

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I
Leiter: Professor Dr. Lang

**Mechanismen des pharmakologisch-toxikologisch
induzierten Erythrozytenzelltodes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen



vorgelegt von

Michael Olivier Niemöller
aus Heidelberg

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. I. Bernhardt

Das größte Geheimnis ist der Mensch sich selbst
(Novalis)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Taxol	- 1 -
1.1.1	Die Entdeckung von Taxol	- 1 -
1.1.2	Der Wirkmechanismus von Taxol	- 3 -
1.1.3	Die Nebenwirkungen von Taxol	- 4 -
1.1.4	Die Pharmakokinetik von Taxol	- 5 -
1.2	Aluminium	- 6 -
1.3	Apoptose	- 7 -
1.3.1	Die Entdeckung des programmierten Zelltods	- 7 -
1.3.2	Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus	- 7 -
1.3.3	Apoptose im Gegensatz zur Nekrose	- 8 -
1.3.4	Der Ablauf der Apoptose	- 9 -
1.3.5	Die Caspasen	- 10 -
1.3.6	Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren	- 11 -
1.3.7	Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Signale	- 12 -
1.3.8	Caspasenunabhängige apoptotische Vorgänge	- 12 -
1.3.9	Die Regulation der Apoptose	- 13 -
1.4	Der Zelltod bei Erythrozyten	- 14 -
1.4.1	Einführung	- 14 -
1.4.2	Erythrozytenapoptose durch erhöhtes intrazelluläres Calcium	- 15 -
1.4.3	Erythrozytenapoptose durch Bildung von Ceramid	- 16 -
1.4.4	Erythrozytenapoptose durch Caspasen	- 17 -
1.4.5	Erythrozytenapoptose und Calpaine	- 17 -
2	Materialien und Methoden	- 18 -
2.1	Einführung	- 18 -
2.2	Erythrozyten	- 18 -
2.3	Patienten	- 19 -
2.4	Blutbildanalyse der Patienten	- 20 -
2.5	Tierexperimente	- 20 -
2.5.1	Aktivierung der sauren Sphingomyelinase in vivo	- 21 -
2.5.2	Messung der mittleren Lebenszeit von Mäuseerythrozyten	- 21 -
2.6	Verwendete Substanzen	- 22 -
2.6.1	Paclitaxel, Docetaxel, Carboplatin, Doxorubicin	- 22 -
2.6.2	Aluminium	- 22 -
2.6.3	z-VAD-fmk	- 22 -
2.6.4	Ionomycin	- 23 -
2.6.5	Annexin – V – Fluos	- 23 -
2.6.6	Fluo-3/AM	- 23 -
2.6.7	Anti-Ceramid-Antikörper	- 24 -
2.6.8	α -Antikörper	- 24 -
2.6.9	Isotypischer Maus-IgM-Antikörper	- 24 -
2.6.10	Sphingomyelinase	- 24 -
2.7	Verwendete Lösungen	- 24 -
2.7.1	Ringerlösung	- 24 -
2.7.2	Calciumfreie Ringerlösung	- 25 -
2.7.4	Hypertone Lösung 850 mOsmol	- 26 -
2.7.5	Annexin- Waschpuffer	- 27 -
2.7.6	PBS-Lösung	- 27 -
2.7.7	Jurkat-Medium	- 28 -

