anionenaustauscher „band 3“ spalten. Es kommt zur Phosphatidylserinexposition am äußeren Blatt der Zellmembran [36, 37].

1.3.2.4. Caspasen

Caspasen können an Eryptose beteiligt sein, sind allerdings nicht zwingend notwendig. Sie spalten den Anionenaustauscher 1 und sorgen dadurch für die Verlagerung von Phosphatidylserin an die Erythrozytenoberfläche. Caspasen können z. B. durch Leukotriene, α -Liponsäure und, wie bereits erwähnt, oxidativen Stress aktiviert werden. Für die Eryptose durch Calciumeinstrom sind jedoch keine Caspasen notwendig [33, 36].

1.3.2.5. Kinasen

Neben den bisher dargestellten Mechanismen sind auch verschiedene Kinasen in Erythrozyten vorhanden und an Eryptose beteiligt.

Die Proteinkinase C wird durch Energiemangel oder Phorbolster aktiviert, phosphoryliert Membranproteine, wodurch vermehrt Calcium in die Zelle strömt. Dies führt zur Phosphatidylserinexposition und Zellschrumpfung. In Erythrozyten sind die Proteinkinasen $C\alpha$, $C\iota$, $C\mu$ und $C\zeta$ vorhanden und phosphorylieren nach Aktivierung Proteine des Zytoskeletts wie band 4.1 und 4.9, Adducin und den Na^+/H^+ -Antiporter NHE 1 [36, 38].

Auch die p38-Kinase wird in Erythrozyten exprimiert. Sie wird durch hyperosmotischen Schock phosphoryliert; durch Inhibition dieser Kinase wird die Eryptose gehemmt. Sie nimmt also an der Eryptose durch hyperosmotischen Schock teil [33, 39].

Energiemangel führt zur Aktivierung der Janus-aktivierten Kinase 3 (JAK3), die an Tyr980 phosphoryliert wird. Dadurch kommt es zur Umlagerung von Phosphatidylserin

an das äußere Blatt der Zellmembran. Eine pharmakologische Hemmung von JAK3 oder ein Ausschalten des Gens für JAK3 hemmen somit die Eryptose durch Energiemangel [33, 40].

Die Caseinkinase 1 α (CK1 α) ist ebenfalls an der Entstehung von Eryptose beteiligt, indem sie die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst [33, 41]. Durch Stickstoffmonoxid (NO) wird die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI) aktiviert und hemmt die Eryptose. Damit ist NO ein wichtiger physiologischer Inhibitor [33].

Die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) ist ein Inhibitor der Eryptose. Sie reagiert auf Energiemangel und reguliert die p21-aktivierte Kinase 2 (PAK2) hinunter, wodurch es zur Hemmung der Eryptose kommt [33]. Auch die sorafenib- und sunitinibsensitiven Kinasen besitzen eine hemmende Wirkung auf die Eryptose [33].

1.3.3. Bedeutung der Eryptose

Zur Bedeutung von Eryptose im gesunden und kranken Organismus wurden in den letzten Jahren viele Erkenntnisse gewonnen. Sie ist dennoch erst in Ansätzen verstanden und wird in diesem Kapitel dargestellt

1.3.3.1. Physiologische Bedeutung

Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten werden schnell von phagozytierenden Zellen über Phosphatidylserin-bindende Rezeptoren erkannt, aufgenommen und abgebaut. Solange der vermehrte Verlust von Erythrozyten mittels einer beschleunigten Erythropoese ausgeglichen wird, bleibt die Anzahl an zirkulierenden Erythrozyten unbeeinflusst, und lediglich eine erhöhte Menge an Retikulozyten ist feststellbar. Erst wenn der von Eryptose verursachte erhöhte Erythrozytenuntergang nicht mehr ausgeglichen werden kann, entwickelt sich eine Anämie [33].

Vorzeitige Eryptose begrenzt die durchschnittliche Lebensspanne von Erythrozyten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ältere Erythrozyten empfindlicher auf äußeren Stress reagieren und schneller durch Eryptose zugrunde gehen [42].

Eine wichtige Aufgabe der Eryptose könnte das Verhindern einer Hämolyse sein. Charakteristisch dafür sind Zellschwellung, Platzen der Zelle und damit Austreten des Zellinhaltes, unter anderem auch von Hämoglobin. Über die Nierenglomeruli wird

Hämoglobin filtriert und führt unter Umständen zur Verstopfung von Nierentubuli und damit zu Nierenschäden. Die Hämolyse kommt durch Energiemangel, eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran oder eine defekte Na^+/K^+ -ATPase zustande. Somit gelangt vermehrt Na^+ und Cl^- und dadurch osmotisch auch Wasser in die Zelle, und führt zur Zellschwellung. Dies kann zwar kurze Zeit durch K^+ -Ausstrom verzögert werden, was jedoch nicht die Ruptur der Zellmembran verhindert. Kommt die Eryptose diesen Vorgängen zuvor, kann die Hämolyse und damit das unkontrollierte Austreten von Zellinhalt verhindert werden. Durch die Phosphatidylserinexposition werden die Erythrozyten von phagozytierenden Zellen erkannt, aufgenommen und kontrolliert abgebaut. Die Öffnung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen und die folgende Zellschrumpfung wirken der Zellschwellung entgegen [4, 36].

Phosphatidylserin bindet jedoch nicht nur an spezifische Rezeptoren phagozytierender Zellen, sondern auch an den Rezeptor CXCL16/SR-PSOX, der sich auf Endothelzellen befindet. Außerdem bindet Phosphatidylserin an die Heparin-bindende Domäne von endotheliale Thrombospondin-1 (TSP), an endotheliale Phosphatidylserinrezeptoren und an Thrombozyten [33]. Somit können Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten an Endothelzellen haften bleiben [43], die Blutgerinnung stimulieren [44-46] und damit Thrombosen begünstigen. Eryptose kann also die Mikrozirkulation beeinträchtigen [44, 47-49].

1.3.3.2. Erkrankungen, bei denen Eryptose von Bedeutung ist

Bei verschiedenen Erkrankungen wurden eine erhöhte Eryptoserate und damit eine begrenzte Lebensdauer von Erythrozyten gezeigt. Eryptose kann somit an Anämien beteiligt sein, welche bei diesen Erkrankungen auftreten [50]. Bei Malaria hingegen könnte Eryptose therapeutisch genutzt werden und ist daher von besonders großer Bedeutung [51].

Dehydrierung und schwerer Phosphatmangel führen zu gesteigerter Eryptose [52, 53]. Auch bei Eisenmangel wird vermehrt Eryptose beobachtet, wodurch eine Eisenmangelanämie noch verstärkt werden kann [54]. Ebenso wurde bei malignen Erkrankungen eine erhöhte Eryptoserate festgestellt, was jedoch auch mit der chemotherapeutischen Behandlung zusammenhängen könnte, die häufig Apoptose der Tumorzellen verursacht und damit potentiell auch die Eryptose begünstigen kann [55, 56]. Bei gesunden Rauchern

wurde im Vergleich zur nichtrauchenden Kontrollgruppe eine von erhöhten CRP-Raten begleitete erhöhte Eryptoserate beobachtet [57].

Auch bei Patienten mit Diabetes mellitus wurden vermehrt Phosphatidylserin exponierende Erythrozyten festgestellt. Hyperglykämie führt zu vermehrtem oxidativem Stress und zu einer vermehrten Entstehung von Methylglyoxal, einem Stimulator der Eryptose [33, 58, 59].

Chronische Niereninsuffizienz führt zu Anämie. Diese wurde bis vor einigen Jahren hauptsächlich der fehlenden Bildung von EPO und damit der fehlenden Stimulation der Erythropoese zugeschrieben. Sie wird jedoch in der Regel von Eisenmangel und einer erhöhten Prozentzahl Phosphatidylserin-exponierender Erythrozyten begleitet. Somit haben selbst Patienten, die adäquat mit Erythropoietin behandelt werden und eine normale Menge an Retikulozyten besitzen, noch Anämien. Ihre Erythrozyten sind erhöhtem oxidativen Stress, Hyperphosphatämie und der Akkumulation von Urämietoxinen ausgesetzt, womit die vermehrte Eryptose erklärt werden kann, welche bei Patienten, die auf eine Peritonealdialyse angewiesen sind, gezeigt wurde [33, 60-62].

Bei Patienten mit Leberversagen, Hyperbilirubinämie und nichtalkoholischer Steatohepatitis konnte ebenfalls eine erhöhte Eryptoserate beobachtet werden [63]. Häufig tritt Eryptose auch bei Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie mit Autoantikörpern vom Typ IgM oder IgA auf. Hierbei könnte die Hemmung der Eryptose mittels EPO eine therapeutische Option sein [64].

Auch beim hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) wird eine gesteigerte Eryptose beobachtet. Selbst bei Inkubation von Erythrozyten gesunder Kontrollprobanden mit dem Plasma von HUS-Patienten können vermehrte Phosphatidylserinexposition, Zellschrumpfung, erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration und Bildung von Ceramid festgestellt werden. Mit einer Plasmapherese lässt sich dieser Effekt verhindern [33, 65].

Bei der Sepsis sind ähnliche Vorgänge wie beim HUS zu beobachten. Patienten haben vermehrt eryptotische Zellen, und ihr Blutplasma löst bei Erythrozyten von gesunden Probanden Phosphatidylserinexposition, Zellschrumpfung, erhöhte intrazelluläre Calciumaktivität, Ceramidbildung durch erhöhte Sphingomyelinaseaktivität und oxidativen Stress aus [33, 66].

Beim Morbus Wilson, einer genetischen Störung, werden vermehrt Kupferionen akkumuliert. Patienten leiden an einer milden Anämie und haben eine erhöhte Eryptoserate, die auf eine erhöhte Aktivität der Sphingomyelinase mit konsekutiver Ceramidbildung und oxidativen Stress zurückzuführen ist [33, 67].

Sichelzellanämie, Thalassämie und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel führen ebenfalls zu einer erhöhten Eryptoserate beziehungsweise einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress [33].

Somit könnte die pharmakologische Hemmung der Eryptose eine Therapiemöglichkeit der Anämie bei diesen Erkrankungen darstellen. Vor allem bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung, bei denen EPO nicht ausreicht, um den Hb zu normalisieren, könnte eine ergänzende Therapie mit einem Inhibitor sinnvoll sein, auch um Bluttransfusionen zu vermeiden [50].

Bei Malaria hingegen kann die Eryptose an sich therapeutisch genutzt werden. Die Parasiten, die Malaria verursachen (*Plasmodium falciparum*) dringen in Erythrozyten ein, um dem Immunsystem zu entgehen, vermehren sich dort, treten wieder aus der Zelle aus und infizieren andere Zellen [51, 68].

Für die Replikation sind die Parasiten auf einen sehr hohen Substratumsatz angewiesen, weswegen sie den Transport über die Zellmembran fördern. Es gelangen neben Glucose auch Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle, was durch die Öffnung der Ionenkanäle aufgrund von gesteigertem oxidativem Stress geschieht. Da intrazelluläres Calcium ein Auslöser für Eryptose ist, arbeitet der Parasit einer Erhöhung der Calciumkonzentration entgegen, indem er selbst vermehrt Calcium aufnimmt. Zudem verhindert der Parasit durch Verringern des intrazellulären kolloidosmotischen Drucks durch Abbau von Hämoglobin und Transport von Aminosäuren aus der Zelle eine vorzeitige Hämolyse [51, 68].

Letztlich lässt sich die Eryptose jedoch nicht verhindern. Es kommt zum Kollaps der Phosphatidylserinasymmetrie. Die Erythrozyten werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut. *Plasmodium falciparum* beschleunigt also die Alterung von Erythrozyten und verursacht Eryptose [51, 68].

Dies wird bei Erythrozyten mit einer ohnehin schon erhöhten Eryptoserate noch beschleunigt. Daher gehen bei Sichelzellanämie, beta-Thalassämie und G6P-DH-Mangel

die infizierten Erythrozyten schon im frühen Entwicklungsstadium der Parasiten durch Eryptose zugrunde und bieten dadurch eine gewisse Resistenz gegen Malaria [51].

Somit könnte eine frühzeitige pharmakologische Stimulation von Eryptose zur Behandlung von Malaria wirksam sein. Es wurde gezeigt, dass durch Beschleunigung der Eryptose bei Mäusen durch Eisenmangel, Blei, Chlorpromazin und Hemmung der NO-Synthese mit L-NAME die Parasitenlast verringert wird und sie länger überleben. Da Plasmodien gegen Sichelzellanämie bisher keine Resistenzen gebildet haben, weil der Parasit nicht direkt angegriffen wird, sondern die Zellvorgänge verändert sind, besteht die Hoffnung, dass sich auch gegen die pharmakologische Beschleunigung der Eryptose keine Resistenzen bilden werden [51, 68].

1.3.4. Stimulatoren und Inhibitoren

Mittlerweile sind viele Stimulatoren der Eryptose bekannt. Dazu gehören sowohl Xenobiotika als auch kleine endogene Moleküle und diverse andere Stressoren wie osmotischer und oxidativer Stress, Energiemangel und Temperaturerhöhung. Es sind auch diverse Inhibitoren bekannt, darunter NO und EPO [69]. Der Übersichtlichkeit halber werden nur einige dieser Stimulatoren und Inhibitoren hier genannt. Für die vollständige Liste ist auf aktuelle Reviews zum Thema Eryptose zu verweisen.

Zu den Stimulatoren gehören: α -Liponsäure [70], Aluminium [71], Amantadin [72], Amiodaron [73], Anti-A IgG [74], Arsen [75], Azathioprin [76], Celecoxib [77], Cisplatin [78], Fluoxetin [79], Gold [80], Ipratropiumbromid [81], Leukotrien C(4) [82], Lithium [83], Methyldopa [84], Miltefosine [85], Prostaglandin E₂ [4], gadoliniumhaltiges Kontrastmittel [86], Vitamin-A-Säure [87], Ribavirin [88], Rifampicin [89], Silberionen [90, 91], Sorafenib [91], Sunitinib [92] und Vitamin K [93].

Zu den Inhibitoren gehören Adenosin [94], Amitriptylin [95], Koffein [96], Chlorid [4], Glutathion [33], Naringin [97], Staurosporine [38], Harnstoff [4] und Vitamin E [33].

Bei chronischer Hypoxie nach langem Aufenthalt in großer Höhe wurde eine geringere Eryptoserate beobachtet [98].

1.4. Neue Medikamente, die Eryptose verursachen könnten

In den letzten Jahren sind viele Stimulatoren und Inhibitoren der Eryptose erforscht worden. Vor allem bei Medikamenten, die Anämien hervorrufen oder Apoptose verursachen, besteht die Möglichkeit, dass sie auch Eryptose begünstigen. Drei dieser potentiellen Verursacher von Eryptose sind Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine, die in diesem Kapitel näher beleuchtet werden.

1.4.1. Licochalcone A

Licochalcone A ist ein Extrakt der chinesischen Süßholzwurzel *Glycyrrhiza inflata*; chemisch gehört es zur Gruppe der Flavonoide [99]. Die Süßholzwurzel wird bereits seit ca. 4000 Jahren in der chinesischen Medizin verwendet. Licochalcone A wirkt antientzündlich [99, 100], antioxidativ [100], immunmodulatorisch [101, 102] und antimikrobiell [101, 103].

Zudem besteht eine Wirkung gegen Tumore. Zum einen wirkt Licochalcone A durch Hemmung der Zellmigration und -invasion einer Metastasierung entgegen [104, 105]. Zum anderen fördert es Apoptose von Tumorzellen [5, 106-108] und bewirkt Autophagie [107, 109, 110].

Tumore, bei denen eine Wirksamkeit von Licochalcone A in vitro nachgewiesen werden konnte, sind das Plattenepithelkarzinom des Oropharynx [5, 111, 112], Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome [113], das hepatozelluläre Karzinom [104, 114], das Magenkarzinom [100, 115, 116] und das Ösophaguskarzinom [117]. Auch die gynäkologischen Tumore Cervixkarzinom [107], Mammakarzinom [118] und Ovarialkarzinom [119, 120] sowie die urologischen Tumore Prostatakarzinom [106, 109, 118] und Blasenkarzinom [108, 121, 122] können durch Licochalcone A bekämpft werden. Zudem besteht eine Wirksamkeit gegen das maligne Pleuramesotheliom [123], gegen das Lungenkarzinom [105] und das Osteosarkom [110]. Daher wird Licochalcone A für die Behandlung von Malignomen in Betracht gezogen.

Zu den Mechanismen, über die Licochalcone A wirkt, gehören das Hervorrufen von oxidativem Stress [108, 114, 115, 119, 121], die Depolarisation von Mitochondrien [122, 123], die Erhöhung von ER-Stress [122], die Aktivierung von Caspasen [109, 114, 115, 119, 122], die Hemmung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade [105, 107, 109, 117], die

Hemmung von NFκB [104, 111] und das Bewirken eines Zellzyklusarrests [106, 116]. Außerdem hemmt Licochalcone A die Cyclooxygenase-2-Expression [124, 125], Cytochrom-P450-Enzyme [126] und den Leberrezeptor Xα und greift somit in die Lipogenese ein [127].

Andererseits hat Licochalcone A durch die Reduktion von oxidativem Stress in der Haut auch zytoprotektive Effekte [128] und findet deshalb in Kosmetika Anwendung. In einer doppelblinden randomisierten klinischen Studie wurde nachgewiesen, dass eine Creme, die 4-t-Butylcyclohexanol und Licochalcone A enthielt, bei perioraler Dermatitis wirksam ist [129].

Weitere Erkrankungen, bei denen Licochalcone A positiv wirkt, sind Osteoporose [130, 131], atopische Dermatitis [132] und Asthma [133-135].

Wegen all dieser Wirkungen und Einsatzmöglichkeiten ist Licochalcone A ein vielversprechendes neues Medikament. Da es in kernhaltigen Zellen Apoptose verursacht, könnte es auch Eryptose verursachen und somit zu Anämien führen. Sollte dies der Fall sein, wären auch die zugrunde liegenden Mechanismen von Interesse.

1.4.2. Manumycin A

Manumycin A wird durch *Streptomyces parvulus* gebildet und ist ein natürliches Antibiotikum mit Wirkung gegen *Trypanosoma brucei* und gegen *Anaplasma phagocytophilum*, welches die humane granulozytäre Anaplasiose verursacht [136-138].

Manumycin A ist ein selektiver und potenter Farnesyltransferase-Inhibitor [139-144]. Die Farnesyltransferase verändert Ras und andere Proteine, was für deren richtige Lokalisation in der Zelle und biologische Aktivität wichtig ist [136]. Manumycin A hemmt also die korrekte Funktion von Ras [136, 140, 144-148].

Zudem führt Manumycin A zu einer geringeren Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wirkt somit antientzündlich [149] und Atherosklerose entgegen [150]. Hinzu kommt eine Wachstumshemmung von glatten Gefäßmuskelzellen [151]. Außerdem korrigiert Manumycin A aberrantes Splicing des Chloridkanals Clcn1 und könnte daher für die Behandlung der myotonen Dystrophie Typ 1 geeignet sein [152].

Manumycin A verursacht Apoptose [6, 140, 141, 143, 153-156], und es konnte eine Wirksamkeit gegen eine Vielzahl an Tumorzellen gezeigt werden. Dazu gehören Zellen des Pankreaskarzinoms [139, 146], des hepatozellulären Karzinoms [157, 158], des kolorektalen Karzinoms [147, 148], des Ovarialkarzinoms [142], des Mammakarzinoms [159], des Prostatakarzinoms [6], des Mesothelkarzinoms [142], des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms [155, 160] und des Plattenepithelkarzinoms des Oropharynx [153]. Weiterhin konnte eine Wirksamkeit bei Gliomzellen [161], bei Zellen des multiplen Myeloms [140, 141] und des Medulloblastoms [143], sowie bei Lymphomzellen [154] und Zellen der myeloischen Leukämie [154] nachgewiesen werden.

Zu den Mechanismen, über die Manumycin A Apoptose auslöst, gehört neben der oben bereits genannten Hemmung von Ras die Inhibition von HIF-1 α [145], der I κ B-Kinase (IKK) [157, 162] und von NF κ B [141, 157]. Zudem verursacht Manumycin A oxidativen Stress [154-156, 161, 163] und aktiviert den mitochondrialen Apoptoseweg [153, 160] und Caspasen [6, 141, 157, 163].

Damit ist Manumycin A ebenfalls ein potentielles Tumormedikament. Es könnte aufgrund seiner Apoptoseförderung in kernhaltigen Zellen auch Eryptose begünstigen, wodurch Anämien ausgelöst werden könnten. Sollte dies der Fall sein, wäre von Interesse, über welche Signalwege Manumycin A Eryptose verursacht.

1.4.3. Perifosine

Perifosine ist ein synthetisches Alkylphospholipid, das oral verabreicht werden kann [7]. Es hat Ähnlichkeiten zu Miltefosine und Edelfosine, welche Eryptose verursachen [85, 164], allerdings mit einer besseren oralen Bioverfügbarkeit und weniger gastrointestinalen Nebenwirkungen [165]. Perifosine hemmt die Tumorangiogenese und Tumorzellproliferation [166] und verursacht Apoptose [7, 166, 167].

Der wichtigste Mechanismus, über den Perifosine Apoptose verursacht, ist das Zielen auf die Pleckstrin-Homology-Domäne von Akt, wodurch seine Translokation an die Zellmembran verhindert wird [165, 168, 169]. Zudem hemmt Perifosine die Akt-Phosphorylierung und somit die Aktivierung [167, 170]. Ein weiterer Mechanismus, über den Perifosine wirkt, ist Clustering von Todesrezeptoren in lipid rafts [171], oxidativer

Stress [7, 172], Bildung von Ceramid [172], Phosphorylierung von P38 [7] sowie Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und p53 [172, 173]. Perifosine hemmt die Aktivität der Telomerase, verursacht eine Verkürzung der Telomere [174] und führt zu einem Zellzyklusarrest, welcher mit einer erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p21 einhergeht [175, 176].

Allerdings verursacht Perifosine auch protektive Autophagie bei CML-Zellen, wodurch Apoptose gehemmt wird [177]. In Herzmuskelzellen konnte eine Aktivierung des AMPK-Signalweges durch Perifosine in niedrigen Konzentrationen gezeigt werden, wodurch die Zellen vor Glukose- und Sauerstoffmangel und anschließender Reperfusion geschützt wurden [178].

Perifosine bzw. Perifosine in Kombination mit einigen anderen neuen und etablierten Chemotherapeutika wirkt bei verschiedenen Tumoren. In vitro bzw. im Mausmodell wirkt Perifosine z. B. gegen neuroendokrine Tumorzellen [167], AML-Zellen [179], CLL-Zellen [180], Osteosarkomzellen [173], Endometriumkarzinomzellen [181], Ovarialkarzinomzellen [182], Zellen des multiplen Myeloms [183], Medulloblastomzellen [175], Neuroblastomzellen [184], Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs [176], Rhabdomyosarkomzellen [7], Lungenkarzinomzellen [185] und neuroendokrine Tumorzellen [167].

In Kombination wirkt Perifosine mit MEK-162 gegen Lungenkarzinomzellen [186], mit Cisplatin gegen Ovarialkarzinomzellen [187] und Zellen des malignen Pleuramesothelioms [188], mit Paclitaxel ebenfalls gegen Ovarialkarzinomzellen [189], mit Curcumin gegen Kolonkarzinomzellen [190] mit UCN-01 gegen Prostatakarzinomzellen und gegen epitheliale Adenokarzinomzellen der Lunge [191] und mit Gemcitabine gegen Pankreaskarzinomzellen [192].

Perifosine erhöht außerdem die Radiosensitivität von Prostatakarzinomzellen [193] und von Plattenepithelkarzinomzellen [194] sowie die Chemosensibilität von Neuroblastomzellen [195].

In klinischen Studien wurde ebenfalls die Wirksamkeit von Perifosine gegen verschiedene Tumore nachgewiesen. In Phase-I-Studien zeigte sich eine vielversprechende Wirkung in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason bei

einem Rezidiv des multiplen Myeloms [196] und in Kombination mit Docetaxel beim epithelialen Ovarialkarzinom [197]. Ein Langzeitüberleben ohne Progression konnte mit Perifosine allein bei Patienten mit resistentem Neuroblastom erreicht werden [198].

Auch in Phase-II-Studien wurde Perifosine bereits erforscht. Hierbei konnte in einer Multicenter- und Doppelblindstudie eine Wirksamkeit von Perifosine in Kombination mit Capecitabine als Second- oder Third-line-Therapie im Vergleich zu Capecitabine allein bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom gezeigt werden [199]. Perifosine wirkte in einer Multicenterstudie in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason bei Patienten mit einem Rezidiv des multiplen Myeloms, die zuvor schon mit Bortezomib behandelt worden waren [200]. Auch beim Hodgkin-Lymphom hatte Perifosine, diesmal in Kombination mit Sorafenib, bei einer Phase-II-Studie eine vielversprechende Wirkung [201]. Perifosine allein wirkte bei Patienten mit Nierenzellkarzinom bei Progression nach VEGF-zielgerichteter Therapie [8] und bei Patienten mit fortgeschrittenem Weichteilsarkom [202].