Inhaltsverzeichnis

2.8	FACS-Analyse	28 -
2.8.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	28 -
2.8.2	Auswertung der Messdaten	31 -
2.9	Bestimmung von Phosphatidylserin im äußeren Membranblatt	31 -
2.10	Intrazelluläre Ca²⁺ Messungen mittels Fluo-3/AM	32 -
2.11	Ceramid-Bestimmung	32 -
2.12	ATP- Messung	33 -
2.13	Glutathion-Messung	34 -
2.14	Western-Blotting	35 -
2.15	Hämolysemessung	37 -
2.16	Statistik	37 -
3	Fragestellung der Arbeit	38 -
4	Ergebnisse	39 -
4.1	Taxane und Erythrozytenzelltod	39 -
4.1.1	Blutbildveränderungen unter Behandlung mit Paclitaxel	39 -
4.1.2	„Eryptose“ in der klinischen Anwendung von Paclitaxel	41 -
4.1.3	„Erythrozytenapoptose“ in vitro	44 -
4.1.3.1	Phosphatidylserin-Exposition	44 -
4.1.3.2	Zellschrumpfung	47 -
4.1.3.3	Paclitaxel in Kombination mit Stressoren	49 -
4.1.3.4	Paclitaxel in Kombination mit Glukosemangel	49 -
4.1.3.5	ATP-Gehalt unter Paclitaxel	52 -
4.1.3.6	Redoxstatus unter Paclitaxel	52 -
4.1.3.7	Paclitaxel in Kombination mit Hyperosmolarität	53 -
4.1.4	Mechanismen der Erythrozytenapoptose durch Paclitaxel	55 -
4.1.4.1	Calcium-Gehalt unter Paclitaxelbehandlung	56 -
4.1.4.2	Ceramid-Bildung unter Paclitaxelbehandlung	57 -
4.1.4.3	Ceramidbildung unter Paclitaxelbehandlung im Tiermodell	59 -
4.1.4.4	Die Rolle der Caspasen	60 -
4.1.4.4.1	Caspasenaktivierung im Western-Blot	61 -
4.1.4.4.2	Caspasenhemmung mittels Pancaspaseninhibitor	62 -
4.1.4.5	Die Rolle der Calpaine	64 -
4.1.5	Die physiologische Bedeutung der erythrozytären PS-Exposition	64 -
4.2	Aluminium und Erythrozytenzelltod	68 -
4.2.1	Phosphatidylserin-Exposition	68 -
4.2.2	Zellschrumpfung	69 -
4.2.3	Morphologische Zellveränderungen durch Aluminium	71 -
4.2.4	Mechanismen des Erythrozytentodes durch Aluminium	72 -
4.2.4.1	Calciumgehalt der Erythrozyten durch Aluminium	73 -
4.2.4.2	Abhängigkeit der PS-Exposition von Calcium	74 -
4.2.4.3	Keine Ceramidbildung der Erythrozyten durch Aluminium	75 -
4.2.4.4	ATP-Abfall durch Aluminium	77 -
4.2.4.5	Aluminium in Kombination mit Glukosemangel	78 -
4.2.4.6	Erythrozytärer Redoxstatus unter Aluminium	79 -
4.2.5	Hämolyse durch Aluminium	80 -
5	Diskussion	82 -
5.1	Eryptose	82 -
5.2	„Erythrozytenapoptose“ durch Taxane	82 -