Insgesamt zeigte sich bei den Studien eine moderate Toxizität von Perifosine, welche durch unterstützende Therapien gut in den Griff zu bekommen war. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehörten gastrointestinale Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Übelkeit [180, 199, 200, 203], Erbrechen [204] und Bauchschmerzen [205], Fatigue [196, 199, 200, 203, 204] und Hand-Fuß-Syndrom [199]. Weitere Nebenwirkungen waren Infektionen, Fieber, Schmerzen [180], Hyperglykämie, Hypophosphatämie, Arthralgie, hämatologische Nebenwirkungen wie Neutropenie, Thrombozytopenie, Leukopenie, Lymphopenie [196] und Anämie [8]. Bei der Anwendung von Perifosine sind auch muskuloskelettale Schmerzen, Rückenschmerzen, Appetitlosigkeit, Ödeme, Dyspnoe, Husten, Gicht, Sodbrennen, Lungenembolie, gastrointestinale Blutungen, Dehydrierung, Hyponatriämie, Hypomagnesiämie, Hyperurikämie, Synkope, allgemeine Schwäche, Benommenheitsgefühl, Obstipation, Schlaflosigkeit und erhöhte Kreatininwerte aufgetreten [8].

Angesichts der Ähnlichkeit zu den Eryptose verursachenden Medikamenten Miltefosine und Edelfosine sowie der Verursachung von Apoptose und Anämie als Nebenwirkung könnte Perifosine ebenfalls Eryptose verursachen. Sollte dies der Fall sein, ist zusätzlich von Interesse, welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind.

1.5. Fragestellung der Dissertation

Welche Effekte haben die proapoptischen potentiellen Chemotherapeutika Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine auf Erythrozyten? Verursachen sie Eryptose, den suizidalen Zelltod von Erythrozyten, und wenn ja, in welchen Konzentrationen und über welche Mechanismen?

2. Material und Methoden

Bei der angewendeten Methode handelt es sich um Versuche *in vitro* mit Erythrozyten von gesunden Probanden. Es wurde jeweils dasselbe Blut für die Kontrolle und für die Inkubation mit einem der drei zu testenden Medikamente in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Messung mittels verschiedener Antikörper. Die verwendeten Antikörper waren Annexin-V-FITC für die Phosphatidylserinexposition, Fluo3/AM für die Calciumkonzentration, DCFDA für den oxidativen Stress und spezifische Antikörper für den Ceramidgehalt der Membran. Das Vorwärtsstreulicht diente der Abschätzung der Zellgröße. Zusätzlich erfolgte zur Bestimmung der Calciumabhängigkeit die Inkubation in calciumfreier Ringerlösung und die Erythrozyten wurden mit Kinase-Inhibitoren inkubiert, um die Beteiligung von Kinasen aufzudecken. Die genauen Versuchsvorgänge werden in diesem Kapitel beleuchtet.

2.1. Material

2.1.1. Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden freundlicherweise von der Blutspendezentrale der Universität Tübingen in Form von frischem Li-Heparin-Vollblut zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt (184/2003 V) [206].

2.1.2. Durchflusszytometer

Verwendet wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur (BD, San José, USA) mit einem 488-nm-Laser, das mit der BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences) gesteuert wurde [206].

2.1.3. Software

Eingesetzt wurde die CellQuest Pro Software (BD Biosciences), Microsoft Excel zur Datenanalyse und GraphPad Prism (GraphPad) für statistische Tests [206].

2.1.4. Lösungen, Chemikalien, Antikörper und Farbstoffe

Ringerlösung: destilliertes Wasser, filtriert auf 0,22 µm mit (in mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, 32 N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5 Glucose und 1 CaCl₂, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4.

Manumycin A (Enzo Life Sciences, Lörrach), zur Lagerung bei -20°C und Weiterverarbeitung gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 10 mg/ml.

Licochalcone A (Sigma Aldrich, Hamburg), zur Lagerung bei -20°C und Weiterverarbeitung gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 10 mg/ml.

Perifosine (Sigma, Schnelldorf, Deutschland), zur Lagerung bei -20°C und Weiterverarbeitung gelöst in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 10 mg/ml.

Annexin-V-FITC (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland)

Annexin-V-Waschlösung: Ringerlösung mit 5 mM CaCl₂

Fluo3/AM (Biotium, Hayward, CA, USA)

Calciumfreie Ringerlösung: 1mM CaCl₂ der Ringerlösung ersetzt durch 1 mM Ca²⁺-Chelator EGTA

2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) (Sigma, Schnelldorf, Germany)

Anti-Ceramid-Antikörper (clone MID 15B4, Alexis, Grünberg, Deutschland)

Polyklonaler FITC-konjugierter Anti-Maus IgG- und IgM-spezifischer Antikörper von der Ziege (FITC conjugated goat anti-mouse IgG and IgM specific antibody) (Pharmlingen, Hamburg)

Phosphatpuffersalzlösung (PBS) (Sigma Aldrich, Hamburg) mit 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma Aldrich, Hamburg)

SB203580 (Tocris bioscience, Bristol, UK)

Staurosporine (Enzo Life Sciences, Lörrach)

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereitung der Erythrozyten

Um unspezifische Ergebnisse aufgrund der Lagerung zu vermeiden, wurde stets frisches Blut verwendet. Zur Isolation der Erythrozyten wurde 1 ml Vollblut mit 3 ml Ringerlösung gemischt und bei Raumtemperatur 20 min mit 120 g zentrifugiert. Der Überstand, der das Plasma mit den Thrombozyten und Leukozyten enthielt, wurde verworfen. Daraufhin wurden 300 µl vom Boden des Gefäßes entnommen, vorsichtig in ein 1,5-ml-Eppendorf-Cup pipettiert, bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und spätestens nach 24 h für den Versuchsansatz verwendet [206].

2.2.2. Versuchsansatz

Für den Versuchsansatz wurden zunächst Lösungen der auf Eryptose zu testenden potentiellen Medikamente Manumycin A, Licochalcone A und Perifosine in den angegebenen Konzentrationen in Ringerlösung hergestellt. Manumycin A und Licochalcone A wurden jeweils in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Dies ergibt eine Maximalkonzentration von DMSO in der Behandlungslösung von 0,1%. Als Kontrolle diente bei jedem Versuchsansatz Ringerlösung ohne Medikamentenzusatz. 1 ml dieser Lösung wurde mit 4 µl der vorbereiteten Erythrozyten in einem Eppendorf-Cup vorsichtig vermischt, was einem Hämatokrit von 0,4 % entspricht. Die Proben wurden beschriftet, bei 37 °C und 5 % CO₂ 24 bzw. 48 h inkubiert und vor der Weiterverwendung stets vorsichtig vermischt [206-209].

2.2.3. Bestimmung der Phosphatidylserinexposition

Annexin-V ist ein Protein, das calciumabhängig selektiv an Phosphatidylserin bindet. Durch Markierung von Annexin-V mit Fluorescein-Isothiocyanat (Annexin-V-FITC) können somit durchflusszytometrisch Zellen bestimmt werden, welche vermehrt Phosphatidylserin an der Membranaußenseite tragen [210, 211].

Nach Inkubation, wie im Kapitel „Versuchsansatz“ beschrieben, wurde jeweils 100 µl bei 1600 RPM 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. 100 µl einer Lösung aus Annexin-V-FITC und Annexin-V-Waschlösung im Verhältnis 1:200 wurden

hinzugefügt, mit Hilfe einer Pipette vermischt und bei 37 °C und 5 % CO₂ 20 min lichtgeschützt inkubiert und somit gefärbt.

Dann erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Annexin-V-Fluoreszenzintensität. Mit Hilfe der CellQuest Pro Software wurde ein Diagramm erstellt, das auf der y-Achse die Anzahl der Zellen und auf der x-Achse die Annexin-V-Fluoreszenzintensität zeigte. Um Erythrozyten mit hoher Annexin-V-Bindung und somit hoher Phosphatidylserinexposition zu identifizieren, wurde ein Marker verwendet und der prozentuale Anteil der Erythrozyten mit hoher Annexin-V-Bindung angegeben. Dabei wurde stets derselbe Marker für die Kontrollen und die Proben verwendet. Er wurde so gesetzt, dass er bei den Kontrollen bis ca. 2 % der Zellen enthielt [206].

2.2.4. Quantifizierung der Zellgröße

Das Vorwärtsstreulicht, welches bei Messungen des Durchflusszytometers bestimmt wird, korreliert mit der Größe der Partikel bzw. Zellen, die gemessen werden. Daher ist es möglich, die Zellgröße damit abzuschätzen [212]. Die Messungen erfolgten parallel zu denen der Annexin-V-Fluoreszenzintensität und wurden in einem Diagramm mit Vorwärtsstreulicht auf der x-Achse und Zellanzahl auf der y-Achse graphisch dargestellt. Das Vorwärtsstreulicht hat eine willkürliche Einheit, wobei die Kontrolle auf ca. 500 eingestellt wurde. Zellschwellung äußerte sich durch Erhöhung, Zellschrumpfung durch Erniedrigung der geometrischen Mittelwerte. Da teilweise sowohl Zellschwellung als auch Zellschrumpfung beobachtet werden konnte, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil der besonders kleinen (< 200) und besonders großen Zellen (> 800) durch Setzen von Markern bestimmt [206].

2.2.5. Messung der Hämolyse

Die Hämolyse wurde bestimmt, um festzustellen, inwiefern Erythrozyten aufgrund der eingesetzten Medikamente hierdurch zugrunde gingen. Die Proben wurden nach der Inkubation 20 min bei 1600 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände zur Messung verwendet. Als Maß für die Hämolyse wurde die Hämoglobinkonzentration photometrisch bei 405 nm gemessen. Zur Umrechnung der Absorptionswerte in prozentuale Hämolysewerte wurde eine Standardkurve erstellt. Die Erythrozyten wurden in destilliertem Wasser lysiert und wie der Versuchsansatz inkubiert und zentrifugiert.

Der Überstand wurde als 100 %, destilliertes Wasser als 0 % Hämolyse festgelegt. Außerdem wurden 2,5-, 5-, 7,5-, 10- und 20-prozentige Lösungen aus Überstand und destilliertem Wasser hergestellt. Die gemessenen Werte wurden in ein Diagramm in Excel eingefügt und eine lineare Trendlinie daraus gebildet. In die Formel der Trendlinie wurden die gemessenen Werte der Blutproben eingesetzt; so konnte auf die prozentuale Hämolyse geschlossen werden [207-209].

2.2.6. Quantifizierung des intrazellulären Calciums

Fluo3 beginnt durch Bindung an Calciumionen zu fluoreszieren, weswegen es sich mit Hilfe eines Durchflusszytometers nachweisen lässt. Da Fluo-3 die Zellmembran nicht passieren kann, wird es als Acetoxymethylester-Derivat (Fluo3/AM) eingesetzt. Dieses fluoresziert nicht nach Bindung mit Ca^{2+} , es wird in die Zelle aufgenommen und dort durch unspezifische Esterasen in Fluo3 gespalten, welches wiederum durch Bindung an Calciumionen fluoresziert. Dadurch wird erreicht, dass lediglich intrazelluläres Ca^{2+} zu einem Fluoreszenzsignal führt [206-209].

Nach der Inkubation wurden jeweils 100 μl Zelllösung mit 1600 RPM 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Erythrozyten wurden 100 μl einer Lösung aus 5 μM Fluo3/AM und Annexin-V-Waschlösung gegeben, vorsichtig vermischt und lichtgeschützt bei 37 °C und 5 % CO_2 30 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm. Die Ergebnisse wurden in einem Histogramm mit der Anzahl der Zellen auf der y-Achse und der Fluo3-Fluoreszenzintensität auf der x-Achse dargestellt. Daraus wurde der geometrische Mittelwert bestimmt und jeweils die Kontrolle mit den Proben verglichen [206-209].

Inwiefern extrazelluläres Calcium für die Eryptose aufgrund der getesteten Medikamente notwendig ist, wurde überprüft, indem im Versuchsansatz Erythrozyten in Ringerlösung mit und ohne Calcium inkubiert wurden. Daraufhin wurden jeweils wie oben beschrieben die Annexin-V-Bindung und das Vorwärtsstreulicht bestimmt und die Proben, welche ohne Calcium inkubiert wurden, mit denen, die Calcium in der Ringerlösung enthielten, verglichen. Für die Messung der Annexin-V-Bindung war es vonnöten, während der 20-minütigen Inkubation die calciumhaltige Annexin-V-Waschlösung zu verwenden.

Weil die Proben nur kurz dem Calcium ausgesetzt waren, ist nicht zu erwarten, dass sich die Phosphatidylserinexposition hierdurch signifikant ändert [206-209].

2.2.7. Bestimmung des oxidativen Stresses

Da oxidativer Stress ein Mechanismus für die Entstehung von Eryptose sein kann, wurde er mit Hilfe von 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) bestimmt. DCFDA ist unter normalen Umständen nicht fluoreszierend. Durch die Anwesenheit von Sauerstoffradikalen wird es jedoch oxidiert und fluoresziert grün [206].

Nach der Inkubation wurden jeweils 200 µl Zelllösung bei 1600 RPM und Raumtemperatur 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Erythrozyten wurden 200 µl einer Lösung aus 10 µM DCFDA in Ringerlösung gegeben, vorsichtig vermischt und lichtgeschützt 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten gewaschen. Hierfür wurden sie bei 1600 RPM und Raumtemperatur 4 min lang zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, 200 µl Ringerlösung hinzugegeben und vorsichtig vermischt.

Es erfolgte die durchflusszytometrische Messung der DCFDA-Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm. Diese wurde mit geometrischen Mittelwerten quantifiziert, und es erfolgte der Vergleich zwischen Kontrolle und Probe. Zur Visualisierung wurden Histogramme erstellt, welche auf der y-Achse die Anzahl der Zellen und auf der x-Achse die DCFDA-Fluoreszenz anzeigten [207-209].

2.2.8. Bestimmung des Ceramidgehalts

Ceramid ist ein weiterer wichtiger Stimulator für Eryptose, das mit spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch bestimmt werden kann [206, 213].

Zur Messung des Ceramidgehalts der Erythrozytenmembran wurden nach der Inkubation zunächst jeweils 100 µl Zelllösung bei 1600 RPM und Raumtemperatur 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden jeweils 100 µl der ersten Antikörperlösung hinzugegeben. Diese bestand aus 1 µg/ml Anti-Ceramid-Antikörper (clone MID 15B4), der in Phosphatpuffersalzlösung (PBS) mit 0,1%

Rinderserumalbumin (BSA) im Verhältnis 1:10 gelöst war. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Proben wurden gewaschen, indem sie erneut bei 1600 RPM und Raumtemperatur 4 min zentrifugiert wurden, der Überstand verworfen wurde und jeweils 200 µl PBS-BSA hinzugegeben wurden. Nach Vermischen, erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen und Verwerfen des Überstandes wurde die zweite Antikörperlösung hinzugegeben. Diese bestand aus polyklonalem FITC-konjugiertem Anti-Maus-IgG- und IgM-spezifischem Antikörper der Ziege und PBS-BSA im Verhältnis 1:50. Dieser Antikörper bindet an den Anti-Ceramid-Antikörper, fluoresziert daraufhin und ermöglicht eine Messung mit dem Durchflusszytometer. Nach Hinzugabe der zweiten Antikörperlösung erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Teil des Antikörpers, der nicht gebunden hatte, wurde durch erneutes Waschen mit PBS-BSA entfernt.

Dann wurden die Proben durchflusszytometrisch bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen und der geometrische Mittelwert der Ceramid-abhängigen Fluoreszenz bestimmt. Die Kontrolle wurde mit den Proben verglichen und die Ergebnisse wurden durch Histogramme visualisiert, bei denen die Anzahl der Zellen auf der y-Achse und die Ceramid-abhängige Fluoreszenz auf der x-Achse aufgetragen wurde [207-209, 213].

2.2.9. Bestimmung der Beteiligung von Kinasen

SB203580 ist ein Inhibitor der p38-Kinase und Staurosporine ein Inhibitor der Proteinkinase C. Beide Kinasen können bei der Entstehung von Eryptose involviert sein. Dies kann untersucht werden, indem getestet wird, ob die Eryptose durch die Kinase-Inhibitoren gehemmt werden kann [206]. Dazu wurden im Versuchsansatz zusätzlich zu den Medikamenten in den angegebenen Konzentrationen einer Versuchsreihe nichts, einer Versuchsreihe SB203580 in einer Konzentration von 2 µM und der dritten Versuchsreihe Staurosporine in einer Konzentration von 1 µM hinzugegeben. Nach der Inkubation erfolgte die Messung der Annexin-V-Bindung, wie im Kapitel „Bestimmung der Phosphatidylserinexposition“ beschrieben. Die Ergebnisse des Versuchsansatzes ohne Kinase-Inhibitor wurden mit denen nach Zugabe von SB201580 bzw. Staurosporine verglichen [206-209].

2.3. Statistik

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte plus/minus Standardfehler angegeben. Wie in den Diagrammlegenden angegeben, wurde je nach Experiment für die statistischen Analysen T-Test oder ANOVA mit Tukey's Test als Nachtest verwendet. N gibt die Anzahl der von verschiedenen gesunden Probanden stammenden Erythrozytenproben an. Diese reagieren unterschiedlich empfindlich auf Auslöser der Eryptose, weswegen dieselben Proben für die Kontrolle und die experimentellen Bedingungen verwendet wurden [207-209].

3. Ergebnisse

3.1. Licochalcone A

3.1.1. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche

Annexin-V ist ein Antikörper, der an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche bindet und dadurch ein Fluoreszenzsignal aussendet, welches mit dem Durchflusszytometer gemessen werden kann. Da sich bei Zellen, die eryptotisch zugrunde gehen, vermehrt Phosphatidylserin an der Zelloberfläche befindet, können diese Zellen identifiziert werden. Da auch gesunde Zellen zu einem geringen Anteil Phosphatidylserin an der Zelloberfläche haben, wurde entsprechend ein Marker gesetzt, der diejenigen Zellen einschließt, die eine besonders hohe Bindung von Annexin-V und somit eine große Menge an Phosphatidylserin an der Zelloberfläche tragen und sich daher in Eryptose befinden.

Die Erythrozyten wurden 24 h mit Licochalcone A in Konzentrationen von 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 µg/ml inkubiert; jeweils wurde die Prozentzahl der Erythrozyten mit einer hohen Annexin-V-Bindung bestimmt. Abbildung 1A zeigt ein Histogramm mit Gegenüberstellung der Kontrolle (graue Fläche) und Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml. Es ist zu erkennen, dass sich unter Einwirkung von Licochalcone A die Anzahl derjenigen Zellen erhöht, die eine hohe Annexin-V-Bindung aufweisen.

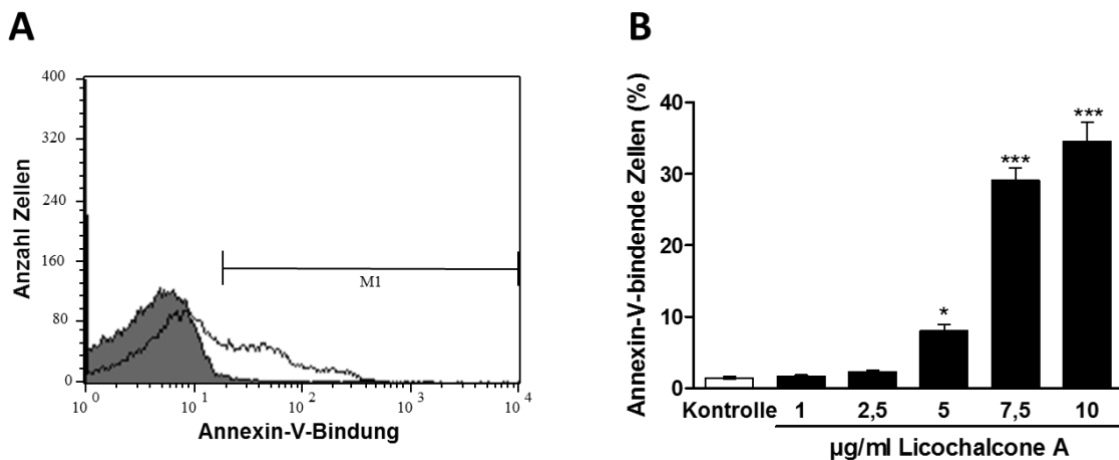


Abbildung 1: Effekt von Licochalcone A auf die Annexin-V-Bindung [209]

A: Histogramm der Annexin-V-bindenden Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) bzw. Ringerlösung und 10µg/ml Licochalcone (schwarze Linie). Der Marker gibt den Bereich der eryptotischen Zellen an.

*B: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 8) der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach Inkubation für 24 Stunden mit Ringerlösung (Kontrolle, weißer Balken), bzw. Licochalcone A in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken). *(p < 0,05), ***(p < 0,001) geben einen signifikanten Unterschied von der Abwesenheit von Licochalcone A an (ANOVA).*

Es wurden 8 Proben mit allen Konzentrationen gemessen (n = 8), die Ergebnisse werden in Abbildung 2B gezeigt. Bei einer Licochalcone-A-Konzentration von 5 µg/ml erhöhte sich die Prozentzahl der Annexin-V-bindenden Zellen auf im Mittel 8,1 % bei einem Konfidenzintervall von 5,9 bis 10,3 % der Erythrozyten und erreicht damit statistische Signifikanz. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml Licochalcone A erhöhte sich diese Prozentzahl auf im Mittel 34,6 % bei einem Konfidenzintervall von 28,1 bis 41,0 % der Zellen. Dies bedeutet, dass mehr als ein Viertel der Erythrozyten gesunder Probanden bei einer Licochalcone-A-Konzentration von 10 µg/ml nach 24 Stunden Annexin-V binden.

Insgesamt führt eine 24-stündige Inkubation mit Licochalcone A in einer Konzentration von 5–10 µg/ml somit zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an Erythrozyten, welche Phosphatidylserin an der Zelloberfläche tragen.

3.1.2. Zellvolumen

Um sicher von Eryptose ausgehen zu können, muss ein weiteres Merkmal bestimmt werden, nämlich die Schrumpfung von Erythrozyten. Mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts des Durchflusszytometers lässt sich die Größe von Zellen abschätzen und vergleichen. Dies geschieht ohne Einheit mit geometrischen Mittelwerten. Daher wurde das Vorwärtsstreulicht nach einer 24-stündigen Exposition der Zellen ohne oder mit Licochalcone A in Konzentration von 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 µg/ml gemessen.

Abbildung 2A zeigt ein Histogramm des Vorwärtsstreulichts der Kontrolle (graue Fläche) im Vergleich zu Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml. Hier ist erkennbar, dass sich sowohl die Anzahl der sehr kleinen Zellen als auch die Anzahl der großen Zellen erhöht hat; es findet also Zellschrumpfung bzw. Bildung von kleinen „membrane blebs“ gleichzeitig mit Zellschwellung statt.

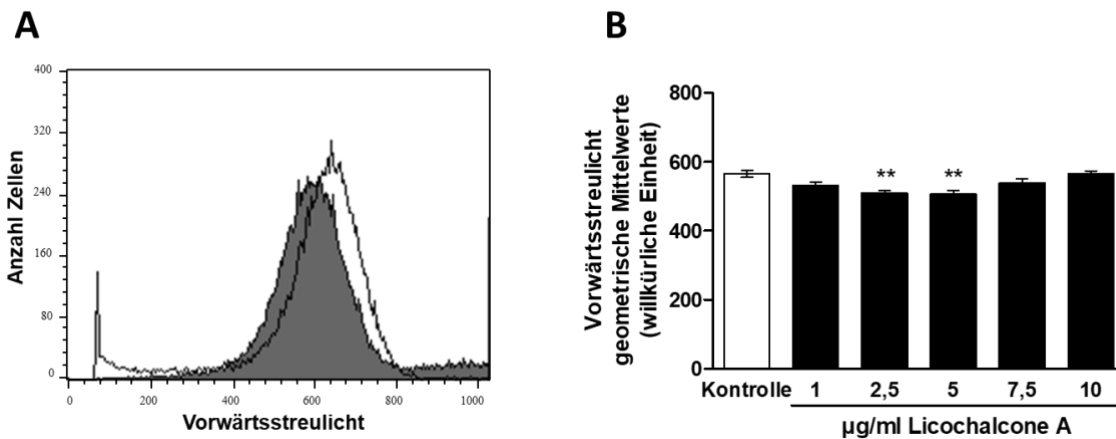


Abbildung 2: Einfluss von Licochalcone A auf das Vorwärtsstreulicht [209]

A: Histogramm des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation mit Ringerlösung (graue Fläche) bzw. mit Ringerlösung und Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie).

*B: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 8) des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter) von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (Kontrolle) bzw. mit Licochalcone A in den angegebenen Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml. **($p < 0,01$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone an (ANOVA).*

Bei Inkubation mit 2,5 und 5 µg/ml Licochalcone A verringerte sich das Vorwärtsstreulicht insgesamt signifikant. Bei niedrigeren (1 µg/ml) oder höheren (7,5 und 10 µg/ml) Konzentrationen veränderte sich das Zellvolumen unwesentlich, was Abbildung 2B verdeutlicht.

Somit bewirkt die Inkubation mit Licochalcone A sowohl eine Zellschwellung als auch eine Zellschrumpfung.

3.1.3. Hämolyse

Ein weiterer Weg, auf dem Erythrozyten zugrunde gehen können, ist die Hämolyse, welche durch Zellschwellung, Verlust der Integrität der Zellmembran und damit Austritt von Hämoglobin gekennzeichnet ist. Da sich im Vorwärtsstreulicht auch schwellende Zellen gezeigt haben, soll geklärt werden, inwiefern Licochalcone A Hämolyse auslöst. Hierzu wurde nach einer 24-stündigen Inkubation der Erythrozyten in den bekannten Konzentrationen der Anteil hämolysierter Zellen abgeschätzt, indem die Hämoglobinkonzentration im Überstand photometrisch bestimmt wurde.

Licochalcone A erhöht bei einer Konzentration von 7,5 µg/ml den Anteil hämolytischer Zellen auf im Mittel 15,9 % bei einem Konfidenzintervall von 12,4 bis 19,4 % der Erythrozyten. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml erhöht sich dieser Anteil auf im Mittel 22,0 % mit einem Konfidenzintervall von 11,0 bis 33,0 % der Zellen. Diese Daten stellt Abbildung 3 dar. Somit gehen mindestens 11 % der Erythrozyten durch Licochalcone A an Hämolyse zugrunde. Licochalcone A verursacht daher sowohl Eryptose als auch Hämolyse, wobei erstere überwiegt.

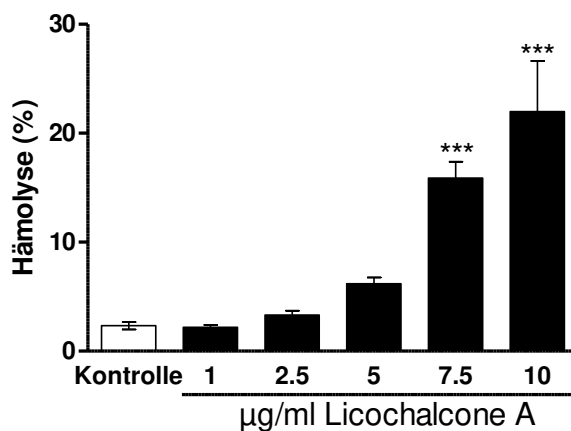


Abbildung 3: Einfluss von Licochalcone A auf die Hämolyse

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der Prozentzahl hämolyzierter Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) und mit Licochalcone A in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml. ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone A an (ANOVA).

3.1.4. Calciumkonzentration

3.1.4.1. Fluo3-Fluoreszenz

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, welche mithilfe der Fluo3-Fluoreszenz gemessen werden kann, stellt einen wichtigen Mechanismus für die Auslösung von Eryptose dar. Um herauszufinden, ob dieser Mechanismus bei der Eryptose durch Licochalcone A eine Rolle spielt, wurde daher die Fluo3-Fluoreszenz bestimmt. Auch hier wurden die bekannten Konzentrationen und eine Inkubation von 24 h eingesetzt.

In Abb. 4A ist ein Histogramm der Fluo3-Fluoreszenz der Kontrolle (graue Fläche) und der Probe mit Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml zu sehen. Es zeigen sich nach Inkubation mit Licochalcone A vermehrt Zellen mit hoher Fluo3-Fluoreszenz.

Wie in Abb. 4B gezeigt, erhöht sich die Fluo3-Fluoreszenz nach einer 24-stündigen Inkubation mit Licochalcone A ab einer Konzentration von 7,5 µg/ml signifikant. Somit verursacht Licochalcone A eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration.

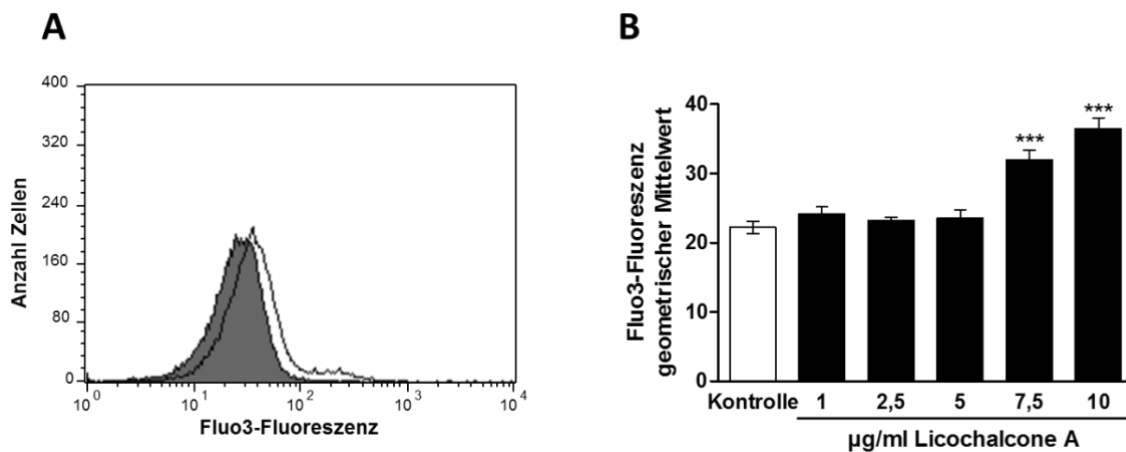


Abbildung 4: Einfluss von Licochalcone A auf die Fluo3-Fluoreszenz [209]

A: Histogramm der Fluo3-Fluoreszenz von Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) bzw. in Ringerlösung und Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie).

*B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 8$) der Fluo3-Fluoreszenz (willkürliche Einheiten) von Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung (Kontrolle, weißer Balken) bzw. zusätzlich Licochalcone A in den angegebenen Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken). ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone A an (ANOVA).*

3.1.4.2. Inkubation in calciumfreier Ringerlösung

Um festzustellen, ob für die Phosphatidylserintranslokation an die Zelloberfläche und die Zellschrumpfung durch Licochalcone A Calcium in der extrazellulären Lösung vonnöten ist, wurden die Erythrozyten 24 h mit oder ohne 5 bzw. 10 µg/ml Licochalcone in der Gegenwart oder nominalen Abwesenheit von extrazellulärem Calcium inkubiert. Daraufhin wurden die Annexin-V-Bindung und das Vorwärtsstreulicht gemessen.

Wie in Abbildung 5 illustriert, verändert sich die Annexin-V-Bindung durch Licochalcone A nicht signifikant, wenn extrazelluläres Calcium fehlt. Lediglich die Signifikanz der Kontrolle zu 5 µg/ml Licochalcone A geht verloren. Insgesamt ist also die Licochalcone-A-abhängige Translokation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche von der Inkubation mit calciumfreier Lösung unbeeinflusst.

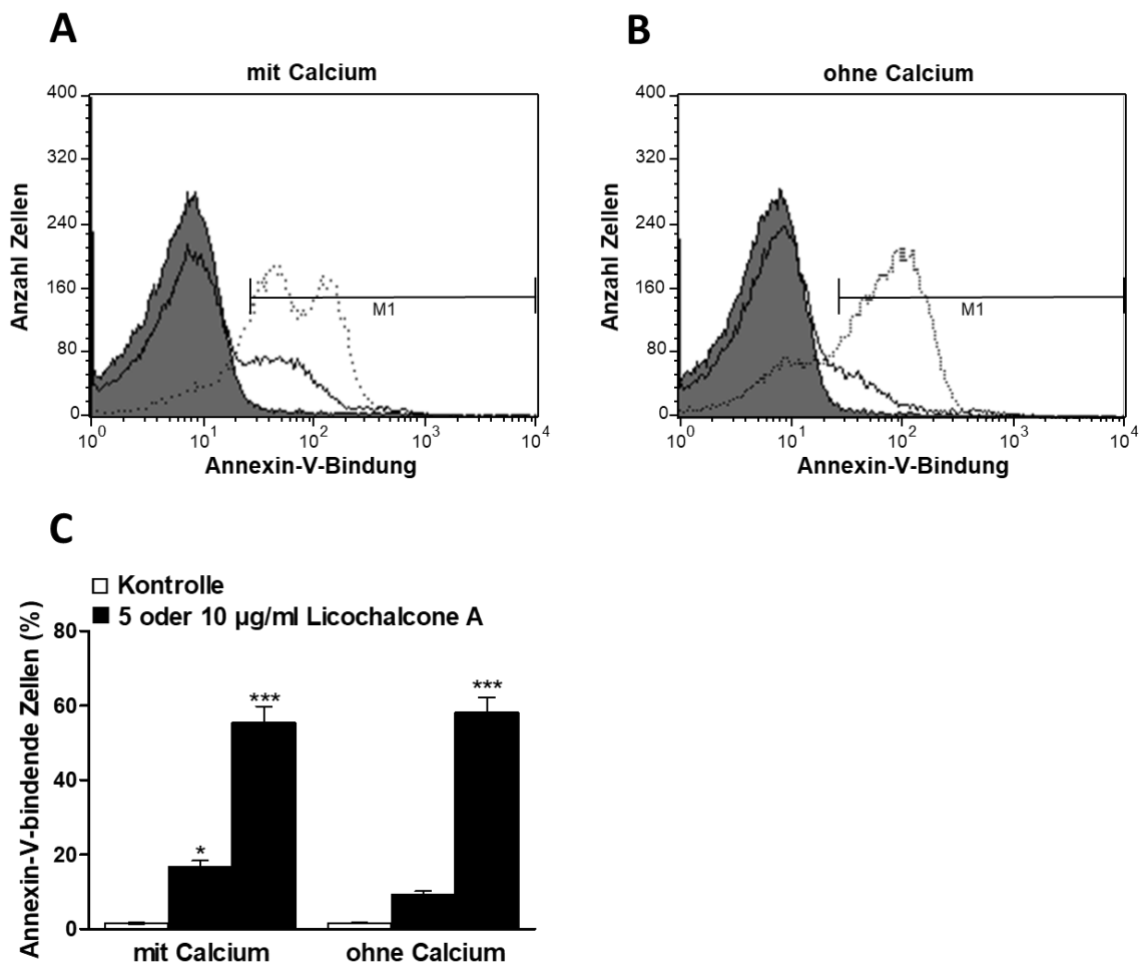


Abbildung 5: Calciuminsensitivität der Annexin-V-Bindung durch Licochalcone A [209]

A, B: Histogramme der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche), bzw. zusätzlich Licochalcone A in Konzentrationen von 5 (schwarze Linie) und 10 µg/ml (gepunktete Linie) in Anwesenheit (A, mit Calcium) bzw. nomineller Abwesenheit (B, ohne Calcium) von extrazellulärem Calcium.

C: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 8) der Annexin-V-bindenden Erythrozyten nach einer 24-stündigen Behandlung mit Ringerlösung ohne (weiße Balken) bzw. mit Licochalcone A in Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml (schwarze Balken) in der Anwesenheit (linke Balken, mit Calcium) bzw. nominellen Abwesenheit (rechte Balken, ohne Calcium) von

Calcium. $*(p < 0,05)$ und $***(p < 0,001)$ geben einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone an (ANOVA).

Auch bei dieser Messreihe wurde die Zellgröße bestimmt. Wegen der Abwesenheit von extrazellulärem Calcium verringerte sich die Menge der geschrumpften Zellen in Abb. 6B im Vergleich zu Abb. 6A etwas, allerdings erreichte dieser Effekt keine statistische Signifikanz (Abbildung 6C).

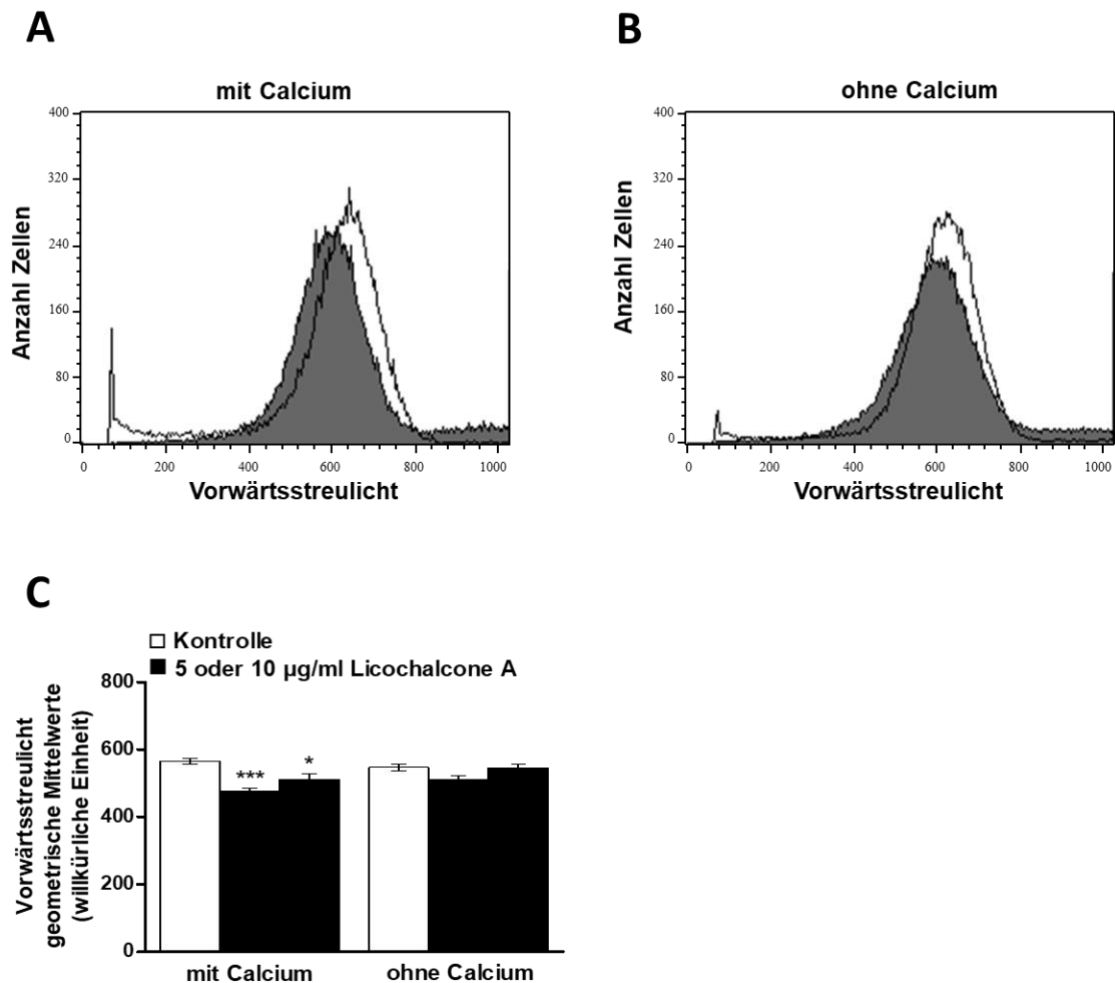


Abbildung 6: Einfluss der Entfernung von extrazellulärem Calcium auf die durch Licochalcone A hervorgerufenen Änderungen des Zellvolumens [209]

A, B: Histogramme des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation nur mit Ringerlösung (graue Fläche) bzw. zusätzlich Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie) in der Anwesenheit (A, mit Calcium), bzw. nominellen Abwesenheit von extrazellulärem Calcium (B, ohne Calcium).

C: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 8$) des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weiße Balken) und mit Licochalcone A in Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml (schwarze Balken) in Anwesenheit (linke Balken, mit

Calcium) und nomineller Abwesenheit (rechte Balken, ohne Calcium) von extrazellulärem Calcium. $*(p < 0,05)$, $***(p < 0,001)$ geben einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone A an (ANOVA).

Licochalcone A verursacht ohne extrazelluläres Calcium eine unveränderte Translokation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, allerdings kommt es zu einer etwas geringeren Zellschrumpfung. Dieser Effekt erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.

3.1.4.3. Hämolyse ohne extrazelluläres Calcium

Da es nach der Inkubation von Erythrozyten mit Licochalcone A in calciumfreier Lösung Zellschwellung gibt, stellt sich die Frage, ob Calcium auf die Hämolyse einen Einfluss hat. Wie Abbildung 7 zeigt, erhöht eine 24-stündige Inkubation mit Licochalcone A den Prozentsatz hämolysierter Erythrozyten, was bei 10 $\mu\text{g/ml}$ statistische Signifikanz erreicht. Die Abwesenheit von extrazellulärem Calcium vergrößert den stimulierenden Effekt von 10 $\mu\text{g/ml}$ Licochalcone auf die Hämolyse.

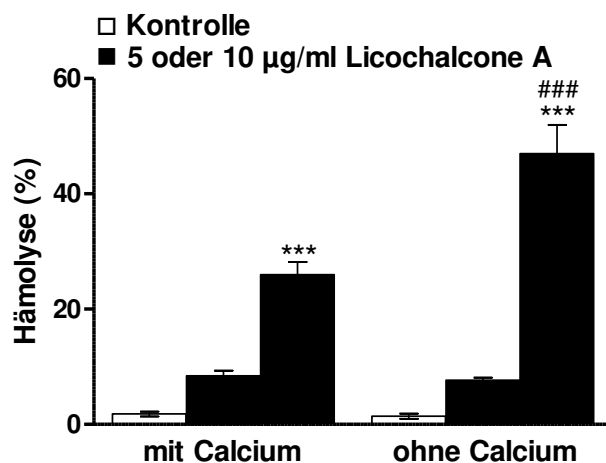


Abbildung 7: Einfluss der Entfernung von extrazellulärem Calcium auf die von Licochalcone A hervorgerufene Hämolyse [209]

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 4$) der hämolysierten Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation mit Ringerlösung (weiße Balken), bzw. zusätzlich mit Licochalcone A in Konzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ (schwarze Balken) in der Anwesenheit (linke Balken, $+\text{Ca}^{2+}$) bzw. nominellen Abwesenheit (rechte Balken, $-\text{Ca}^{2+}$) von extrazellulärem Calcium. $***(p < 0,001)$ bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone A, $###(p < 0,001)$ einen signifikanten Unterschied zur Anwesenheit von extrazellulärem Calcium (ANOVA).

3.1.5. Oxidativer Stress

Der oxidative Stress wurde mit dem Antikörper DCFDA abgeschätzt, da auch dieser Eryptose auslösen kann. Wie in Abbildung 8 zu sehen, verringerte sich die DCFDA-Fluoreszenz bei Licochalcone A in einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant, bei einer Konzentration von 10 µg/ml war sie in etwa auf Höhe des Ausgangswertes. Daher kann man davon ausgehen, dass Licochalcone A in einer Konzentration von 5 µg/ml oxidativem Stress entgegenwirkt und in der höheren Konzentration von 10 µg/ml keinen Einfluss mehr darauf hat. Somit ist vermehrter oxidativer Stress kein Mechanismus bei der Eryptose durch Licochalcone A.

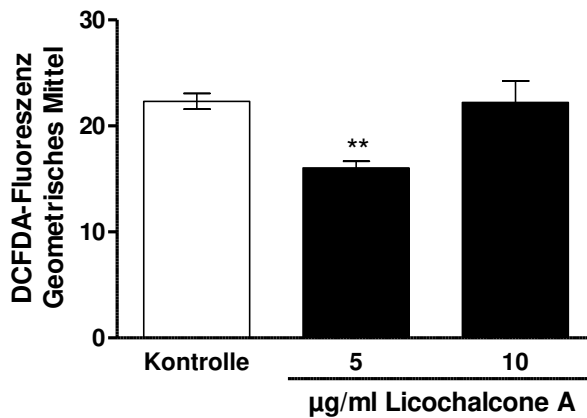


Abbildung 8: Einfluss von Licochalcone A auf oxidativen Stress

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der DCFDA-Fluoreszenz (willkürliche Einheiten) nach einer 24-stündigen Inkubation von Erythrozyten in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) und mit Licochalcone A in Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml (schwarze Balken) $** (p < 0,01)$ gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone A an (ANOVA).

3.1.6. Ceramid

Ein weiterer Auslöser der Eryptose ist Ceramid. Zur Bestimmung der Ceramidanreicherung an der Erythrozytenoberfläche wurden spezifische Antikörper verwendet. Abbildung 9A zeigt ein Histogramm der ceramidabhängigen Fluoreszenz der Kontrolle (graue Fläche) im Vergleich zu Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml. Abbildung 9B zeigt, dass Licochalcone A ab einer Konzentration von 10 µg/ml

den Ceramidgehalt der Membran signifikant erhöht. Somit ist die Ceramiderhöhung an der Erytrose durch Licochalcone A beteiligt.

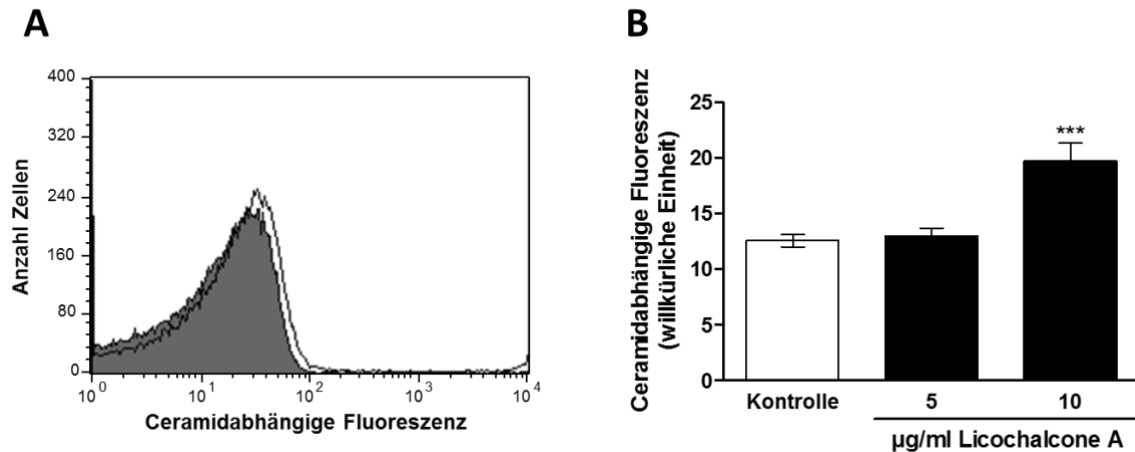


Abbildung 9: Einfluss von Licochalcone A auf den Ceramidgehalt der Zelloberfläche [209]

A: Histogramm der ceramidabhängigen Fluoreszenz von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) und zusätzlich Licochalcone A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie).

*B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 8$) der ceramidabhängigen Fluoreszenz (willkürliche Einheiten) an der Zelloberfläche von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) und mit Licochalcone A in Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml (schwarze Balken). ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Licochalcone A an (ANOVA).*

3.1.7. Zusammenfassung der Ergebnisse zu Licochalcone A

Insgesamt verursacht Licochalcone A nach 24-stündiger Inkubation einen signifikanten Anstieg Annexin-V-bindender Erythrozyten ($> 5 \mu\text{g/ml}$), Zellschrumpfung ($2,5\text{--}5 \mu\text{g/ml}$) und Hämolyse ($> 7,5 \mu\text{g/ml}$). Zudem führt es zu einer erhöhten Fluo3-Fluoreszenz ($> 7,5 \mu\text{g/ml}$) und zu einer erhöhten ceramidabhängigen Fluoreszenz ($10 \mu\text{g/ml}$). Durch Inkubation in calciumfreier Lösung wurde die Annexin-V-Bindung nicht signifikant beeinflusst, aber die Hämolyse signifikant erhöht ($10 \mu\text{g/ml}$). Der oxidative Stress wurde von Licochalcone A signifikant gehemmt ($5 \mu\text{g/ml}$).

3.2. Manumycin A

Da Manumycin A Apoptose von Tumorzellen verursacht, könnte es auch Eryptose begünstigen, was mit den folgenden Experimenten überprüft werden sollte. Hierzu wurden Erythrozyten für 48 Stunden in Ringerlösung ohne bzw. mit Manumycin A in Konzentrationen zwischen 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert und daraufhin die Messungen durchgeführt.

3.2.1. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche

Wie bei Licochalcone A wurde zur Abschätzung von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche der Antikörper Annexin-V verwendet und die Fluoreszenz mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Es wurde wieder ein Marker gesetzt, der diejenigen Zellen einschloss, welche eine besonders hohe Annexin-V-Bindung aufwiesen.