Inhaltsverzeichnis

5.2.1	Taxane und Anämie.....	- 84 -
5.3	„Erythrozytenapoptose“ durch Aluminium.....	- 86 -
5.3.1	Mechanismen des Erythrozytenzelltodes durch Aluminium.....	- 86 -
5.3.2	Aluminium und Anämie.....	- 87 -
5.4	Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Taxanen und Aluminium..	- 88 -
5.5	Die physiologische Bedeutung der „Erythrozytenapoptose“	- 88 -
6	Zusammenfassung	- 90 -
7	Danksagung.....	- 91 -
8	Literaturverzeichnis	- 93 -
8.1	Literaturverzeichnis alphabetisch.....	- 93 -
8.2	Literaturverzeichnis chronologisch	- 115 -
9	Lebenslauf	- 133 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die chemische Struktur von Taxol bzw. dem Derivat Docetaxel (nach Mastropaolo et al. 1995,[5]).....	- 1 -
Abbildung 2: Fluo-3/AM (Calbiochem, Deutschland).....	- 23 -
Abbildung 3: Dot Plot. Die Abbildung zeigt auf der x-Achse die Forward Scatter und auf der y-Achse die Side Scatter Werte der analysierten Zellen. ...	- 30 -
Abbildung 4: Stimulation der PS-Exposition von Patienten-Erythrozyten vor und nach Infusion von Paclitaxel.....	- 42 -
Abbildung 5: Stimulation der PS-Exposition von Patienten-Erythrozyten vor und nach Infusion von Paclitaxel.....	- 43 -
Abbildung 6: Schrumpfung von PS-positiven Patienten-Erythrozyten nach Infusion von Paclitaxel.....	- 44 -
Abbildung 7: PS-Exposition durch Paclitaxel <i>in vitro</i>	- 45 -
Abbildung 8: Dosiswirkungskurve der PS-Exposition von Paclitaxel <i>in vitro</i> . -	- 46 -
Abbildung 9: Forward-Scatter unter Einwirkung von Paclitaxel.	- 48 -
Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve des Forward-Scatter unter Paclitaxel <i>in vitro</i>	- 49 -
Abbildung 11: Verstärkung der durch Glucosemangel induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Histogramme).	- 50 -
Abbildung 12: Verstärkung der durch Glucosemangel induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).....	- 51 -
Abbildung 13: Intrazelluläres ATP unter Paclitaxel.....	- 52 -
Abbildung 14: Glutathion-Gehalt unter Paclitaxel und Glukose-Mangel.	- 53 -
Abbildung 15: Verstärkung der durch Hyperosmolarität induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Histogramme).....	- 54 -
Abbildung 16: Verstärkung der durch Hyperosmolarität induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).	- 55 -
Abbildung 17: Erhöhte zytosolische Calciumkonzentration durch Paclitaxel (Histogramme).	- 56 -
Abbildung 18: Erhöhte zytosolische Calciumkonzentration durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).....	- 57 -
Abbildung 19: Vermehrte Ceramid-Bildung durch Paclitaxel (Histogramme)-	- 58 -
Abbildung 20: Vermehrte Ceramidbildung durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).....	- 59 -
Abbildung 21: Aktivierung der sauren Sphingomyelinase nach Paclitaxelinjektion <i>in vivo</i>	- 60 -
Abbildung 22: Fehlende Caspase-3-Aktivierung unter Paclitaxel in Erythrozyten.	- 61 -
Abbildung 23: Hemmung der Paclitaxel induzierten PS-Exposition in Jurkat T-Zellen, aber nicht in Erythrozyten.	- 63 -
Abbildung 24: Spaltung von μ -Calpain in Erythrozyten durch Paclitaxel.	- 64 -
Abbildung 25: Verstärkte Clearance PS-positiver Erythrozyten <i>in vivo</i> (Histogramme).	- 66 -
Abbildung 26: Verstärkte Clearance PS-positiver Erythrozyten <i>in vivo</i> (Quantitative Auswertung).....	- 67 -
Abbildung 27: PS-Exposition auf der Erythrozytenoberfläche durch Aluminiumionen (Histogramme).	- 68 -
Abbildung 28: Dosis-Wirkungsbeziehung der PS-Exposition durch Aluminium (Quantitative Auswertung).....	- 69 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: Zellschrumpfung durch Aluminium (Histogramme).....	- 70 -
Abbildung 30: Zellschrumpfung durch Aluminium (Quantitative Auswertung)-	71
-	
Abbildung 31: Morphologische Veränderungen durch Aluminium.....	- 72 -
Abbildung 32: Erhöhung des zytosolischen Calciums durch Aluminium (Histogramme).	- 73 -
Abbildung 33: Erhöhung des zytosolischen Calciums durch Aluminium (Quantitative Auswertung).....	- 74 -
Abbildung 34: Abhängigkeit der PS-Exposition von Calcium.....	- 75 -
Abbildung 35: Keine Bildung von Ceramid durch Aluminium (Histogramme)-	76
-	
Abbildung 36: : Effekt von Aluminium auf den Ceramidlevel.	- 77 -
Abbildung 37: ATP-Depletion durch Aluminium.....	- 78 -
Abbildung 38: PS-Exposition unter Bedingungen des Glukose-Mangels.	- 79 -
Abbildung 39: Intraerythrozytäres Glutathion unter Aluminium.....	- 80 -
Abbildung 40: Hämolyse durch Aluminium.	- 81 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CPD – Puffer	- 19 -
Tabelle 2: SAG – Mannitol Lösung.....	- 19 -
Tabelle 3: Ringerlösung	- 25 -
Tabelle 4: Calciumfreie Ringerlösung.....	- 25 -
Tabelle 5: Glukose-freie Lösung.....	- 26 -
Tabelle 6: Hypertone Lösung (850 mOsmol).....	- 26 -
Tabelle 7: Annexin-Waschpuffer	- 27 -
Tabelle 8: Lysepuffer.....	- 35 -
Tabelle 9: Blotting-Puffer.....	- 36 -
Tabelle 10: Differentialblutbilder vor und nach Paclitaxelinfusion.....	- 40 -
Tabelle 11: Effekte verschiedener Zytostatika auf die PS-Exposition nach 48 Stunden <i>in vitro</i>	- 47 -

1 Einleitung

1.1 Taxol

1.1.1 Die Entdeckung von Taxol

Taxol wurde im Rahmen eines groß angelegten Suchprogrammes des National Cancer Institute (USA) in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt [1]. Im Rahmen dieses Programms, bei dem ungefähr 30.000 Substanzen jährlich auf ihre zytostatische Wirkung untersucht wurden, sollte es die wichtigste Substanz werden.