Da Manumycin A eine Eigenfluoreszenz aussendet, musste vor den Versuchen überprüft werden, ob jene die Ergebnisse verändert und somit verfälscht. Hierzu wurden jeweils Proben mit und ohne Manumycin A ohne Inkubation mit Annexin-V gemessen. Wie in Abbildung 10 gezeigt, fällt die Eigenfluoreszenz erst bei einer Manumycin-A-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in den Bereich des Markers und beträgt auch hier im Mittel nur 0,8 %, was eine sehr geringe Verfälschung des Ergebnisses zur Folge hat. Somit kann die Messmethode angewendet werden.

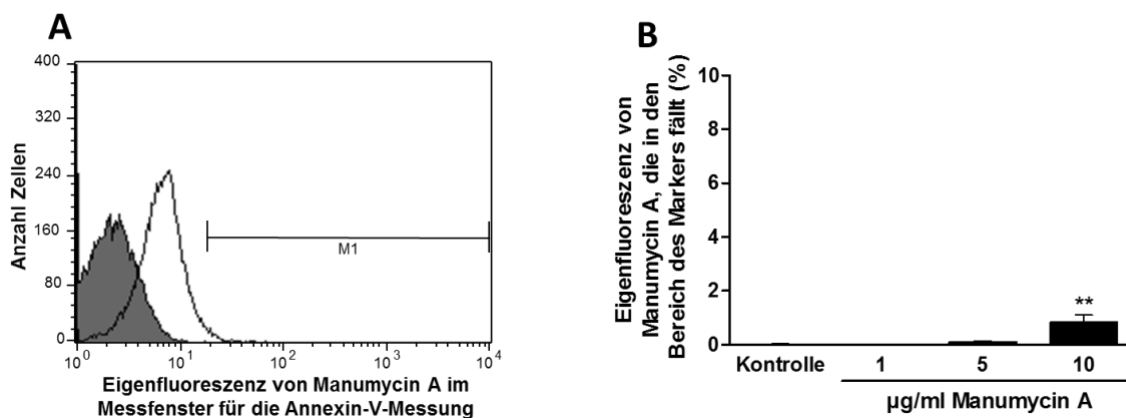


Abbildung 10: Eigenfluoreszenz von Manumycin A ohne Einfluss auf die Messung der Annexin-V-Bindung

A: Histogramm der Eigenfluoreszenz von Manumycin A im Messfenster für die Messung der Annexin-V-Bindung nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie).

B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 4$) der Prozentzahl an Eigenfluoreszenz von Manumycin A, die in den Bereich des Markers fällt nach einer 48-stündigen Inkubation der Erythrozyten in Ringerlösung ohne (Kontrolle) und mit Manumycin A in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken). $** (p < 0.01)$ gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Manumycin A an (ANOVA)

Nach 48-stündiger Inkubation der Erythrozyten mit Manumycin A in Konzentrationen von 1, 5 und 10 µg/ml wurde der Prozentsatz derjenigen Erythrozyten bestimmt, die eine besonders hohe Menge an Annexin-V-Bindung aufwiesen. Abbildung 11A zeigt ein Histogramm mit Gegenüberstellung der Kontrolle (graue Fläche) und Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml. Es ist zu erkennen, dass sich unter Einwirkung von Manumycin A die Anzahl derjenigen Zellen erhöht, die im Bereich des Markers liegen und somit eine hohe Annexin-V-Bindung aufweisen.

Bei einer Manumycin-A-Konzentration von 5 µg/ml erhöhte sich die Prozentzahl Annexin-V-bindender Zellen auf im Mittel 10,0 % bei einem Konfidenzintervall von 6,5 bis 13,4 % der Erythrozyten und erreicht damit statistische Signifikanz. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml Manumycin A erhöhte sich diese Prozentzahl auf im Mittel 26,6 % bei einem Konfidenzintervall von 20,6 bis 32,6 % der Erythrozyten. Dies bedeutet, dass mindestens ein Fünftel der Erythrozyten gesunder Probanden nach Inkubation mit Manumycin A Annexin-V an der Zelloberfläche tragen.

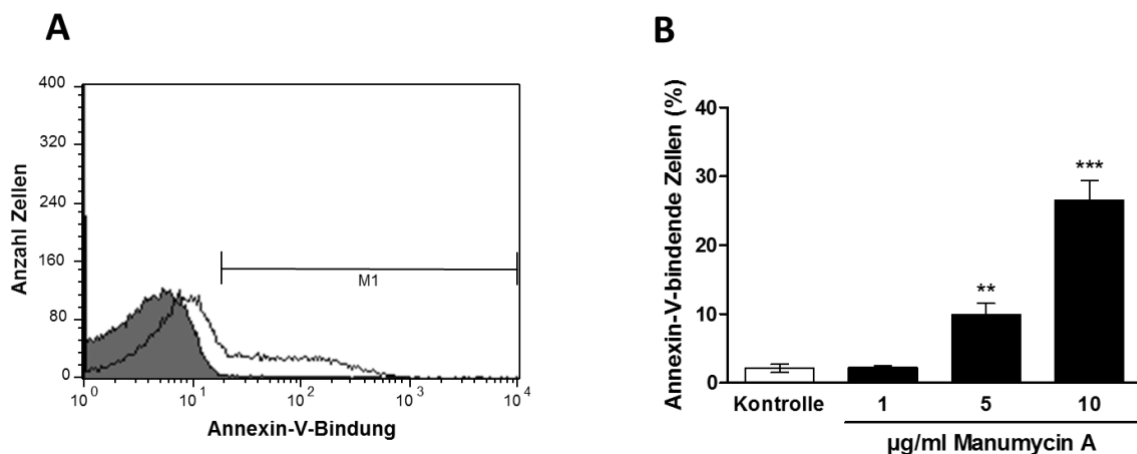


Abbildung 11: Effekt von Manumycin A auf die Annexin-V-Bindung [208]

A: Histogramm der Annexin-V-bindenden Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) bzw. Ringerlösung und 10 µg/ml Manumycin A (schwarze Linie). Der Marker gibt den Bereich der eryptotischen Zellen an.

*B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 16$) der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach Inkubation für 48 Stunden mit Ringerlösung (Kontrolle, weißer Balken), bzw. Manumycin A in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken). $** (p < 0,01)$, $*** (p < 0,001)$ geben einen signifikanten Unterschied von der Abwesenheit von Manumycin A an (ANOVA).*

Durch die Inkubation von Erythrozyten mit Manumycin A in Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml für 48 Stunden erhöht sich die Anzahl derjenigen Zellen, die vermehrt Phosphatidylserin an ihrer Zelloberfläche tragen, signifikant.

3.2.2. Zellvolumen

Da die Zellschrumpfung für die Eryptose charakteristisch ist, wurde das Zellvolumen mithilfe des Vorwärtsstreulichts des Durchflusszytometers abgeschätzt und verglichen. Das Vorwärtsstreulicht der Zellen wurde nach 48 Stunden ohne und mit Inkubation mit Manumycin A in Konzentrationen von 1, 5 und 10 µg/ml gemessen.

Abbildung 12A ist ein Histogramm des Vorwärtsstreulichts der Kontrolle (graue Fläche) im Vergleich zu Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml. Man sieht, dass sich sowohl die Anzahl der sehr kleinen Zellen als auch die Anzahl der großen Zellen erhöht hat und somit Zellschrumpfung bzw. Bildung von kleinen „membrane blebs“ und Zellschwellung gleichzeitig stattfinden. Wie in Abbildung 12B dargestellt ist, verringert sich ab einer Konzentration von 5 µg/ml das Vorwärtsstreulicht insgesamt signifikant.

Da sich im Histogramm sowohl eine Zellschwellung als auch eine Zellschrumpfung zeigte, wurde die Prozentzahl der geschrumpften und geschwollenen Zellen bestimmt. Hierzu wurde als Annäherung jeweils der Anteil der Zellen kleiner als 200 und größer als 800 der beim Vorwärtsstreulicht eingesetzten willkürlichen Einheiten bestimmt.

Durch die Behandlung der Erythrozyten mit Manumycin A stieg der Anteil der geschrumpften Erythrozyten ab einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant an, was in Abbildung 12C zu sehen ist. Gleichzeitig erhöhte die Behandlung mit Manumycin A die Prozentzahl der geschwollenen Erythrozyten, was ab einer Konzentration von 10 µg/ml statistische Signifikanz erreicht (Abbildung 12D).

Manumycin A verursacht sowohl eine signifikante Zellschwellung als auch eine signifikante Zellschrumpfung, wobei letztere überwiegt.

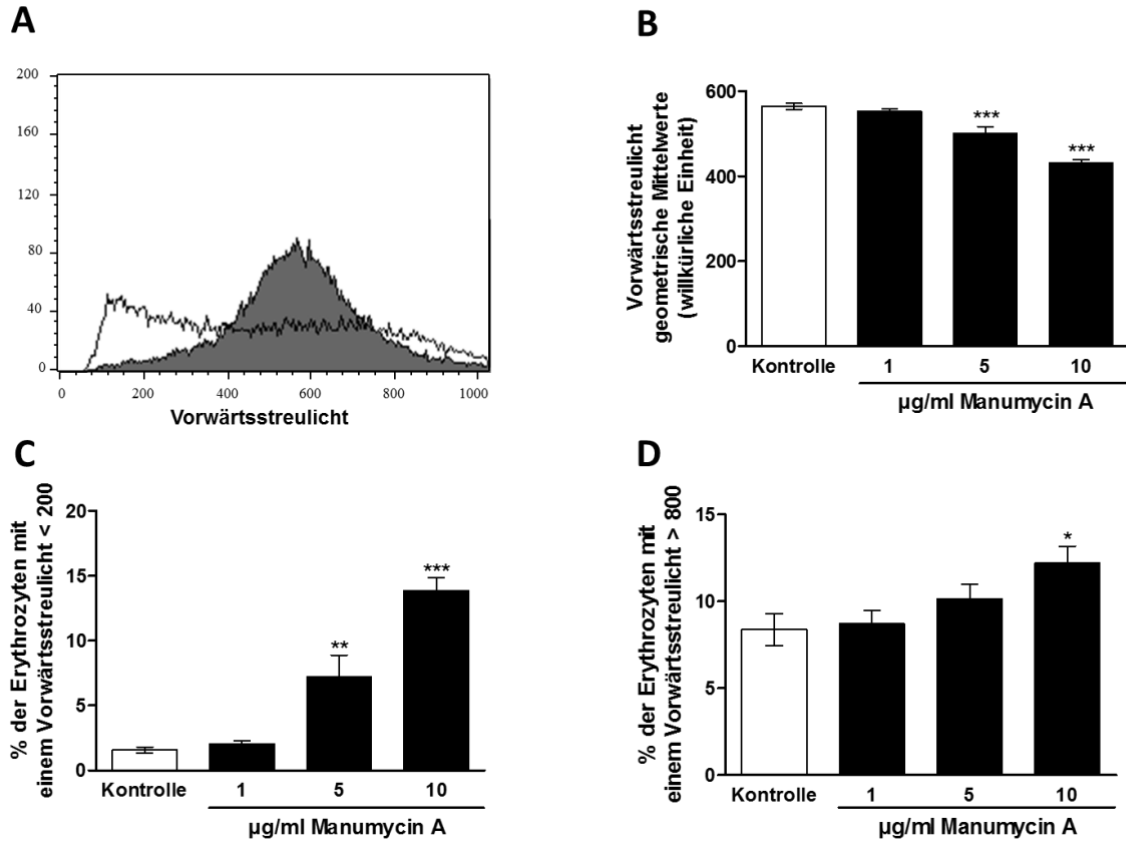


Abbildung 12: Einfluss von Manumycin A auf das Vorwärtsstreulicht [208]

A: Histogramm des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringerlösung (graue Fläche) bzw. mit Ringerlösung und Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie).

B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 16$) des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (Kontrolle, weiße Balken) bzw. mit Manumycin A in den angegebenen Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken).

C: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 16$) der Prozentzahl an Erythrozyten mit einem Vorwärtsstreulicht unter 200 nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (Kontrolle, weiße Balken) bzw. mit Manumycin A in den angegebenen Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken).

D: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 16$) der Prozentzahl an Erythrozyten mit einem Vorwärtsstreulicht über 800 nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (Kontrolle, weiße Balken) bzw. mit Manumycin A in den angegebenen Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml (schwarze Balken).

($p < 0,05$), **($p < 0,01$) und *($p < 0,001$) geben einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Manumycin A an (ANOVA).*

3.2.3. Hämolyse

Da sich im Vorwärtsstreulicht auch eine Zellschwellung gezeigt hat, soll nun auch der andere Sterbemechanismus von Erythrozyten, die Hämolyse, nach Inkubation mit Manumycin A bestimmt werden. Daher wurde der Prozentsatz der hämolytischen Erythrozyten aufgrund der Hämoglobinkonzentration im Überstand nach 48-stündiger Inkubation mit Ringerlösung ohne und mit Manumycin A in Konzentrationen von 1, 5 und 10 µg/ml geschätzt.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigt sich ein Anstieg der Prozentzahl der Erythrozyten, die durch Hämolyse zugrunde gehen. Bei einer Manumycin-A-Konzentration von 5 µg/ml erhöht sich dieser Anteil auf im Mittel 5,3 % bei einem Konfidenzintervall von 3,9 bis 6,7 % der Zellen und bei einer Konzentration von 10 µg/ml auf im Mittel 7,7 % bei einem Konfidenzintervall von 6,6 bis 8,7 % der Zellen.

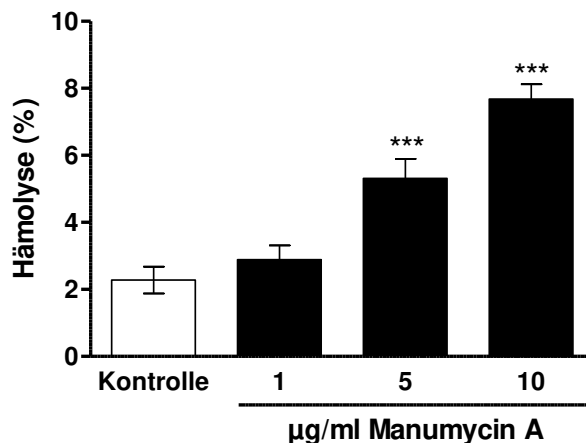


Abbildung 13: Hämolyse durch Manumycin A [208]

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 8$) der Prozentzahl an Erythrozyten, die nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (Kontrolle, weißer Balken) und mit Manumycin A in den angegebenen Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml hämolytisch sind (schwarze Balken). ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Manumycin A an.

Manumycin A verursacht also signifikant Hämolyse ab einer Konzentration von 5 µg/ml. Allerdings beträgt diese bei einer Konzentration von 10 µg/ml nur ca. 8 %, während von der Eryptose im Mittel 27 % der Erythrozyten betroffen sind. Da nun klar ist, dass

Manumycin A Eryptose verursacht, soll der Mechanismus geklärt werden, durch den es dazu kommt.

3.2.4. Calciumkonzentration

3.2.4.1. Fluo3-Fluoreszenz

Zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde die Fluo3-Fluoreszenz angewendet. Dieser Antikörper bindet an intrazelluläres Calcium und sendet daraufhin ein Fluoreszenzsignal, welches mit dem Durchflusszytometer gemessen werden kann. Allerdings erhöhte Manumycin A bereits die Fluoreszenz, obwohl noch kein Fluo3 hinzugefügt wurde. Dies verhinderte ein sicheres Abschätzen der intrazellulären Calciumaktivität mittels Fluo3-Fluoreszenz.

3.2.4.2. Inkubation in calciumfreier Ringerlösung

Da die Messung der Fluo3-Fluoreszenz nicht möglich war, konnte nur die Inkubation in calciumfreier Ringerlösung einen Aufschluss über die Calciumabhängigkeit der Eryptose durch Manumycin A geben. Hierzu wurden die Erythrozyten 48 Stunden mit und ohne Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml in Ringerlösung mit und ohne Calcium inkubiert. Daraufhin wurde die Annexin-V-Bindung mit dem Durchflusszytometer gemessen. Abbildungen 14A und B zeigen Histogramme der Annexin-V-Bindung der Kontrollen (graue Fläche) und von 10 µg/ml Manumycin A mit und ohne Calcium.

Durch die Entfernung des extrazellulären Calciums vermindert sich die Annexin-V-Bindung nach Exposition mit Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml signifikant von im Mittel 28,8 % auf im Mittel 19,9 %. Daher ist die Manumycin-A-abhängige Eryptose teilweise, aber nicht vollständig von extrazellulärem Calcium abhängig.

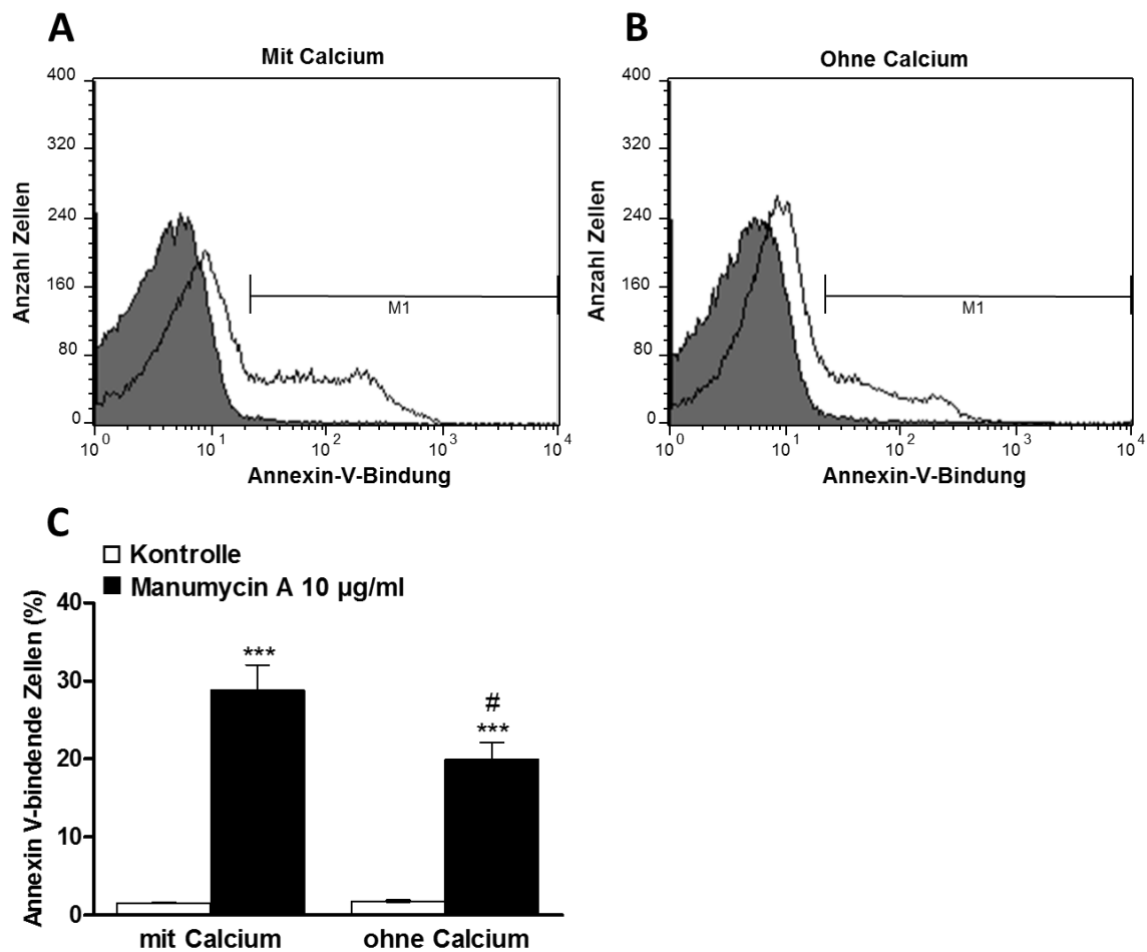


Abbildung 14: Calciumsensitivität der Annexin-V-Bindung durch Manumycin A [208]

A, B: Originalhistogramme der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche), bzw. zusätzlich Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie) in Anwesenheit (A, mit Calcium) bzw. nomineller Abwesenheit (B, ohne Calcium) von extrazellulärem Calcium.

C: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 12) der Annexin-V-bindenden Erythrozyten nach einer 48-stündigen Behandlung mit Ringerlösung ohne (weiße Balken) bzw. mit Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Balken) in der Anwesenheit (linke Balken, mit Calcium) bzw. nominellen Abwesenheit (rechte Balken, ohne Calcium) von Calcium.

***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Manumycin A an, # ($p < 0,05$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Anwesenheit von Calcium an (ANOVA).

3.2.5. Oxidativer Stress

Da auch oxidativer Stress Eryptose begünstigt, wurde dieser mithilfe von DCFDA bestimmt. Allerdings zeigte sich bereits ohne Hinzufügen des Antikörpers, wie bei der

Messung der Fluo3-Fluoreszenz, eine erhöhte Fluoreszenz nur durch Manumycin A. Somit war es mit der in dieser Studie verwendeten Methode nicht möglich, den oxidativen Stress sicher abzuschätzen.

3.2.6. Ceramid

Auch eine Beteiligung von Ceramid an der Eryptose durch Manumycin A sollte überprüft werden. Allerdings zeigte sich dasselbe Problem wie bei der Fluo3- und der DCFDA-Fluoreszenz, nämlich dass Manumycin A allein schon in dem Wellenlängenbereich des Antikörpers Signale aussendet und somit eine unverfälschte Messung verhinderte.

3.2.7. Kinasen

Um herauszufinden, ob an den Effekten von Manumycin A die Proteinkinase C- und/oder die p38-Kinase beteiligt sind, wurden Staurosporine, ein Inhibitor der Proteinkinase C, in einer Konzentration von 1 μM und SB203580, ein Inhibitor der p38-Kinase, in einer Konzentration von 2 μM eingesetzt. Es wurden jeweils Proben mit und ohne die beiden Inhibitoren und mit und ohne Manumycin A in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ für 48 Stunden inkubiert. Danach wurde die Annexin-V-Bindung gemessen.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, verringern beide Kinase-Inhibitoren die Prozentzahl Annexin-V-bindender Erythrozyten bei Inkubation mit Manumycin A signifikant: Staurosporine von im Mittel 44,7 auf 28,3 %, SB203580 auf im Mittel 26,7 %. Somit hängt die von Manumycin A verursachte Eryptose teilweise, jedoch nicht vollständig von der Proteinkinase C und der p38-Kinase ab.

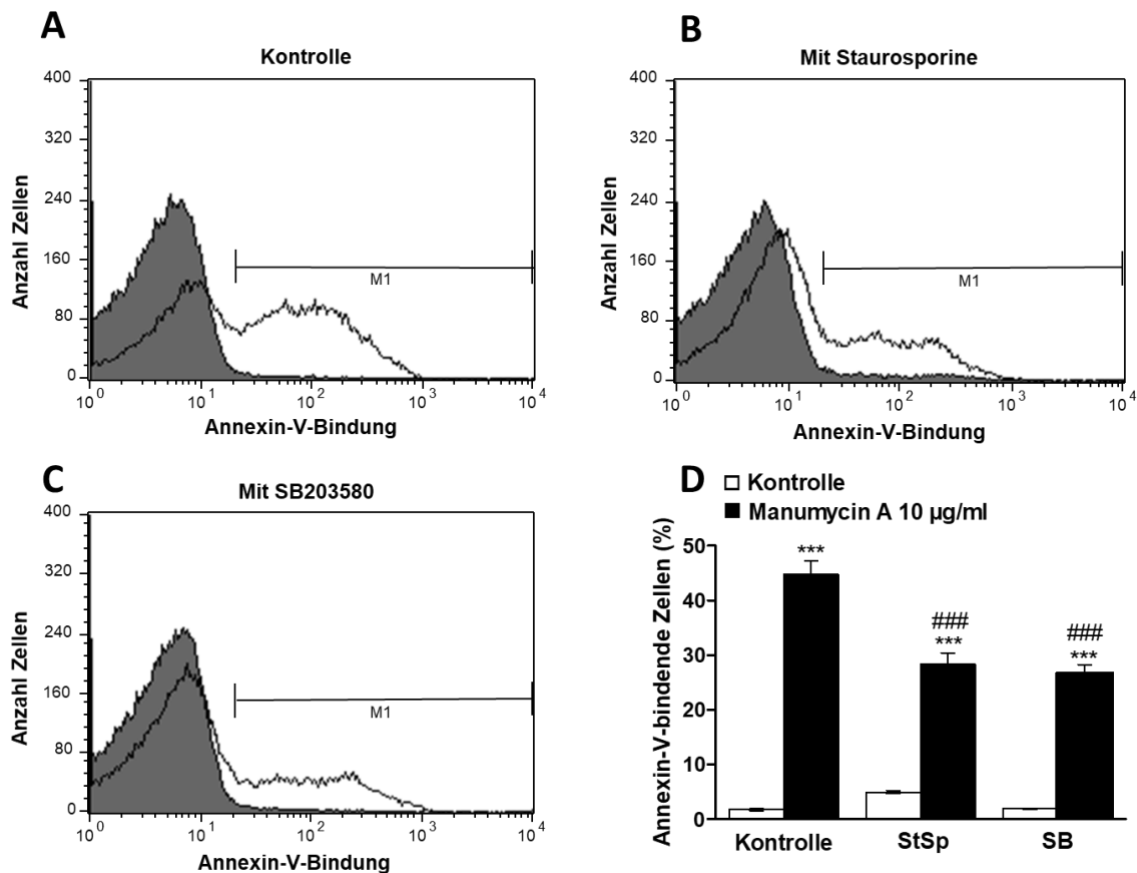


Abbildung 15: Einfluss von Staurosporine und SB 203580 auf die durch Manumycin A verursachte Annexin-V-Bindung [208]

A, B, C: Histogramme der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Linie) ohne Kinaseinhibitoren (A, Kontrolle), mit Staurosporine in einer Konzentration von 1 µM (B, mit Staurosporine) oder mit SB 203580 in einer Konzentration von 2 µM (C, mit SB203580).

D: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 8) der Prozentzahl Annexin-V-bindender Erythrozyten nach einer 48-stündigen Behandlung mit Ringerlösung ohne (weiße Balken) oder mit Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml (schwarze Balken) ohne Kinaseinhibitoren (linke Balken, Kontrolle) und mit 1 µM Staurosporine (mittlere Balken, StSp) oder 2 µM SB203580 (rechte Balken, SB). ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Manumycin A an und ### ($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Kinaseinhibitoren an (ANOVA).

3.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zu Manumycin A

Insgesamt verursacht Manumycin A eine vermehrte Phosphatidylserinexposition an der Oberfläche von Erythrozyten (5–10 µg/ml) und eine Zellschrumpfung (5–10 µg/ml) und

somit Eryptose. Des Weiteren verursacht Manumycin A Hämolyse (5–10 µg/ml). Die vermehrte Phosphatidylserinexposition durch Manumycin A konnte durch Inkubation in calciumfreier Ringerlösung, sowie durch Zugabe der Kinase-Inhibitoren Staurosporine und SB203580 jeweils gehemmt, jedoch nicht vollständig verhindert werden (10 µg/ml). Wegen der Eigenfluoreszenz von Manumycin A ließen sich die Fluo3-, die DCFDA- und die Ceramid-abhängige Fluoreszenz nicht sicher bestimmen.

3.3. Perifosine

3.3.1. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche

Um zu überprüfen, ob auch Perifosine Eryptose auslöst, wurden Erythrozyten 24 h in Ringerlösung ohne und mit Perifosine in Konzentrationen von 0,25, 0,5, 1 und 2,5 µg/ml inkubiert. Daraufhin wurde die Prozentzahl derjenigen Zellen gemessen, die eine hohe Annexin-V-Bindung aufwiesen.

Wie Abbildung 16 zeigt, erhöht Perifosine die Prozentzahl der Zellen mit einer hohen Annexin-V-Bindung, was bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml im Mittel 25 % der Zellen bei einem Konfidenzintervall von 18,5 bis 31,5 % betrifft und somit statistische Signifikanz erreicht. Folglich erhöht Perifosine die Anzahl der Zellen, die vermehrt Phosphatidylserin an der Oberfläche tragen signifikant.

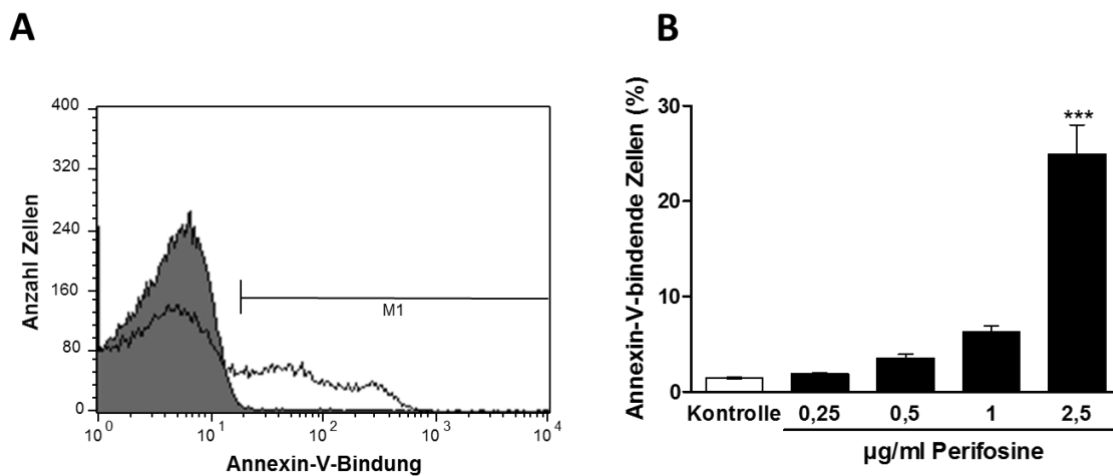


Abbildung 16: Einfluss von Perifosine auf die Annexin-V-Bindung [207]

A: Histogramm der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Linie).

*B: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 12) der Prozentzahl an Erythrozyten mit einer hohen Annexin-V-Bindung nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) und mit Perifosine in den angegebenen Konzentrationen von 0,25 bis 2,5 µg/ml (schwarze Balken). *** (p < 0,001) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an (ANOVA).*

3.3.2. Zellvolumen

Nach einer 24-stündigen Inkubation der Erythrozyten in Ringerlösung ohne und mit Perifosine in Konzentrationen von 0,25, 0,5, 1 und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ wurde zur Abschätzung des Zellvolumens das Vorwärtsstreulicht gemessen. Abbildung 17A zeigt ein Histogramm, aus dem hervorgeht, dass die Menge der sehr kleinen Zellen nach der Inkubation mit Perifosine zunimmt und die Menge der sehr großen Zellen abnimmt. Ab einer Perifosinekonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ verringert sich die Zellgröße signifikant.

Außerdem wurde überprüft, wie sich die Fraktion der sehr kleinen Zellen und die der sehr großen Zellen verhalten. Hierzu wurde als Annäherung jeweils der Anteil der Zellen kleiner als 200 und größer als 800 (willkürliche Einheit) bestimmt und in Abbildung 17C und 17D dargestellt.

Durch die Behandlung der Erythrozyten mit Perifosine stieg der Anteil der geschrumpften Erythrozyten ab einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ signifikant an. Gleichzeitig verringerte die Behandlung mit Perifosine die Prozentzahl der Erythrozyten mit großem Volumen, was ebenfalls ab einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ statistische Signifikanz erreichte. Insgesamt verursacht Perifosine also zusätzlich zu einer erhöhten Phosphatidylserinexposition eine Zellschrumpfung von Erythrozyten und somit Eryptose.

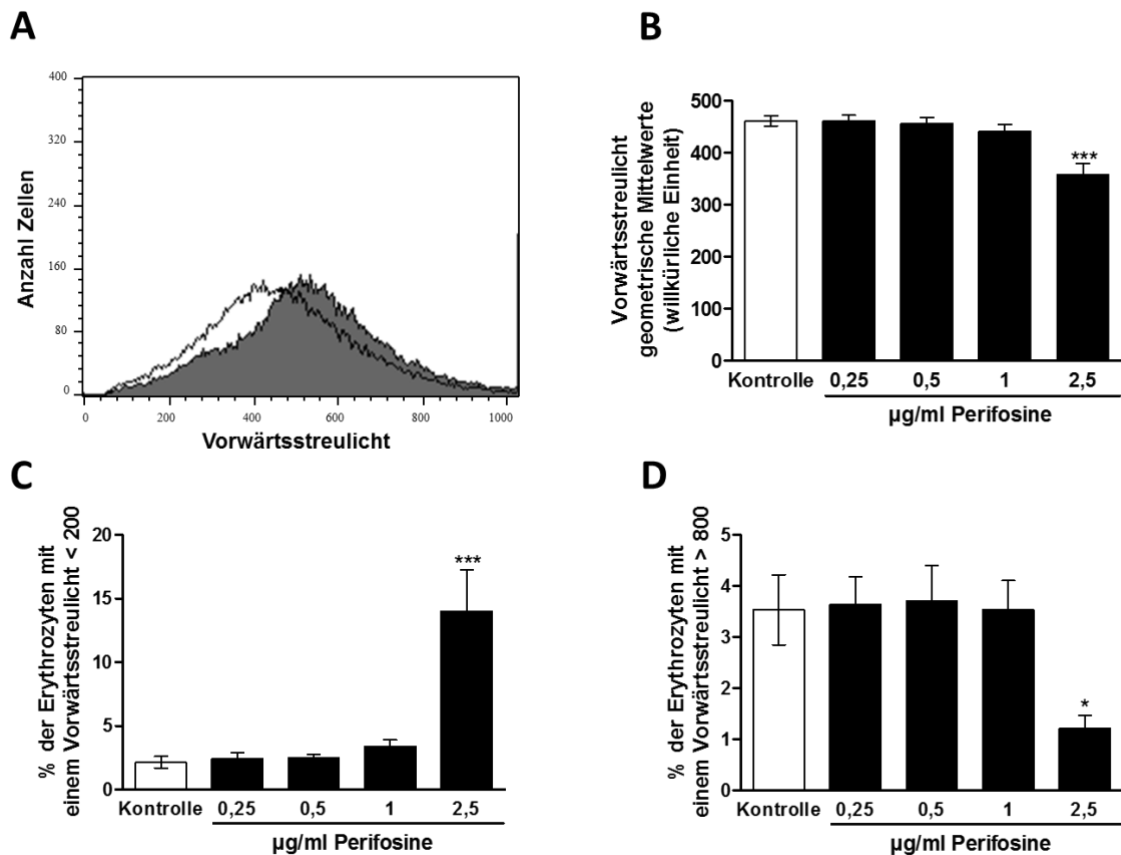


Abbildung 17: Einfluss von Perifosine auf das Vorwärtsstreulicht [207]

A: Histogramm des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation mit Ringerlösung (graue Fläche) bzw. mit Ringerlösung und Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Linie).

B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) des Vorwärtsstreulichts von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (Kontrolle, weiße Balken) bzw. mit Perifosine in den angegebenen Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml (schwarze Balken).

C: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der Prozentzahl an Erythrozyten mit einem Vorwärtsstreulicht unter 200 nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) bzw. mit Perifosine in den angegebenen Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml (schwarze Balken).

*D: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der Prozentzahl an Erythrozyten mit einem Vorwärtsstreulicht über 800 nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) bzw. mit Perifosine in den angegebenen Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml (schwarze Balken). *($p < 0,05$) und ***($p < 0,001$) geben einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an (ANOVA).*

3.3.3. Hämolyse

Es wurde überprüft, inwiefern Perifosine Hämolyse stimuliert. Daher wurde der Prozentsatz der hämolytischen Erythrozyten aufgrund der Hämoglobinkonzentration im

Überstand nach 24-stündiger Inkubation mit Ringerlösung ohne und mit Perifosine in Konzentrationen von 0,25, 0,5, 1 und 2,5 µg/ml geschätzt.

In Abbildung 18 zeigt sich, dass durch Perifosine der Anteil hämolysierter Erythrozyten ansteigt. Dieser Effekt erreicht ab einer Konzentration von 0,5 µg/ml statistische Signifikanz. Bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml sind im Mittel 28,5 % der Zellen bei einem Konfidenzintervall von 24,6 bis 32,5 % von Hämolyse betroffen. Perifosine verursacht also zusätzlich zu Eryptose auch Hämolyse, wobei letztere etwas zu überwiegen scheint.

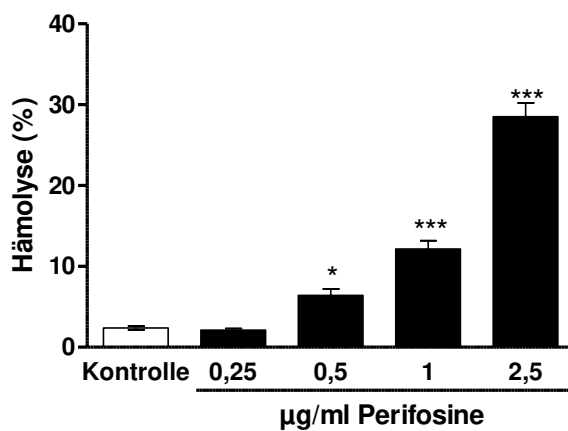


Abbildung 18: Hämolyse durch Perifosine [207]

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 8$) der Prozentzahl an Erythrozyten, die nach einer 24-stündigen Inkubation mit Ringerlösung ohne (Kontrolle, weißer Balken) und mit Perifosine in den angegebenen Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml hämolysiert sind (schwarze Balken). *($p < 0,5$) und ***($p < 0,001$) geben einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an.

3.3.4. Calciumkonzentration

Um herauszufinden, über welchen Mechanismus Perifosine Eryptose verursacht, wurde überprüft, inwiefern Calcium hierbei eine Rolle spielt.

3.3.4.1. Fluo3-Fluoreszenz

Mit Hilfe der Fluo3-Fluoreszenz wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne und mit Perifosine in Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml abgeschätzt.

Abbildung 19A zeigt ein Histogramm, aus dem hervorgeht, dass im Vergleich zur Kontrolle (graue Fläche) die Probe mit Perifosine eine Rechtsverschiebung der Kurve sowie eine Erhöhung der Anzahl Zellen mit einer besonders hohen Fluo3-Fluoreszenz aufweist. Aus Abbildung 18B ergibt sich ein Anstieg der Fluo3-Fluoreszenz, der bei 2,5 µg/ml statistische Signifikanz erreicht. Somit verursacht Perifosine eine signifikant erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration.

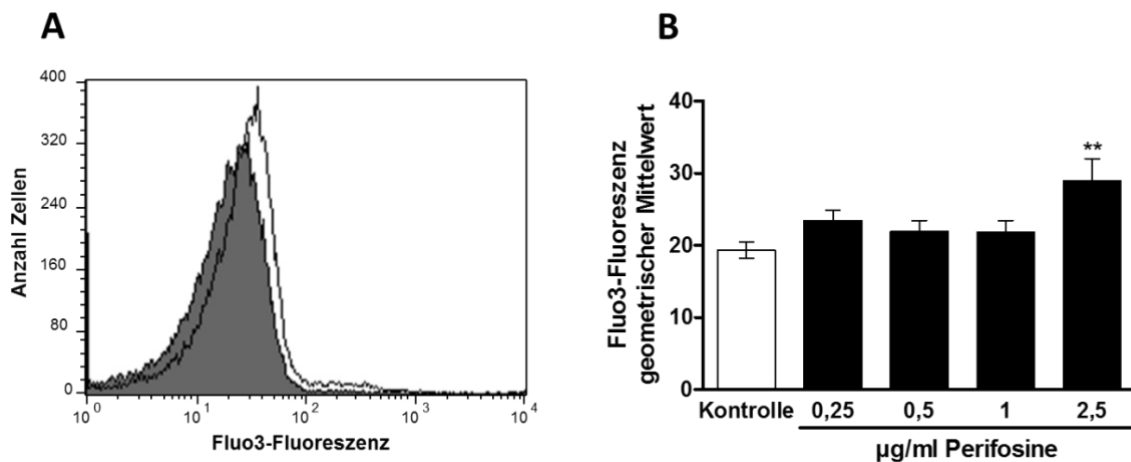


Abbildung 19: Einfluss von Perifosine auf die Fluo3-Fluoreszenz [207]

A: Histogramm der Fluo3-Fluoreszenz von Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) bzw. in Ringerlösung mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Linie).

B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der Fluo3-Fluoreszenz (willkürliche Einheiten) von Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung (Kontrolle, weißer Balken) bzw. zusätzlich Perifosine in den angegebenen Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml (schwarze Balken). ** ($p < 0,01$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an (ANOVA).

3.3.4.2. Inkubation in calciumfreier Ringerlösung

Weiterhin wurde überprüft, ob die Eryptose durch Perifosine mittels Inkubation in calciumfreier Ringerlösung gehemmt werden kann. Hierzu wurde jeweils eine Kontrolle

und eine Probe mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml in Ringerlösung mit und ohne Calcium inkubiert und nach 24 Stunden die Annexin-V-Bindung gemessen.

Abbildungen 20 zeigt Histogramme der Inkubation mit (20A) und ohne Calcium (20B). Durch die Entfernung des extrazellulären Calciums verringerte sich die Annexin-V-Bindung nach Exposition mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml von 25,0 auf 15,6 % der Erythrozyten. Dieser Effekt wird ebenso in Abbildung 20C illustriert und ist statistisch signifikant. Insgesamt ist die Eryptose durch Perifosine teilweise, aber nicht vollständig auf den Calciumeinstrom in die Erythrozyten angewiesen. Dies deutet auf einen zusätzlichen Mechanismus für die Eryptose durch Perifosine hin.

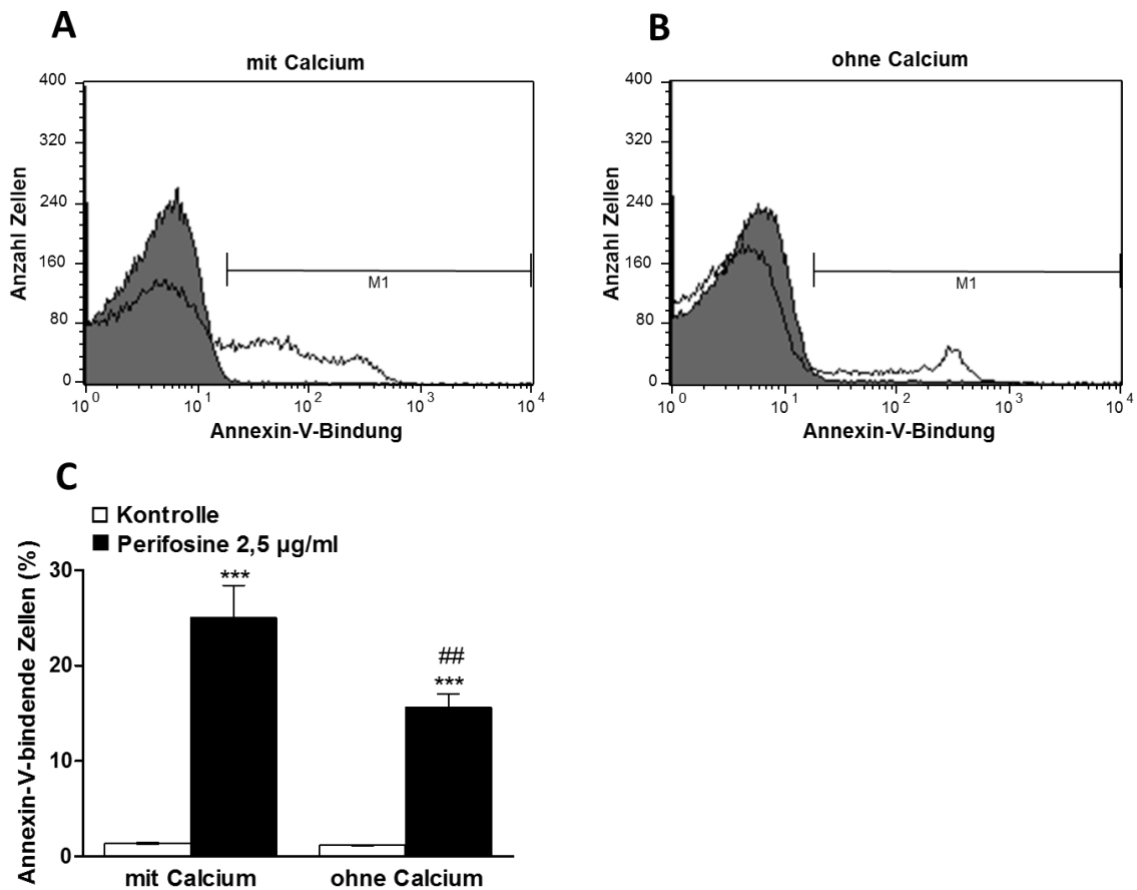


Abbildung 20: Calciumsensitivität der Annexin-V-Bindung durch Perifosine [207]

A, B: Originalhistogramme der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Linie) mit (A, mit Calcium) bzw. ohne extrazelluläres Calcium (B, ohne Calcium).

C: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der Annexin-V-bindenden Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weiße Balken) bzw. mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (schwarze Balken) in der Anwesenheit (linke Balken, mit Calcium) bzw. nominellen Abwesenheit (rechte Balken, ohne Calcium) von Calcium. ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an, ## ($p < 0,01$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Anwesenheit von Calcium an (ANOVA)

3.3.5. Oxidativer Stress

Da auch oxidativer Stress Eryptose hervorrufen kann, wurde er mit Hilfe von DCFDA bestimmt. Abbildung 21 zeigt eine signifikante Verringerung der DCFDA-Fluoreszenz bei einer Perifosinekonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Somit verringert Perifosine eher den oxidativen Stress von Erythrozyten.

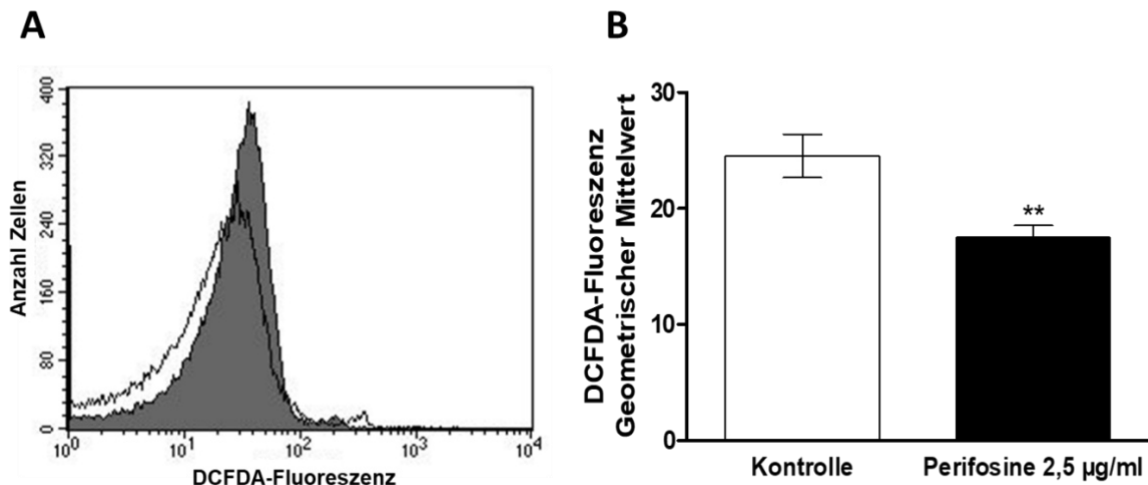


Abbildung 21: Einfluss von Perifosine auf oxidativen Stress [207]

A: Originalhistogramm der DCFDA-Fluoreszenz nach einer 24-stündigen Inkubation von Erythrozyten in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (schwarze Linie).

B: Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 12$) der DCFDA-Fluoreszenz (willkürliche Einheiten) nach einer 24-stündigen Inkubation von Erythrozyten in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) und mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (schwarzer Balken) **($p < 0,01$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an (ANOVA).

3.3.6. Ceramid

Da auch Ceramid die Eryptose stimuliert, wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern bestimmt, ob Perifosine darauf einen Einfluss hat. Wie Abbildung 22 zeigt, verringerte

eine 24-stündige Inkubation von Erythrozyten mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml Ceramid an der Erythrozytenoberfläche signifikant. Somit ist Ceramid kein Mechanismus bei der Erytose durch Perifosine.

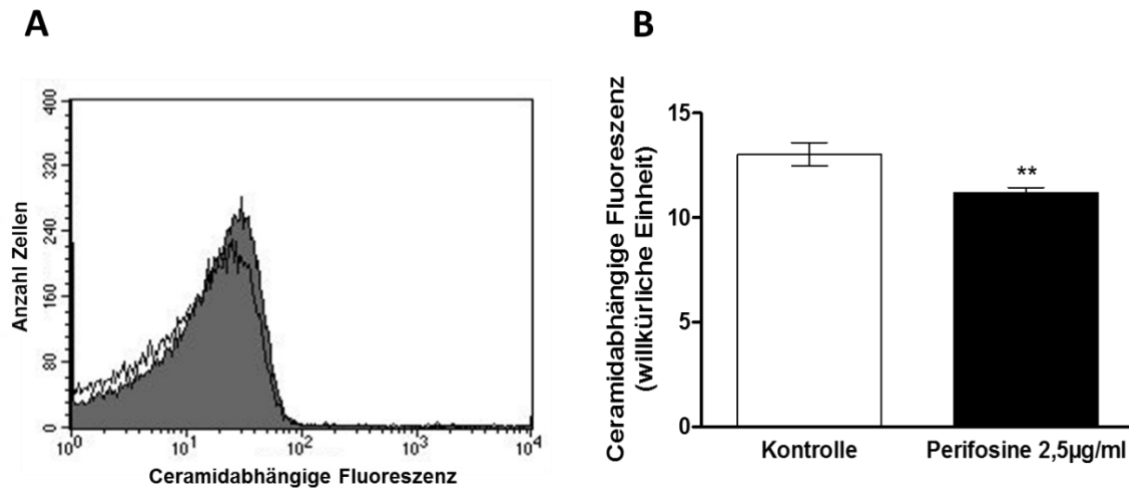


Abbildung 22: Einfluss von Perifosine auf Ceramid an der Zelloberfläche [207]

A: Originalhistogramm der ceramidabhängigen Fluoreszenz von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung (graue Fläche) und zusätzlich Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Linie).

*B: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 8) der ceramidabhängigen Fluoreszenz (willkürliche Einheiten) an der Zelloberfläche von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, Kontrolle) und mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarzer Balken). ** (p < 0,01) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an (ANOVA).*

3.3.7. Kinasen

Um herauszufinden, ob die Proteinkinase C und/oder die p38-Kinase an den Effekten von Perifosine auf Erythrozyten beteiligt sind, wurden Staurosporine und SB203580 eingesetzt. Es wurden jeweils Proben mit und ohne einen der beiden Inhibitoren und mit und ohne Perifosine für 24 Stunden inkubiert und dann die Annexin-V-Bindung gemessen.

Abbildungen 23A, B und C zeigen Histogramme der drei Versuchsreihen. Bei beiden Inhibitoren verringerte sich die Prozentzahl Annexin-V-bindender Zellen, bei Staurosporine von im Mittel 24,9 auf 18,6 % der Zellen und bei SB203580 auf im Mittel 21,8 % der Zellen. Allerdings erreicht dieser Effekt nur bei der Behandlung mit

Staurosporine statistische Signifikanz, was in Abbildung 23D zu sehen ist. Der Effekt von Perifosine auf die Phosphatidylserinexposition wird durch Staurosporine nicht vollständig verhindert. Somit ist die Proteinkinase C teilweise an der Eryptose durch Perifosine beteiligt.

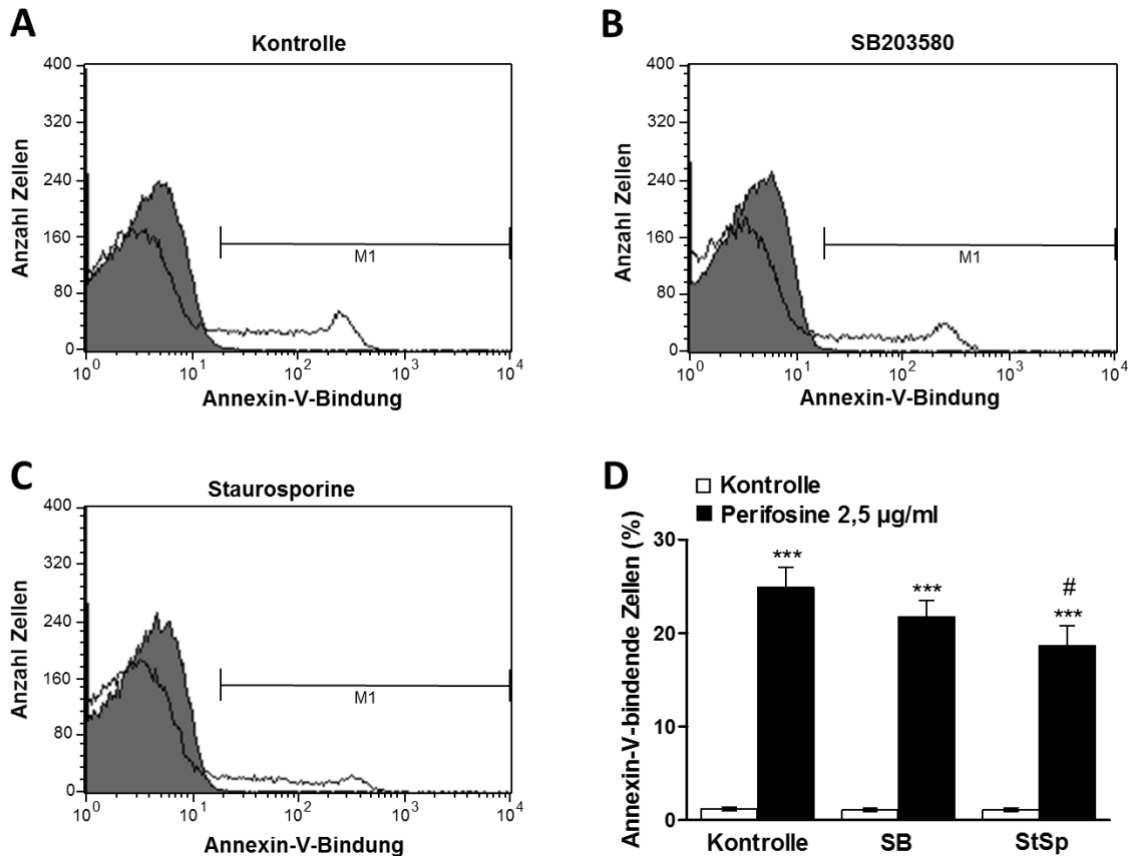


Abbildung 23: Einfluss von SB 203580 und Staurosporine auf die durch Perifosine verursachte Annexin-V-Bindung [207]

A, B, C: Histogramme der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach einer 24-stündigen Inkubation in Ringerlösung ohne (graue Fläche) und mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Linie) ohne Kinaseinhibitoren (A) und mit SB 203580 in einer Konzentration von 2 µM (B) oder mit Staurosporine in einer Konzentration von 1 µM (C).

D: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (n = 8) der Prozentzahl Annexin-V-bindender Erythrozyten nach einer 24-stündigen Behandlung mit Ringerlösung ohne (weiße Balken) oder mit Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (schwarze Balken) ohne Kinaseinhibitoren (linke Balken, Kontrolle) und mit 2 µM SB203580 (mittlere Balken, SB) oder 1 µM Staurosporine (rechte Balken, StSp) ***($p < 0,001$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Perifosine an und #($p < 0,05$) gibt einen signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Kinaseinhibitoren an (ANOVA).

3.3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zu Perifosine

Insgesamt verursacht eine 24-stündige Inkubation mit Perifosine Eryptose mit vermehrter Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten und Zellschrumpfung (2,5 µg/ml). Des Weiteren verursacht Perifosine Hämolyse (> 0,5 µg/ml). Perifosine führte zu einer vermehrten Fluo3-Fluoreszenz (2,5 µg/ml). Die Phosphatidylserinexposition konnte durch Inkubation in calciumfreier Ringerlösung und durch Zugabe des Kinase-Inhibitors Staurosporine gehemmt, aber nicht vollständig verhindert werden (2,5 µg/ml). SB203580 veränderte die von Perifosine verursachte Annexin-V-Bindung nicht signifikant und der oxidative Stress und Ceramid wurden von Perifosine signifikant verringert (2,5 µg/ml).

4. Diskussion

4.1. Methodendiskussion

Bei dieser Studie handelt es sich um eine reine In-Vitro-Studie unter Verwendung von Erythrozytenkonzentraten. Die Bedingungen wurden denjenigen im menschlichen Organismus jedoch so weit wie möglich angenähert. Dazu wurde plasmaitone Ringerlösung mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet und die Inkubation bei 37 °C durchgeführt.

Die Medikamentenkonzentrationen in der Studie lagen bei Licochalcone A in dem Bereich, welcher für Tumorzelltod nötig ist [115]. Bei Manumycin A lag die Konzentration im Bereich der Plasmakonzentration von mit Manumycin A behandelten Mäusen [214] und bei Perifosine leicht unter den Plasmakonzentrationen von Patienten in klinischen Phase-II-Studien (6–8 µg/ml) [202, 215]. Somit wurden für die Versuche bei allen Medikamenten gängige Konzentrationen verwendet.

Allerdings handelt es sich um eine Studie mit Erythrozyten von gesunden Probanden. Somit können nur bedingt Rückschlüsse darauf gezogen werden, wie sich die Medikamente auf Erythrozyten im lebenden Organismus auswirken würden. Die Erythrozyten wurden jeweils 24 bzw. 48 h dem Medikament in derselben Konzentration ausgesetzt. Die Pharmakokinetik fand also keine Beachtung, ebenso wenig wie die Wirkungen von möglicherweise entstehenden Abbauprodukten und das wiederholte Einwirken von Medikamenten in der normalerweise 120-tägigen Lebensdauer von Erythrozyten.

Zu beachten ist ebenfalls, dass die Medikamente auf Erythrozyten von erkrankten Patienten anders wirken könnten: vor allem bei Erkrankungen, welche zu einer erhöhten Empfindlichkeit von Erythrozyten, durch Eryptose zugrunde zu gehen, führen. Dazu gehören Eisenmangelanämie [19], Dehydrierung [53], Hyperphosphatämie [216], chronische Niereninsuffizienz [217], hämolytisch-urämisches Syndrom [65], Diabetes [58, 218], Leberversagen [219], bösartige Tumore [19], Sepsis [66], Sichelzellanämie, beta-Thalassämie, Hb-C- und G6P-DH-Mangel [33] und Morbus Wilson [67].

Nur die zusätzliche Bestimmung der Eryptoserate direkt aus dem Blut von Patienten, welche in klinischen Studien mit den neuen Medikamenten behandelt werden, könnte Aufschluss darüber geben, wie die Medikamente in vivo auf Erythrozyten wirken.

Um Verfälschungen der Messergebnisse zu vermeiden, wurde das verwendete Blut täglich frisch in der Blutspendezentrale abgeholt, aufbereitet und bei 4 °C aufbewahrt, bis es spätestens nach 24 h für den Versuchsansatz verwendet wurde. Die Lösungen wurden bei 4 °C und die Medikamente und Antikörper nach Herstellerangabe bei 4 °C oder bei -20 °C luftdicht verschlossen gelagert. Für lichtempfindliche Substanzen wurden lichtgeschützte Behälter verwendet. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Materialien, die in direktem Kontakt zu den Proben standen, vor Verwendung autoklaviert. Zudem wurde stets unter der Sterilbank pipettiert, welche vor und nach jedem Versuch gereinigt wurde. Dennoch sind Verunreinigungen und Zerfall der Medikamente oder Antikörper nicht ausgeschlossen. Um interindividuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit der Erythrozyten auszugleichen, wurden stets Kontrollen und Proben mit demselben Blut inkubiert.

Die Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer durchgeführt; dieses ist bereits seit Jahren für die Untersuchung von Erythrozyten etabliert [206]. Um Streulicht und Messverfälschungen durch Vibrationen zu vermeiden, fanden die Messungen in einem abgedunkelten Raum statt, und das Gerät wurde auf einem schwingungsarmen Tisch gelagert. Das Gerät wurde zudem vor und nach jedem Messvorgang gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült, um Verunreinigungen so gering wie möglich zu halten. Diese sind jedoch auch hier nie ganz auszuschließen. Die Messungen fanden jeweils unter denselben Bedingungen und Einstellungen statt.

Da manche Medikamente selbst eine Fluoreszenz aufweisen, wurde vor den eigentlichen Messungen eine Probe ohne Antikörper gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass Manumycin A eine Eigenfluoreszenz ähnlich der von Fluo3, DCFDA und Ceramid-Antikörper aufweist. Daher waren diese Messungen nicht durchführbar. Bei den anderen Medikamenten und Antikörpern stellte dies jedoch kein Problem dar.

4.2. Ergebnisdiskussion

4.2.1. Licochalcone A

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass Licochalcone A den suizidalen Zelltod von Erythrozyten stimuliert, und geben Aufschluss über die zugrundeliegenden Signalwege. Bekannt war bisher, dass Licochalcone A über verschiedenste Mechanismen [104, 105, 107, 109, 111, 114, 115, 117, 119, 121-123] und bei einer Vielzahl von Tumorzellen [5, 100, 104, 106, 107, 109, 111-123] Apoptose verursachen kann [5, 106, 107].

Eryptose ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Phosphatidylserinexposition an der Außenseite der Zellmembran [4]. Diese lässt sich mittels Annexin-V messen, da es selektiv an Phosphatidylserin bindet und durch Konjugation an FITC ein Fluoreszenzsignal aussendet, welches durchflusszytometrisch messbar ist [210, 211]. Eine 24-stündige Inkubation mit Licochalcone A in einer Konzentration von 5–10 µg/ml führte in dieser Studie zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils Annexin-V-bindender Erythrozyten. Licochalcone A führt also zu einer vermehrten Phosphatidylserinexposition.

Das zweite entscheidende Merkmal der Eryptose ist die Zellschrumpfung und die Bildung von Mikrovesikeln [4]. Da das Vorwärtsstreulicht des Durchflusszytometers mit der Partikelgröße korreliert, konnte hiermit die Zellgröße abgeschätzt werden [212]. Bei Inkubation mit 2,5 und 5 µg/ml Licochalcone A verringerte sich das Vorwärtsstreulicht insgesamt signifikant. Bei niedrigeren (1 µg/ml) oder höheren (7,5 und 10 µg/ml) Konzentrationen veränderte sich das Zellvolumen jedoch nicht wesentlich. Im Histogramm war bei diesen Konzentrationen sowohl ein Anstieg der sehr kleinen Zellen als auch ein Anstieg der großen Zellen zu sehen. Licochalcone A verursacht also den programmierten Zelltod von Erythrozyten.

Um zu überprüfen, ob Calcium bei der Eryptose durch Licochalcone A eine Rolle spielt, wurde mittels Fluo3/AM die intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen [206-209]. Hierbei erhöhte sich die Fluo3-Fluoreszenz nach einer 24-stündigen Inkubation mit Licochalcone A ab einer Konzentration von 7,5 µg/ml signifikant. Licochalcone A verursacht also eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration.

Zusätzlich wurde untersucht, inwiefern extrazelluläres Calcium für die Eryptose durch die getesteten Medikamente notwendig ist. Hierzu wurden im Versuchsansatz Erythrozyten in Ringerlösungen mit und ohne Calcium inkubiert. Licochalcone A verursachte ohne extrazelluläres Calcium eine unveränderte Translokation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, allerdings kam es zu einer etwas geringeren Zellschrumpfung. Dieser Effekt erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert calciumsensitive Kaliumkanäle, die zur Zellschrumpfung beitragen. Dies geschieht durch Kaliumausstrom, es kommt zur Zellmembranhyperpolarisation, die zum Ausstrom von Chlorid führt. Insgesamt verliert die Zelle also Kaliumchlorid und Wasser strömt osmotisch aus der Zelle [30]. Ab einer Licochalcone-A-Konzentration von 7,5–10 µg/ml verschwand die Zellschrumpfung, obwohl die intrazelluläre Calciumkonzentration weiter anstieg. Möglicherweise hat Licochalcone A einen doppelten Effekt auf das Zellvolumen. Einerseits führt es zu einer calciumabhängigen Zellschrumpfung, andererseits zu einer calciumunabhängigen Zellschwellung.

Der letztere Effekt könnte erklären, warum Licochalcone A auch Hämolyse verursachte, was ab einer Konzentration von 7,5 µg/ml bei den photometrischen Messungen statistische Signifikanz erreichte. Die Hämolyse verstärkte sich bei einer calciumfreien extrazellulären Lösung signifikant. Die Aufgabe des calciumabhängigen Kaliumkanals ist es, eben diese Zellschwellung von sterbenden Erythrozyten zu verhindern [220].

Der oxidative Stress, ein weiterer Mechanismus für die Entstehung von Eryptose, wurde mit Hilfe der DCFDA-abhängigen Fluoreszenz bestimmt [19, 206]. Hierbei zeigte sich, dass Licochalcone A den oxidativen Stress in einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant reduzierte: bei 10 µg/ml lag er auf Höhe der Kontrolle. In der Literatur gibt es gegensätzliche Angaben zur Auswirkung von Licochalcone A auf oxidativen Stress. Einige Autoren sprechen von antioxidativen Effekten [100, 128, 135], welche auch in dieser Studie beobachtet wurden, andere wiederum nennen oxidativen Stress als einen Mechanismus für Apoptose [108, 114, 115, 119, 121].

Die Anreicherung von Ceramid in der Erythrozytenmembran ist ein weiterer bekannter Mechanismus für die Verursachung von Eryptose, was durchflusszytometrisch mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt wurde [19]. Licochalcone A erhöhte den Ceramidgehalt

ab einer Konzentration von 10 µg/ml signifikant; es kann also davon ausgegangen werden, dass der ceramidabhängige Signalweg bei der Eryptose durch Licochalcone A von Bedeutung ist.

SB203580 ist ein Inhibitor der p38-Kinase und Staurosporine ein Inhibitor der Proteinkinase C. Beide Kinasen können Eryptose in die Wege leiten [33, 36, 38, 39]. Da mittels der Kinase-Inhibitoren die Eryptose durch Licochalcone A nicht signifikant verringert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die p38-Kinase und die Proteinkinase C nicht an der Eryptose durch Licochalcone A beteiligt sind.

Insgesamt verursacht Licochalcone A Eryptose, welche gekennzeichnet ist durch Phosphatidylserinexposition an der Membranaußenseite und Zellschrumpfung von Erythrozyten. Zusätzlich verursacht Licochalcone A Hämolyse. Die der Eryptose zugrundeliegenden Mechanismen sind eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration und Ceramid-Anreicherung der Erythrozytenmembran. Oxidativer Stress, die Proteinkinase C und die p38-Kinase scheinen bei der Eryptose durch Licochalcone A jedoch keine Rolle zu spielen.

4.2.2. Manumycin A

In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Manumycin A Zellschrumpfung und Phosphatidylserinexposition von Erythrozyten und damit Eryptose bewirkt. Auch über zugrundeliegende Mechanismen konnten Erkenntnisse gewonnen werden. Bekannt war zuvor, dass Manumycin A Apoptose über verschiedene Mechanismen [6, 141, 145, 153-157, 160-163] und bei verschiedenen Tumorzellen verursachen kann [6, 139-143, 146-148, 153-155, 157-161].

Zunächst wurde die Phosphatidylserinexposition mit Hilfe von Annexin-V durchflusszytometrisch gemessen [210, 211]. Da Manumycin A eine Eigenfluoreszenz aussendet, musste vor den Versuchen überprüft werden, ob diese die Ergebnisse verändert und somit verfälscht. Es zeigte sich jedoch, dass die Eigenfluoreszenz von Manumycin A nicht in ausreichender Menge in den gemessenen Bereich fällt. Somit waren die Messungen mittels Annexin-V durchführbar. Die Anzahl derjenigen Zellen, die vermehrt Annexin-V banden, also Phosphatidylserin an ihrer Zelloberfläche trugen, erhöhte sich

nach einer 48-stündigen Inkubation mit Manumycin-A-Konzentrationen von 5–10 µg/ml signifikant.

Zusätzlich wurde das zweite Merkmal der Eryptose, die Zellschrumpfung, mittels Vorwärtsstreulicht des Durchflusszytometers bestimmt [4, 212]. Da hierbei kein fluoreszierender Antikörper verwendet wurde, war auch diese Messung von der Eigenfluoreszenz von Manumycin A unbeeinflusst. Nach 48-stündiger Inkubation mit Manumycin A verringerte sich ab einer Konzentration von 5 µg/ml das Vorwärtsstreulicht insgesamt signifikant. Mit Hilfe eines Markers wurde zusätzlich der Anteil sehr großer und sehr kleiner Zellen bestimmt. Hierbei stieg der Anteil der geschrumpften Erythrozyten ab einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant an, gleichzeitig erhöhte die Behandlung mit Manumycin A die Prozentzahl der geschwollenen Erythrozyten ab einer Konzentration von 10 µg/ml signifikant. Somit verursacht Manumycin A sowohl Zellschwellung als auch Zellschrumpfung, wobei letztere überwiegt. Manumycin A führt also ebenfalls zu Eryptose.

Die Eigenfluoreszenz von Manumycin A und damit die Beeinflussung der Messmethode verhinderte eine sichere Messung der Fluo3-Fluoreszenz, die zur Bestimmung der intrazellulären Calciumaktivität verwendet wird. Jedoch konnte die Annexin-V-Bindung nach Inkubation in calciumfreier Ringerlösung bestimmt werden. Es zeigte sich, dass Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml eine signifikant geringere Phosphatidylserinexposition verursacht, wenn die Erythrozyten in calciumfreier Ringerlösung inkubiert wurden.

Dies spricht dafür, dass die Eryptose durch Manumycin A teilweise vom Calciumeinstrom in die Erythrozyten abhängig ist. Die Zellschrumpfung könnte aus eben diesem Calciumeinstrom resultieren, welcher zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration führt. Es werden calciumabhängige Kaliumkanäle aktiviert, wodurch Kalium ausströmt. Die Zelle hyperpolarisiert und Chlorid strömt ebenfalls aus. Der Erythrozyt verliert also Kaliumchlorid und Wasser, das osmotisch folgt: Es kommt zur Zellschrumpfung [30]. Allerdings schrumpfte nur ein Teil der mit Manumycin A behandelten Erythrozyten bedeutsam. Ein anderer Teil war sogar von einem erhöhten Zellvolumen betroffen. Der Mechanismus für diese Zellschwellung blieb jedoch schwer definierbar. Eine mögliche Ursache könnte ein ATP-Mangel und damit eine

Beeinträchtigung der Natrium-Kalium-ATPase sein, was zu einer intrazellulären Akkumulation von Natrium und einem Verlust von Kalium führt. Hierdurch depolarisiert die Zelle, und Chlorid strömt ein, dem wiederum Wasser folgt, wodurch es irgendwann zur Verletzung der Zellmembran kommt.

Wegen der beobachteten Zellschwellung wurde die Hämolyse photometrisch bestimmt. Manumycin A verursacht Hämolyse ab einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant. Allerdings betrug diese nur knapp 8 %, während von der Eryptose im Mittel 27 % der Erythrozyten betroffen waren. Somit finden Hämolyse und Eryptose parallel statt, wobei die Eryptose überwiegt.

Da Manumycin A auch in der Abwesenheit von Calcium Eryptose verursachen konnte, muss ein weiterer Mechanismus hierfür verantwortlich sein. Die Bestimmung des oxidativen Stresses mittels DCFDA-Antikörper und die Ceramidbestimmung waren wie die Fluo3-Fluoreszenzbestimmung aufgrund der Eigenfluoreszenz von Manumycin A nicht möglich. Es besteht also die Möglichkeit, dass auch diese Mechanismen eine Rolle spielen. In der Literatur ist die Verursachung von vermehrtem oxidativem Stress durch Manumycin A beschrieben [154-156, 161, 163], er könnte daher auch an der Eryptose durch Manumycin A beteiligt sein. Dies konnte mit der hier verwendeten Methode jedoch nicht herausgefunden werden. Hierzu wären Antikörper mit anderem Fluoreszenzspektrum oder aber eine von Fluoreszenz unabhängige Methode nötig gewesen. Dies könnte Bestandteil weiterer Forschung sein.

Ohne Verwendung weiterer spezifischer Antikörper war jedoch die Inkubation mit den Kinase-Inhibitoren Staurosporine und SB203580 möglich, und es konnte die Annexin-V-Bindung gemessen werden. Diese hemmen die Proteinkinase C bzw. die p38-Kinase, welche ebenfalls Eryptose verursachen [19]. Bei Inkubation mit Manumycin A in einer Konzentration von 10 µg/ml verringerten sowohl Staurosporine, als auch SB 203580 die Prozentzahl Annexin-V-bindender Erythrozyten signifikant. Sie verhinderten diese jedoch nicht vollständig. Somit ist die durch Manumycin A verursachte Eryptose teilweise, jedoch nicht vollständig von der Proteinkinase C und der p38-Kinase abhängig.

Zusammenfassend verursacht Manumycin A Eryptose. Dieser Effekt hängt teilweise vom Calciumeinstrom und teilweise von der Proteinkinase C und von der p38-Kinase ab. Die

Messung von Ceramid und von oxidativem Stress war wegen der Eigenfluoreszenz von Manumycin A nicht möglich. Zusätzlich verursacht Manumycin A auch Hämolyse.

4.2.3. Perifosine

Durch Perifosine kommt es zur Phosphatidylserinexposition und Zellschrumpfung von Erythrozyten. Bekannt war zuvor, dass die beiden Medikamente Edelfosine und Miltefosine, welche Perifosine ähneln, ebenfalls Eryptose verursachen [85, 164]. Perifosine führt über verschiedene Mechanismen zu Apoptose [7, 165, 167-176] und wird daher in klinischen Studien als Tumorthherapie erprobt [8, 196-202]. Hierbei zeigte sich, dass Perifosine Anämien verursachen kann [8].

Auch bei Perifosine wurde zunächst mittels Annexin-V-Bindung überprüft, ob es zu einer Phosphatidylserinexposition kommt [210, 211]. Nach einer 24-stündigen Inkubation erhöhte Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml die Anzahl Zellen signifikant, die vermehrt Phosphatidylserin an der Oberfläche trugen.

Mittels Vorwärtsstreulicht wurde auch nach Inkubation mit Perifosine die Zellgröße abgeschätzt [212]. Bei einer Perifosinekonzentration von 2,5 µg/ml verringerte sich die Zellgröße signifikant. Zusätzlich stieg bei dieser Konzentration der Anteil besonders kleiner Zellen und sank der Anteil besonders großer Erythrozyten signifikant.

Insgesamt verursachte Perifosine zusätzlich zu einer erhöhten Phosphatidylserinexposition eine Zellschrumpfung von Erythrozyten und somit Eryptose.

Calciumeinstrom stellt einen wichtigen Mechanismus für die Entstehung von Eryptose dar, weswegen nach Inkubation mit Perifosine die intrazelluläre Calciumkonzentration mittels Fluo3/AM bestimmt wurde [206-209]. Es zeigte sich ab einer Konzentration von 2,5 µg/ml eine signifikant erhöhte Calciumkonzentration.

Die Calciumabhängigkeit der Eryptose durch Perifosine zeigte sich auch nach Inkubation in calciumfreier Ringerlösung, denn sie wurde hierdurch signifikant gehemmt, jedoch nicht vollständig verhindert. Daher war die von Perifosine verursachte Eryptose zum Teil, jedoch nicht vollständig vom Calciumeinstrom abhängig. Die Zellschrumpfung lässt sich auf diese erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zurückführen. Calcium führt zur

Aktivierung von calciumsensitiven Kaliumkanälen, wodurch es zum Kaliumausstrom kommt. Die Zelle hyperpolarisiert und Chlorid strömt ebenfalls nach extrazellulär, wodurch die Zelle Kaliumchlorid verliert, dem Wasser folgt [19].

Auch Hämolyse wurde von Perifosine verursacht und könnte ebenfalls für die durch Perifosine hervorgerufene Anämie von Bedeutung sein.

Da die calciumfreie Ringerlösung die Eryptose nur unvollständig hemmt, kann man davon ausgehen, dass ein weiterer Mechanismus involviert ist. Daher wurde der oxidative Stress mittels DCFDA-Fluoreszenz bestimmt [19, 206]. In einer Konzentration von 2,5 µg/ml verringerte Perifosine den oxidativen Stress signifikant, spielt daher bei der Eryptose durch Perifosine wohl keine Rolle. Ji et al. und Shen et al. beschreiben eine gegensätzliche Wirkung, nämlich die Erhöhung des oxidativen Stresses in Haut- und Rhabdomyosarkomzellen [7, 172].

Mittels spezifischer Antikörper wurde zudem Ceramid, ebenfalls ein Mechanismus für Eryptose, gemessen [19]. Allerdings reduzierte Perifosine das Ceramid in einer Konzentration von 2,5 µg/ml signifikant, ist also ebenfalls kein Mechanismus für die Entstehung der Eryptose durch Perifosine. Dies steht im Gegensatz zur Perifosinewirkung auf Hautzellen, wie sie von Ji et al. beschrieben wird [172]. Möglicherweise liegt der Unterschied in der Wirkung von Perifosine auf oxidativen Stress und Ceramid darin begründet, dass die anderen Studien kernhaltige Zellen untersuchten.

Zuletzt wurde mittels Kinase-Inhibitoren der Einfluss der Proteinkinase C und der p38-Kinase auf die Eryptose durch Perifosine überprüft [19]. Der Effekt von Perifosine in einer Konzentration von 2,5 µg/ml wurde nicht signifikant vom p38-Kinaseblocker SB203580 beeinflusst. Es war jedoch ein leicht hemmender Effekt zu beobachten. Möglicherweise fehlt für die Signifikanz eine höhere Anzahl an Proben. Von Shen et al. wurde hier eine signifikante Hemmung der Perifosinewirkung auf Rhabdomyosarkomzellen durch SB203580 beobachtet [7].

Allerdings hemmte Staurosporine die Wirkung von Perifosine auf die Phosphatidylserinexposition von Erythrozyten signifikant, jedoch nicht vollständig. Somit ist die Proteinkinase C an der Eryptose durch Perifosine beteiligt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Perifosine Eryptose verursacht. Zugrundeliegende Mechanismen sind Calciumeinstrom und die Proteinkinase C. Dagegen sind oxidativer Stress und Ceramid nicht an der Eryptose durch Perifosine beteiligt. Zusätzlich verursacht Perifosine Hämolyse. Insgesamt lässt sich hiermit die bei Gabe von Perifosine beobachtete Nebenwirkung Anämie erklären.

4.3. Klinische Relevanz

Die Phosphatidylserinexposition von durch Eryptose zugrunde gehenden Erythrozyten stellt für Makrophagen das Signal dar, diese zu phagozytieren und damit schnell aus dem zirkulierenden Blut zu entfernen [46, 220]. Zudem wirkt die Zellschrumpfung bei der Eryptose der Zellschwellung bei Hämolyse entgegen. Sie ist damit ein Mechanismus, um Hämolyse zu verhindern oder zumindest hinauszuzögern. Dabei würde es zur Zerstörung der Membranintegrität von Erythrozyten und dadurch zur Freisetzung von Hämoglobin kommen. Dieses wiederum wird in den renalen Glomeruli filtriert, fällt im sauren Tubuluslumen aus und verstopft damit Nephrone [221].

Andererseits kann exzessive Eryptose zu Anämien führen, sobald der dadurch zustande kommende Erythrozytenverlust nicht mehr durch Neubildung ausgeglichen werden kann [220]. Hierdurch lässt sich erklären, wie die in klinischen Studien beobachteten Anämien bei der Gabe von Perifosine [8] zustande gekommen sein könnten. Phosphatidylserin exponierende Erythrozyten können allerdings auch an Endothelzellen haften bleiben [43], die Blutgerinnung stimulieren [44-46] und damit Thrombosen verursachen. Daher kann Eryptose die Mikrozirkulation beeinträchtigen [44, 47-49].

Somit könnte die Anwendung von Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine als Nebenwirkung Anämie, Thrombose, durch die stattfindende Hämolyse aber auch ein Nierenversagen nach sich ziehen. Daher könnten ein erhöhtes Risiko für derartige Erkrankungen Kontraindikationen für die Anwendung der vorliegenden Medikamente darstellen.

Die Untersuchung der Auswirkungen von Medikamenten und potentiellen Medikamenten auf Erythrozyten stellt somit eine nicht-invasive Möglichkeit dar, in vitro die Zytotoxizität zu überprüfen und mögliche Nebenwirkungen vorherzusagen. Mithin könnte die Überprüfung der Wirkung von potentiellen Medikamenten auf Erythrozyten

ein routinemäßiger Vorgang in der Entwicklung von Medikamenten sein, ohne dabei Versuchstiere oder Probanden in erheblichem Maße zu beeinträchtigen.

Es gibt wahrscheinlich noch eine Vielzahl an Erkrankungen, die mit einer erhöhten Eryptoserate einhergehen, was zu beeinträchtigenden Anämien führen kann. Hierfür wäre es sinnvoll, zum einen die Eryptose durch diese Erkrankungen zu erforschen und zum anderen Inhibitoren der Eryptose als Medikamente gegen diese erhöhte Eryptose einzusetzen.

4.4. Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Insgesamt zeigt diese Arbeit neue Effekte von Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine auf Erythrozyten. Alle drei potentiellen Medikamente verursachen Eryptose, gekennzeichnet durch Phosphatidylserinexposition und Zellschrumpfung, und Hämolyse. Die Mechanismen zur Eryptoseentstehung sind bei Licochalcone A eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration und ein erhöhter Ceramidgehalt der Erythrozytenmembran. Manumycin A verursacht Eryptose durch Calciumeinstrom, durch die Proteinkinase C und die p38-Kinase. Die Eryptose durch Perifosine beruht ebenfalls auf einem Calciumeinstrom und auf der Proteinkinase C. Alle drei potentiellen Medikamente könnten daher Anämien verursachen, ein erhöhtes Risiko für Thrombosen bewirken und Nierenversagen auslösen. Zustände mit erhöhtem Risiko hierfür könnten also Kontraindikationen für die Anwendung dieser Medikamente darstellen.

5. Zusammenfassung

Hintergrund/Ziele: Licochalcone A ist ein antientzündliches, immunmodulatorisches und antimikrobielles Extrakt der Glycyrrhiza inflata und verursacht Apoptose von Tumorzellen, weswegen es für die Behandlung von Tumoren in Erwägung gezogen wird.

Manumycin A ist ein von Streptomyceten hergestellter Farnesyltransferase-Inhibitor, der ebenfalls Apoptose von Tumorzellen verursacht und für die Tumorbehandlung infrage kommt.

Perifosine ist ein Alkylphospholipid, welches für die Behandlung von Tumoren verwendet wird. Es wirkt, indem es Apoptose verursacht. Eine der Nebenwirkungen ist Anämie, welche zumindest theoretisch durch die Verursachung von Eryptose begründet sein könnte.

Ähnlich der Apoptose von kernhaltigen Zellen können Erythrozyten durch Eryptose zugrunde gehen, die gekennzeichnet ist durch Zellschrumpfung und Zellmembran-Scrambling, was in Zusammenbruch der Zellmembranasymmetrie und Präsentation von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche mündet. Zu den Signalwegen, welche in die Verursachung von Eryptose involviert sind, gehören der Calciumeinstrom und die damit einhergehende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, Ceramidanreicherung in der Erythrozytenmembran, oxidativer Stress, Proteinkinase C und p38-Kinase.

Fragestellung: Verursachen die Apoptose auslösenden Medikamente Licochalcone A, Manumycin A und Perifosine auch Eryptose, den programmierten Zelltod von Erythrozyten? Wenn ja, über welchen Mechanismus geschieht dies?

Methoden: Humane Erythrozyten von gesunden Probanden wurden bei 37 °C 24 Stunden lang mit Licochalcone A in Konzentrationen von 1–10 µg/ml oder Perifosine in Konzentrationen von 0,25–2,5 µg/ml oder 48 Stunden lang mit Manumycin A in Konzentrationen von 1–10 µg/ml inkubiert. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden daraufhin die Messungen durchgeführt. Die Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche wurde anhand der Bindung von Annexin-V, das Zellvolumen mit dem Vorwärtsstreulicht, intrazelluläres Calcium anhand der Fluo3-Fluoreszenz, oxidativer Stress anhand der DCFDA-abhängigen Fluoreszenz und Ceramid mit spezifischen

Antikörpern bestimmt. Die Calciumabhängigkeit wurde unter Verwendung von calciumfreier Ringerlösung und die Beteiligung von Kinasen mittels Kinase-Inhibitoren beurteilt. Die Hämolyse wurde mittels photometrischer Messung der Hämoglobinkonzentration im Überstand abgeschätzt.

Ergebnisse: Licochalcone A erhöhte den Prozentsatz der Annexin-V-bindenden Zellen signifikant ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$), verringerte das Vorwärtsstreulicht signifikant ($2,5\text{--}5 \mu\text{g/ml}$), erhöhte die Fluo3-Fluoreszenz signifikant ($\geq 7,5 \mu\text{g/ml}$) und erhöhte Ceramid signifikant ($10 \mu\text{g/ml}$). Durch eine calciumfreie extrazelluläre Lösung wurde die Annexin-V-Bindung nicht signifikant beeinflusst, jedoch die Hämolyse signifikant erhöht.

Manumycin A in einer Konzentration von $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ erhöhte den Prozentsatz der Annexin-V-bindenden Zellen signifikant, verringerte das Vorwärtsstreulicht signifikant und erhöhte die Hämolyse signifikant. Der Effekt von Manumycin A ($10 \mu\text{g/ml}$) auf Erythrozyten wurde durch eine calciumfreie extrazelluläre Lösung, durch Staurosporine ($1\mu\text{M}$) und SB203580 ($2\mu\text{M}$) signifikant abgeschwächt.

Perifosine in einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$ erhöhte den Prozentsatz an Annexin-V-bindenden Zellen und verringerte das Vorwärtsstreulicht signifikant. Perifosine erhöhte den Prozentsatz hämolysierter Erythrozyten signifikant ($>0,5 \mu\text{g/ml}$), erhöhte die Fluo3-Fluoreszenz signifikant ($2,5 \mu\text{g/ml}$), verringerte aber die DCFDA-Fluoreszenz und die Ceramid-abhängige Fluoreszenz signifikant ($2,5 \mu\text{g/ml}$). Der Effekt von Perifosine ($2,5 \mu\text{g/ml}$) auf die Annexin-V-Bindung wurde signifikant gehemmt durch eine calciumfreie extrazelluläre Lösung und durch Hinzugabe von Staurosporine ($1\mu\text{M}$), nicht jedoch von SB203580 ($2\mu\text{M}$).

Schlussfolgerungen: Licochalcone A führt zu Zellschrumpfung und Phospholipidscrambling der Erythrozytenmembran. Der Effekt ist unabhängig vom Calciumeinstrom und wahrscheinlich teilweise durch Ceramid hervorgerufen.

Manumycin A verursacht Hämolyse, Zellschrumpfung und Phospholipidscrambling der Erythrozytenmembran. Dieser Effekt ist teilweise, aber nicht vollständig abhängig vom Calciumeinstrom und von Staurosporine- und SB203580-sensitiven Kinasen.

Perifosine verursacht Eryptose, ein Effekt, welcher zumindest zum Teil von Calciumeinstrom und Aktivierung von Staurosporine-sensitiven Kinasen abhängt.

6. Literaturverzeichnis

1. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
2. Savitskaya, M.A. and G.E. Onishchenko, *Mechanisms of Apoptosis*. Biochemistry (Mosc), 2015. **80**(11): p. 1393-405.
3. Bratosin, D., et al., *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria*. Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1143-56.
4. Lang, K.S., et al., *Mechanisms of suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(5): p. 195-202.
5. Kim, J.S., et al., *Licochalcone A induces apoptosis in KB human oral cancer cells via a caspase-dependent FasL signaling pathway*. Oncol Rep, 2014. **31**(2): p. 755-62.
6. Li, J.G., et al., *Manumycin induces apoptosis in prostate cancer cells*. Onco Targets Ther, 2014. **7**: p. 771-7.
7. Shen, J., et al., *Preclinical evaluation of perifosine as a potential promising anti-rhabdomyosarcoma agent*. Tumour Biol, 2016. **37**(1): p. 1025-33.
8. Cho, D.C., et al., *Two phase 2 trials of the novel Akt inhibitor perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma after progression on vascular endothelial growth factor-targeted therapy*. Cancer, 2012. **118**(24): p. 6055-62.
9. Repsold, L. and A.M. Joubert, *Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 9405617.
10. WALTEMATH, C.L., *Oxygen, Uptake, Transport, and Tissue Utilization*. Anesthesia & Analgesia, 1970. **49**(1): p. 184-203.
11. Arastéh, K., et al., *Innere Medizin*. 2013, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
12. Meier, P., A. Finch, and G. Evan, *Apoptosis in development*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 796-801.
13. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
14. Eckert, A., et al., *Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1627-34.
15. Tatton, W.G., et al., *Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S61-70; discussion S70-2.
16. Labi, V. and M. Erlacher, *How cell death shapes cancer*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1675.
17. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-42.
18. Poon, I.K., et al., *Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 166-80.
19. Lang, E. and F. Lang, *Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **39**: p. 35-42.
20. Bhardwaj, A. and B.B. Aggarwal, *Receptor-Mediated Choreography of Life and Death*. Journal of Clinical Immunology, 2003. **23**(5): p. 317-332.
21. Shalini, S., et al., *Old, new and emerging functions of caspases*. Cell Death Differ, 2015. **22**(4): p. 526-39.

22. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
23. Ware, C.F., *The TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 181-4.
24. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
25. Ott, M., et al., *Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex?* Cell Death Differ, 2009. **16**(8): p. 1075-82.
26. Testa, U., *Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis*. Leukemia, 2004. **18**(7): p. 1176-99.
27. Zou, H., et al., *An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
28. Kadowaki, H., H. Nishitoh, and H. Ichijo, *Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(1-2): p. 93-100.
29. Duez, J., et al., *Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method*. Transfus Clin Biol, 2015. **22**(3): p. 151-7.
30. Lang, P.A., et al., *Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(6): p. C1553-60.
31. Woon, L.A., et al., *Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts*. Cell Calcium, 1999. **25**(4): p. 313-20.
32. Lang, E., et al., *Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death*. Apoptosis, 2015. **20**(5): p. 758-67.
33. Lang, E. and F. Lang, *Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 513518.
34. Duranton, C., S.M. Huber, and F. Lang, *Oxidation induces a Cl⁻-dependent cation conductance in human red blood cells*. J Physiol, 2002. **539**(Pt 3): p. 847-55.
35. Lang, K.S., et al., *Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes*. Cell Death Differ, 2004. **11**(2): p. 231-43.
36. Foller, M., S.M. Huber, and F. Lang, *Erythrocyte programmed cell death*. IUBMB Life, 2008. **60**(10): p. 661-8.
37. Bissinger, R., et al., *Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases*. Febs j, 2019. **286**(5): p. 826-854.
38. Klarl, B.A., et al., *Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(1): p. C244-53.
39. Gatidis, S., et al., *p38 MAPK activation and function following osmotic shock of erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(6): p. 1279-86.
40. Bhavsar, S.K., et al., *Janus kinase 3 is expressed in erythrocytes, phosphorylated upon energy depletion and involved in the regulation of suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(5): p. 547-56.
41. Zelenak, C., et al., *Protein kinase CK1alpha regulates erythrocyte survival*. Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(1-2): p. 171-80.
42. Ghashghaieina, M., et al., *The impact of erythrocyte age on eryptosis*. Br J Haematol, 2012. **157**(5): p. 606-14.

43. Borst, O., et al., *Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(4): p. C644-51.
44. Andrews, D.A. and P.S. Low, *Role of red blood cells in thrombosis*. Curr Opin Hematol, 1999. **6**(2): p. 76-82.
45. Chung, S.M., et al., *Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 414-21.
46. Zwaal, R.F., P. Comfurius, and E.M. Bevers, *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(9): p. 971-88.
47. Abed, M., et al., *Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(9): p. C991-9.
48. Closse, C., J. Dachary-Prigent, and M.R. Boisseau, *Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 300-2.
49. Gallagher, P.G., et al., *Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4625-7.
50. Lang, F., K. Jilani, and E. Lang, *Therapeutic potential of manipulating suicidal erythrocyte death*. Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(9): p. 1219-27.
51. Foller, M., et al., *Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(3-4): p. 133-40.
52. Birka, C., et al., *Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion*. Pflugers Arch, 2004. **448**(5): p. 471-7.
53. Abed, M., et al., *Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation*. Kidney Blood Press Res, 2013. **37**(6): p. 567-78.
54. Kempe, D.S., et al., *Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes*. Faseb j, 2006. **20**(2): p. 368-70.
55. Qadri, S.M., et al., *Enhanced suicidal erythrocyte death in mice carrying a loss-of-function mutation of the adenomatous polyposis coli gene*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(5): p. 1085-93.
56. Lang, E., et al., *Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: A potential target in the treatment of tumor-associated anemia*. Int J Cancer, 2017.
57. Attanzio, A., et al., *Increased eryptosis in smokers is associated with the antioxidant status and C-reactive protein levels*. Toxicology, 2019. **411**: p. 43-48.
58. Nicolay, J.P., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal*. Cell Physiol Biochem, 2006. **18**(4-5): p. 223-32.
59. Awasthi, S., et al., *Advanced Glycation-Modified Human Serum Albumin Evokes Alterations in Membrane and Eryptosis in Erythrocytes*. Appl Biochem Biotechnol, 2015. **177**(5): p. 1013-24.
60. Bissinger, R., et al., *Reduced Erythrocyte Survival in Uremic Patients Under Hemodialysis or Peritoneal Dialysis*. Kidney Blood Press Res, 2016. **41**(6): p. 966-977.
61. Bonan, N.B., et al., *Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia*. Blood Purif, 2016. **41**(4): p. 317-23.
62. Virzì, G.M., et al., *Eryptosis Is Altered in Peritoneal Dialysis Patients*. Blood Purification, 2019. **48**(4): p. 351-357.

63. Xu, W., et al., *The emerging roles of eryptosis in liver diseases*. *Transfusion Clinique et Biologique*, 2019. **26**(4): p. 336-340.
64. Bartolmas, T., et al., *Eryptosis in autoimmune haemolytic anaemia*. *Eur J Haematol*, 2018. **100**(1): p. 36-44.
65. Lang, P.A., et al., *Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome*. *J Mol Med (Berl)*, 2006. **84**(5): p. 378-88.
66. Kempe, D.S., et al., *Suicidal erythrocyte death in sepsis*. *J Mol Med (Berl)*, 2007. **85**(3): p. 273-81.
67. Lang, P.A., et al., *Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide*. *Nat Med*, 2007. **13**(2): p. 164-70.
68. Boulet, C., C.D. Doerig, and T.G. Carvalho, *Manipulating Eryptosis of Human Red Blood Cells: A Novel Antimalarial Strategy?* *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 419.
69. Nicolay, J.P., et al., *Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide*. *Pflugers Arch*, 2008. **456**(2): p. 293-305.
70. Bhavsar, S.K., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by alpha-lipoic acid*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **26**(6): p. 859-68.
71. Niemoeller, O.M., et al., *Stimulation of eryptosis by aluminium ions*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **217**(2): p. 168-75.
72. Foller, M., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by amantadine*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **581**(1-2): p. 13-8.
73. Nicolay, J.P., et al., *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by amiodarone*. *Cell Physiol Biochem*, 2007. **20**(6): p. 1043-50.
74. Attanasio, P., et al., *Stimulation of eryptosis by anti-A IgG antibodies*. *Cell Physiol Biochem*, 2007. **20**(5): p. 591-600.
75. Biswas, D., et al., *Mechanism of erythrocyte death in human population exposed to arsenic through drinking water*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **230**(1): p. 57-66.
76. Geiger, C., et al., *Azathioprine-induced suicidal erythrocyte death*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(8): p. 1027-32.
77. Lupescu, A., et al., *Triggering of suicidal erythrocyte death by celecoxib*. *Toxins (Basel)*, 2013. **5**(9): p. 1543-54.
78. Mahmud, H., M. Foller, and F. Lang, *Suicidal erythrocyte death triggered by cisplatin*. *Toxicology*, 2008. **249**(1): p. 40-4.
79. Jilani, K., et al., *Fluoxetine induced suicidal erythrocyte death*. *Toxins (Basel)*, 2013. **5**(7): p. 1230-43.
80. Sopjani, M., M. Foller, and F. Lang, *Gold stimulates Ca²⁺ entry into and subsequent suicidal death of erythrocytes*. *Toxicology*, 2008. **244**(2-3): p. 271-9.
81. Shaik, N., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by ipratropium bromide*. *Cell Physiol Biochem*, 2012. **30**(6): p. 1517-25.
82. Foller, M., et al., *Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death*. *J Physiol Pharmacol*, 2009. **60**(3): p. 135-43.
83. Nicolay, J.P., et al., *Lithium-induced suicidal erythrocyte death*. *J Psychopharmacol*, 2010. **24**(10): p. 1533-9.
84. Mahmud, H., M. Foller, and F. Lang, *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by methyl dopa*. *Kidney Blood Press Res*, 2008. **31**(5): p. 299-306.
85. Munoz, C., et al., *Effect of miltefosine on erythrocytes*. *Toxicol In Vitro*, 2013. **27**(6): p. 1913-9.

86. Foller, M., et al., *Triggering of suicidal erythrocyte death by radiocontrast agents*. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(7): p. 576-83.
87. Niemoeller, O.M., et al., *Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2008. **21**(1-3): p. 193-202.
88. Oswald, G., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by ribavirin*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014. **114**(4): p. 311-7.
89. Abed, M., et al., *Stimulation of suicidal death of erythrocytes by rifampicin*. Toxicology, 2012. **302**(2-3): p. 123-8.
90. Sopjani, M., et al., *Silver ion-induced suicidal erythrocyte death*. J Appl Toxicol, 2009. **29**(6): p. 531-6.
91. Lupescu, A., et al., *Enhanced erythrocyte membrane exposure of phosphatidylserine following sorafenib treatment: an in vivo and in vitro study*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(4): p. 876-88.
92. Shaik, N., A. Lupescu, and F. Lang, *Sunitinib-sensitive suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(3): p. 512-22.
93. Qadri, S.M., et al., *Stimulation of ceramide formation and suicidal erythrocyte death by vitamin K(3) (menadione)*. Eur J Pharmacol, 2009. **623**(1-3): p. 10-3.
94. Niemoeller, O.M., et al., *Adenosine protects against suicidal erythrocyte death*. Pflugers Arch, 2007. **454**(3): p. 427-39.
95. Brand, V., et al., *Influence of amitriptyline on eryptosis, parasitemia and survival of Plasmodium berghei-infected mice*. Cell Physiol Biochem, 2008. **22**(5-6): p. 405-12.
96. Floride, E., et al., *Caffeine inhibits suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2008. **22**(1-4): p. 253-60.
97. Shaik, N., M. Zbidah, and F. Lang, *Inhibition of Ca(2+) entry and suicidal erythrocyte death by naringin*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(3): p. 678-86.
98. Tang, F., et al., *Inhibition of Suicidal Erythrocyte Death by Chronic Hypoxia*. High Alt Med Biol, 2019. **20**(2): p. 112-119.
99. Dunlap, T.L., et al., *Differential Effects of Glycyrrhiza Species on Genotoxic Estrogen Metabolism: Licochalcone A Downregulates P450 1B1, whereas Isoliquiritigenin Stimulates It*. Chem Res Toxicol, 2015. **28**(8): p. 1584-94.
100. Park, J.M., et al., *Special licorice extracts containing lowered glycyrrhizin and enhanced licochalcone A prevented Helicobacter pylori-initiated, salt diet-promoted gastric tumorigenesis*. Helicobacter, 2014. **19**(3): p. 221-36.
101. Feldman, M. and D. Grenier, *Cranberry proanthocyanidins act in synergy with licochalcone A to reduce Porphyromonas gingivalis growth and virulence properties, and to suppress cytokine secretion by macrophages*. J Appl Microbiol, 2012. **113**(2): p. 438-47.
102. Fontes, L.B., et al., *Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Pharm Pharmacol, 2014. **66**(6): p. 886-94.
103. Hao, H., et al., *Effect of licochalcone A on growth and properties of Streptococcus suis*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e67728.
104. Tsai, J.P., et al., *Licochalcone A suppresses migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells through downregulation of MKK4/JNK via NF-kappaB mediated urokinase plasminogen activator expression*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86537.
105. Huang, H.C., et al., *Licochalcone A inhibits the migration and invasion of human lung cancer cells via inactivation of the Akt signaling pathway with*

- downregulation of MMP-1/-3 expression. *Tumour Biol*, 2014. **35**(12): p. 12139-49.
106. Fu, Y., et al., *Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (Glycyrrhiza glabra), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(1): p. 263-70.
 107. Tsai, J.P., et al., *Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(30): p. 28851-66.
 108. Hong, S.H., et al., *Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects of Licochalcone A through ROS-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(15).
 109. Yo, Y.T., et al., *Licorice and licochalcone-A induce autophagy in LNCaP prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression and the mTOR pathway*. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(18): p. 8266-73.
 110. Shen, T.S., et al., *Licochalcone A Suppresses the Proliferation of Osteosarcoma Cells through Autophagy and ATM-Chk2 Activation*. *Molecules*, 2019. **24**(13).
 111. Shen, H., et al., *Antimetastatic effects of licochalcone A on oral cancer via regulating metastasis-associated proteases*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(8): p. 7467-74.
 112. Cho, J.J., et al., *Licochalcone A, a natural chalconoid isolated from Glycyrrhiza inflata root, induces apoptosis via Sp1 and Sp1 regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma*. *Int J Oncol*, 2014. **45**(2): p. 667-74.
 113. Park, M.R., et al., *Licochalcone-A induces intrinsic and extrinsic apoptosis via ERK1/2 and p38 phosphorylation-mediated TRAIL expression in head and neck squamous carcinoma FaDu cells*. *Food Chem Toxicol*, 2015. **77**: p. 34-43.
 114. Choi, A.Y., et al., *Licochalcone A induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress via a phospholipase Cgamma1-, Ca(2+)-, and reactive oxygen species-dependent pathway in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells*. *Apoptosis*, 2014. **19**(4): p. 682-97.
 115. Hao, W., et al., *Licochalcone A-induced human gastric cancer BGC-823 cells apoptosis by regulating ROS-mediated MAPKs and PI3K/AKT signaling pathways*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10336.
 116. Xiao, X.Y., et al., *Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis*. *Cancer Lett*, 2011. **302**(1): p. 69-75.
 117. Yang, P., et al., *Licochalcone-A sensitizes human esophageal carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of XIAP*. *Hepatology*, 2014. **61**(133): p. 1229-34.
 118. Rafi, M.M., et al., *Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(4): p. 2653-8.
 119. Kim, Y.J., et al., *Licochalcone A enhances geldanamycin-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated caspase activation*. *Pharmacology*, 2013. **92**(1-2): p. 49-59.
 120. Lee, C.S., et al., *Guanylate cyclase activator YC-1 potentiates apoptotic effect of licochalcone A on human epithelial ovarian carcinoma cells via activation of death receptor and mitochondrial pathways*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **683**(1-3): p. 54-62.

121. Jiang, J., et al., *Licochalcone A inhibiting proliferation of bladder cancer T24 cells by inducing reactive oxygen species production*. Biomed Mater Eng, 2014. **24**(1): p. 1019-25.
122. Yuan, X., et al., *Licochalcone A-induced human bladder cancer T24 cells apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 474272.
123. Kim, K.H., et al., *Licochalcone A induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma through downregulation of Sp1 and subsequent activation of mitochondria-related apoptotic pathway*. Int J Oncol, 2015. **46**(3): p. 1385-92.
124. Coxon, J.P., et al., *Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation*. BJU Int, 2004. **94**(1): p. 164-70.
125. Song, N.R., et al., *Licochalcone A, a polyphenol present in licorice, suppresses UV-induced COX-2 expression by targeting PI3K, MEK1, and B-Raf*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(3): p. 4453-70.
126. He, W., et al., *Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by licochalcone A, a naturally occurring constituent of licorice*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(7): p. 1569-76.
127. Oh, G.S., et al., *Selective inhibition of liver X receptor alpha-mediated lipogenesis in primary hepatocytes by licochalcone A*. Chin Med, 2015. **10**: p. 8.
128. Kuhnle, J., et al., *Licochalcone A activates Nrf2 in vitro and contributes to licorice extract-induced lowered cutaneous oxidative stress in vivo*. Exp Dermatol, 2015. **24**(1): p. 42-7.
129. Boonchai, W., et al., *Randomized investigator-blinded comparative study of moisturizer containing 4-t-butylcyclohexanol and licochalcone A versus 0.02% triamcinolone acetonide cream in facial dermatitis*. J Cosmet Dermatol, 2018. **17**(6): p. 1130-1135.
130. Shang, F., et al., *The effect of licochalcone A on cell-aggregates ECM secretion and osteogenic differentiation during bone formation in metaphyseal defects in ovariectomized rats*. Biomaterials, 2014. **35**(9): p. 2789-97.
131. Ming, L., et al., *Licochalcone A up-regulates of FasL in mesenchymal stem cells to strengthen bone formation and increase bone mass*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7209.
132. Wanankul, S., et al., *Randomized, double-blind, split-side, comparison study of moisturizer containing licochalcone A and 1% hydrocortisone in the treatment of childhood atopic dermatitis*. J Med Assoc Thai, 2013. **96**(9): p. 1135-42.
133. Chu, X., et al., *Attenuation of allergic airway inflammation in a murine model of asthma by Licochalcone A*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2013. **35**(6): p. 653-61.
134. Kim, S.H., et al., *Role of licochalcone A on thymic stromal lymphopoietin expression: implications for asthma*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(1): p. 26-33.
135. Huang, W.C., et al., *Protective Effects of Licochalcone A Improve Airway Hyper-Responsiveness and Oxidative Stress in a Mouse Model of Asthma*. Cells, 2019. **8**(6).
136. Sackova, V., et al., *Enhanced antiproliferative and apoptotic response of HT-29 adenocarcinoma cells to combination of photoactivated hypericin and farnesyltransferase inhibitor manumycin A*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(12): p. 8388-405.

137. Ali, B.R., et al., *The farnesyltransferase inhibitor manumycin A is a novel trypanocide with a complex mode of action including major effects on mitochondria*. Mol Biochem Parasitol, 1999. **104**(1): p. 67-80.
138. Xiong, Q. and Y. Rikihisa, *The prenylation inhibitor manumycin A reduces the viability of Anaplasma phagocytophilum*. J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 6): p. 744-9.
139. Ito, T., et al., *Suppression of human pancreatic cancer growth in BALB/c nude mice by manumycin, a farnesyl:protein transferase inhibitor*. Jpn J Cancer Res, 1996. **87**(2): p. 113-6.
140. Frassanito, M.A., et al., *Manumycin inhibits farnesyltransferase and induces apoptosis of drug-resistant interleukin 6-producing myeloma cells*. Br J Haematol, 2002. **118**(1): p. 157-65.
141. Frassanito, M.A., et al., *Blockade of the Ras pathway by manumycin, a farnesyltransferase inhibitor, overcomes the resistance of myeloma plasma cells to Fas-induced apoptosis*. Clin Exp Med, 2005. **4**(4): p. 174-82.
142. Hu, W., et al., *Increased expression of heat shock protein 70 in adherent ovarian cancer and mesothelioma following treatment with manumycin, a farnesyl transferase inhibitor*. Anticancer Res, 2002. **22**(2A): p. 665-72.
143. Wang, W. and R.J. Macaulay, *Apoptosis of medulloblastoma cells in vitro follows inhibition of farnesylation using manumycin A*. Int J Cancer, 1999. **82**(3): p. 430-4.
144. Nagase, T., et al., *Manumycin and gliotoxin derivative KT7595 block Ras farnesylation and cell growth but do not disturb lamin farnesylation and localization in human tumour cells*. Br J Cancer, 1997. **76**(8): p. 1001-10.
145. Sharma, V., et al., *Farnesyltransferase inhibitor manumycin targets IL1beta-Ras-HIF-1alpha axis in tumor cells of diverse origin*. Inflammation, 2012. **35**(2): p. 516-9.
146. Kainuma, O., et al., *Inhibition of growth and invasive activity of human pancreatic cancer cells by a farnesyltransferase inhibitor, manumycin*. Pancreas, 1997. **15**(4): p. 379-83.
147. Di Paolo, A., et al., *Manumycin inhibits ras signal transduction pathway and induces apoptosis in COLO320-DM human colon tumour cells*. Br J Cancer, 2000. **82**(4): p. 905-12.
148. Tsuda, M., et al., *Suppressive effect of RAS inhibitor manumycin A on aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced rat colorectal carcinogenesis model*. J Gastroenterol Hepatol, 2013. **28**(10): p. 1616-23.
149. Cecdlova, E., et al., *Manumycin A downregulates release of proinflammatory cytokines from TNF alpha stimulated human monocytes*. Immunol Lett, 2016. **169**: p. 8-14.
150. Sugita, M., H. Sugita, and M. Kaneki, *Farnesyltransferase inhibitor, manumycin a, prevents atherosclerosis development and reduces oxidative stress in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1390-5.
151. Kouchi, H., et al., *Manumycin A, inhibitor of ras farnesyltransferase, inhibits proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(3): p. 915-20.
152. Oana, K., et al., *Manumycin A corrects aberrant splicing of Cln1 in myotonic dystrophy type 1 (DMI) mice*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2142.

153. Cho, J.J., et al., *Manumycin A from a new Streptomyces strain induces endoplasmic reticulum stress-mediated cell death through specificity protein 1 signaling in human oral squamous cell carcinoma*. *Int J Oncol*, 2015. **47**(5): p. 1954-62.
154. Carey, G.B., S.K. Roy, and H. Daino, *The natural tumorcide Manumycin-A targets protein phosphatase 1alpha and reduces hydrogen peroxide to induce lymphoma apoptosis*. *Exp Cell Res*, 2015. **332**(1): p. 136-45.
155. She, M., et al., *Redox control of manumycin A-induced apoptosis in anaplastic thyroid cancer cells: involvement of the xenobiotic apoptotic pathway*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(3): p. 275-80.
156. She, M., et al., *Enhancement of manumycin A-induced apoptosis by methoxyamine in myeloid leukemia cells*. *Leukemia*, 2005. **19**(4): p. 595-602.
157. Zhou, J.M., et al., *Manumycin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells*. *Int J Mol Med*, 2003. **12**(6): p. 955-9.
158. Zhou, J.M., et al., *Manumycin inhibits cell proliferation and the Ras signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells*. *Int J Mol Med*, 2003. **11**(6): p. 767-71.
159. Singha, P.K., et al., *Manumycin A inhibits triple-negative breast cancer growth through LC3-mediated cytoplasmic vacuolation death*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e457.
160. Pan, J., et al., *Bcl-2-associated X protein is the main mediator of manumycin a-induced apoptosis in anaplastic thyroid cancer cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(6): p. 3583-91.
161. Dixit, D., et al., *Manumycin inhibits STAT3, telomerase activity, and growth of glioma cells by elevating intracellular reactive oxygen species generation*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(4): p. 364-74.
162. Bernier, M., et al., *Binding of manumycin A inhibits IkappaB kinase beta activity*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(5): p. 2551-61.
163. Sears, K.T., H. Daino, and G.B. Carey, *Reactive oxygen species-dependent destruction of MEK and Akt in Manumycin stimulated death of lymphoid tumor and myeloma cell lines*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(7): p. 1496-505.
164. Briglia, M., et al., *Edelfosine Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2015. **37**(6): p. 2221-30.
165. Sun, W. and S. Modak, *Emerging treatment options for the treatment of neuroblastoma: potential role of perifosine*. *Onco Targets Ther*, 2012. **5**: p. 21-9.
166. Kim, M.N., et al., *Efficacy of perifosine alone and in combination with sorafenib in an HrasG12V plus shp53 transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015. **76**(2): p. 257-67.
167. Zitzmann, K., et al., *Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms*. *Endocr Relat Cancer*, 2012. **19**(3): p. 423-34.
168. Srivastava, N. and D.C. Cho, *Perifosine in renal cell carcinoma*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013. **22**(2): p. 285-91.
169. Gills, J.J. and P.A. Dennis, *Perifosine: update on a novel Akt inhibitor*. *Curr Oncol Rep*, 2009. **11**(2): p. 102-10.
170. Kondapaka, S.B., et al., *Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(11): p. 1093-103.
171. Fensterle, J., et al., *Current view on the mechanism of action of perifosine in cancer*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014. **14**(4): p. 629-35.

172. Ji, C., et al., *Perifosine sensitizes UVB-induced apoptosis in skin cells: new implication of skin cancer prevention?* Cell Signal, 2012. **24**(9): p. 1781-9.
173. Yao, C., et al., *Perifosine induces cell apoptosis in human osteosarcoma cells: new implication for osteosarcoma therapy?* Cell Biochem Biophys, 2013. **65**(2): p. 217-27.
174. Holohan, B., et al., *Perifosine as a potential novel anti-telomerase therapy.* Oncotarget, 2015. **6**(26): p. 21816-26.
175. Kumar, A., et al., *The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis and p21-mediated cell cycle arrest in medulloblastoma.* Mol Cancer Res, 2009. **7**(11): p. 1813-21.
176. Patel, V., et al., *Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest.* Cancer Res, 2002. **62**(5): p. 1401-9.
177. Tong, Y., et al., *Perifosine induces protective autophagy and upregulation of ATG5 in human chronic myelogenous leukemia cells in vitro.* Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(4): p. 542-50.
178. Zheng, K., et al., *Low-concentration of perifosine surprisingly protects cardiomyocytes from oxygen glucose deprivation.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **469**(3): p. 753-760.
179. Meng, H., et al., *SNS-032 inhibits mTORC1/mTORC2 activity in acute myeloid leukemia cells and has synergistic activity with perifosine against Akt.* J Hematol Oncol, 2013. **6**: p. 18.
180. Friedman, D.R., et al., *Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II clinical trial and in vitro studies.* Leuk Lymphoma, 2014. **55**(5): p. 1067-75.
181. Engel, J.B., et al., *Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **141**(1): p. 64-9.
182. Engel, J.B., et al., *Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers.* Arch Gynecol Obstet, 2011. **283**(3): p. 603-10.
183. Hideshima, T., et al., *Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells.* Blood, 2006. **107**(10): p. 4053-62.
184. Li, Z., et al., *In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine.* J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(11): p. 758-70.
185. Shen, J., L. Xu, and Q. Zhao, *Perifosine and ABT-737 synergistically inhibit lung cancer cells in vitro and in vivo.* Biochem Biophys Res Commun, 2016. **473**(4): p. 1170-6.
186. Zhang, J., Y. Hong, and J. Shen, *Combination treatment with perifosine and MEK-162 demonstrates synergism against lung cancer cells in vitro and in vivo.* Tumour Biol, 2015. **36**(7): p. 5699-706.
187. Al Sawah, E., et al., *Perifosine, an AKT inhibitor, modulates ovarian cancer cell line sensitivity to cisplatin-induced growth arrest.* Gynecol Oncol, 2013. **131**(1): p. 207-12.

188. Pinton, G., et al., *Perifosine as a potential novel anti-cancer agent inhibits EGFR/MET-AKT axis in malignant pleural mesothelioma*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36856.
189. Sun, H., T. Yu, and J. Li, *Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition*. Cancer Lett, 2011. **310**(1): p. 118-28.
190. Chen, M.B., et al., *Perifosine sensitizes curcumin-induced anti-colorectal cancer effects by targeting multiple signaling pathways both in vivo and in vitro*. Int J Cancer, 2012. **131**(11): p. 2487-98.
191. Dasmahapatra, G.P., et al., *In vitro combination treatment with perifosine and UCN-01 demonstrates synergism against prostate (PC-3) and lung (A549) epithelial adenocarcinoma cell lines*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 5242-52.
192. Xin, Y., et al., *Perifosine inhibits S6K1-Gli1 signaling and enhances gemcitabine-induced anti-pancreatic cancer efficiency*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **73**(4): p. 711-9.
193. Gao, Y., et al., *The alkylphospholipid, perifosine, radiosensitizes prostate cancer cells both in vitro and in vivo*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 39.
194. Vink, S.R., et al., *Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perifosine in cell culture and xenografts*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1615-22.
195. Li, Z., et al., *Perifosine-induced inhibition of Akt attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma in vivo*. Cancer, 2011. **117**(23): p. 5412-22.
196. Jakubowiak, A.J., et al., *Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study*. Br J Haematol, 2012. **158**(4): p. 472-80.
197. Fu, S., et al., *Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(1): p. 47-53.
198. Kushner, B.H., et al., *A phase I/IIb trial targeting the Pi3k/Akt pathway using perifosine: Long-term progression-free survival of patients with resistant neuroblastoma*. Int J Cancer, 2017. **140**(2): p. 480-484.
199. Bendell, J.C., et al., *Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(33): p. 4394-400.
200. Richardson, P.G., et al., *Perifosine plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma previously treated with bortezomib: results of a multicenter phase I/II trial*. J Clin Oncol, 2011. **29**(32): p. 4243-9.
201. Guidetti, A., et al., *Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(22): p. 5641-51.
202. Bailey, H.H., et al., *Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma*. Cancer, 2006. **107**(10): p. 2462-7.
203. Posadas, E.M., et al., *A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(10): p. 1133-7.

204. Crul, M., et al., *Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours*. Eur J Cancer, 2002. **38**(12): p. 1615-21.
205. Unger, C., et al., *First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumours*. Eur J Cancer, 2010. **46**(5): p. 920-5.
206. Jemaà, M., et al., *Methods Employed in Cytofluorometric Assessment of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. **43**(2): p. 431-444.
207. Egler, J. and F. Lang, *Triggering of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death, by Perifosine*. Cell Physiol Biochem, 2017. **41**(6): p. 2534-2544.
208. Egler, J., J. Zierle, and F. Lang, *Stimulating Effect of Manumycin A on Suicidal Erythrocyte Death*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(3): p. 1147-56.
209. Egler, J. and F. Lang, *Licochalcone A Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(5): p. 2060-70.
210. Wuest, M., et al., *Targeting phosphatidylserine for radionuclide-based molecular imaging of apoptosis*. Apoptosis, 2019. **24**(3): p. 221-244.
211. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
212. Stern, A.D., A.H. Rahman, and M.R. Birtwistle, *Cell size assays for mass cytometry*. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology, 2017. **91**(1): p. 14-24.
213. Lang, F., et al., *Ceramide in suicidal death of erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(1): p. 21-8.
214. Gonzales, J., S.C. Jim Yeung, and J.A. Smith, *High-performance liquid chromatographic assay validation of Manumycin A in mouse plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **776**(2): p. 177-82.
215. Figg, W.D., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of oral perifosine with different loading schedules in patients with refractory neoplasms*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **74**(5): p. 955-67.
216. Voelkl, J., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by increased extracellular phosphate concentrations*. Kidney Blood Press Res, 2013. **38**(1): p. 42-51.
217. Abed, M., et al., *Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 871-9.
218. Calderon-Salinas, J.V., et al., *Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease*. Mol Cell Biochem, 2011. **357**(1-2): p. 171-9.
219. Lang, E., et al., *Conjugated bilirubin triggers anemia by inducing erythrocyte death*. Hepatology, 2015. **61**(1): p. 275-84.
220. Lang, E., S.M. Qadri, and F. Lang, *Killing me softly - suicidal erythrocyte death*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1236-43.
221. Harrison, H.E., et al., *THE PATHOGENESIS OF THE RENAL INJURY PRODUCED IN THE DOG BY HEMOGLOBIN OR METHEMOGLOBIN*. J Exp Med, 1947. **86**(4): p. 339-56.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie erfolgte am physiologischen Institut der Universität Tübingen unter Betreuung und Konzeption von Professor Dr. med. Dr. h.c. Florian Lang. Er verfasste die in Kapitel 8 genannten Publikationen. Herr Dr. Kousi Alzoubi wies mich in das wissenschaftliche und experimentelle Arbeiten ein, zeigte mir die Erstellung von Diagrammen und die statistische Auswertung der Ergebnisse. Herr Dr. Alzoubi und Frau Dr. Rosi Bissinger waren bei Fragen und Problemen meine Ansprechpartner.

Nach Einweisung und Erklärung des Versuchsablaufs durch Dr. Alzoubi führte ich die Versuche selbstständig durch. Die Abbildungen und statistische Auswertung erstellte ich unter Anleitung von Dr. Alzoubi ebenfalls selbstständig. Herr Jens Zierle half mir bei Fragen zur Versuchsplanung sowie zur Erstellung des Manuskripts. Frau Erika Egler, Herr Johann Egler und Herr Alexander Lauer haben das Manuskript auf sprachliche Fehler und Rechtschreibfehler korrigiert. Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 05.07.2020

Jasmin Yvonne Egler

8. Veröffentlichungen

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

Egler, J. und F. Lang – Licochalcone A Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes – *Cell Physiol Biochem* – 2015 – 37(5) – S. 2060-70

Egler, J., J. Zierle, und F. Lang – Stimulating Effect of Manumycin A on Suicidal Erythrocyte Death – *Cell Physiol Biochem* – 2016 – 38(3) – S. 1147-56

Egler, J. und F. Lang – Triggering of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death, by Perifosine – *Cell Physiol Biochem* – 2017 – 41(6) – S. 2534-2544.

9. Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Florian Lang für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die engagierte Betreuung. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Wieder für die kurzfristige Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Kousi Alzoubi für die außergewöhnliche Einarbeitung in das wissenschaftliche und experimentelle Arbeiten, in die statistische Auswertung und in die Erstellung der Grafiken. Nur mit diesem Handwerkszeug konnte diese Dissertation gelingen; ebenfalls ein herzliches Dankeschön für die zahlreichen unterhaltsamen Mittagspausen und Gespräche abseits der Arbeit. Danken möchte ich auch Frau Dr. Rosi Bissinger für ihr stets offenes Ohr in fachlichen, aber auch persönlichen Fragen. Euretwegen hat es immer Spaß gemacht, im Institut zu arbeiten.

Mein Dank gilt ferner Herrn Jens Zierle für den regen Austausch über Literaturrecherche, Versuchsaufbau und Verfassung des Manuskripts, was mir eine große Hilfe und moralische Stütze war.

Ein ganz besonderes Dankeschön an Herrn Alexander Lauer für die jederzeit liebevolle Motivation, die grenzenlose Geduld, die konstruktive Kritik und das gewissenhafte Korrekturlesen.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, die mich jederzeit unterstützt, motiviert und für den nötigen Ausgleich gesorgt haben.

Mein größter Dank geht an meine Familie für die bedingungslose und liebevolle Unterstützung in allen Belangen, für die kleinen Nadelstiche zur Motivation und für all die Liebe und Kraft, die ihr mir über all die Jahre gegeben habt. Ohne euch wären das Studium und die Dissertation nicht möglich gewesen.