1963 wurden erste Proben aus *Taxus brevifolia* gewonnen, der pazifischen Eibe, einem im Nordwesten der USA beheimateten Nadelbaum [2], und die wachstumshemmende Wirkung auf Leukämiezellen entdeckt [3]. In den folgenden Jahren gelang es der Gruppe um Wall, das wirksame Agens weiter aufzureinigen. Im Jahre 1967 entschied sich Wall für den Namen Taxol. Zu diesem Zeitpunkt war die genaue Struktur des Moleküls nicht bekannt, allerdings wusste Wall, dass es eine Hydroxylgruppe enthielt [4]. Erst 1971 gelang es, die komplexe Struktur von Taxol aufzuklären [3]. Siehe Abbildung 1.

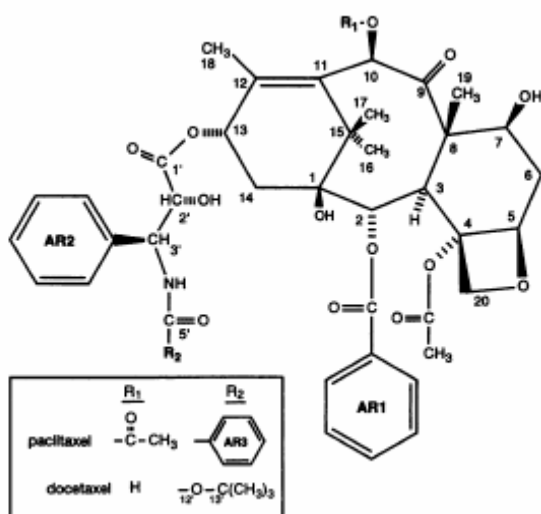


Abbildung 1: Die chemische Struktur von Taxol bzw. dem Derivat Docetaxel (nach Mastropaolo et al. 1995,[5])

Einleitung

Aufgrund schlechter Erfahrungen mit Mitoseinhibitoren, der schlechten Löslichkeit und der geringen Verfügbarkeit von Taxol wurde es in den 1970er Jahren still um diesen neuen Stoff [6]. 1979 erwachte das Interesse erneut, als Schiff den einzigartigen Mechanismus der mitosehemmenden Wirkung von Taxol entdeckte [7]. Die bis dahin bekannten Mitoseinhibitoren wie Colchizin oder die Vincaalkaloide entfalten ihre Wirkung über eine Hemmung der Polymerisation von Mikrotubulimonomeren zu den eigentlichen Mikrotubuli. Schiff hingegen konnte zeigen, dass Taxol im Gegensatz zum bisher bekannten Mechanismus eine mikrotubulistabilisierende Wirkung besitzt [8].

1983 begannen erste Phase I Studien [9-19]. Aufsehen erregte 1987 eine Studie, in der bei einer Patientin mit fortgeschrittenem, cisplatinresistenten Ovarialkarzinom mit Taxol eine lang anhaltende Remission erreicht werden konnte [10]. Nachdem das in den Phase I Studien aufgetretene Problem der allergischen Reaktionen [12] durch Prämedikation mit Kortikosteroiden und Antihistaminika gelöst war, begannen erste Phase II Studien. Ab 1989 wurden Studien zur Wirksamkeit beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom publiziert [20, 21], gefolgt von Untersuchungen bei Brustkrebs [22, 23], Nicht-Kleinzelligem Bronchialkarzinom [24, 25], Nierenzellkarzinom [26], Melanom [27], Prostatakarzinom [28], Kolon- und Zervixkarzinom [29].

Im Jahr 1990 begann eine Phase III Studie (GOG-111-Studie), welche die Überlegenheit von Taxol in Kombination mit Cisplatin gegenüber der bisherigen Kombinationstherapie mit Cisplatin und Cyclophosphamid beim Ovarialkarzinom belegte [30]. Weitere Studien zu Paclitaxel oder seinem Derivat Docetaxel zeigten ähnlich gute Ergebnisse auch bei Patienten mit weniger fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen [31, 32]. Heute ist Taxol in Kombination mit Carboplatin Therapie der Wahl beim Ovarialkarzinom in allen Stadien [33].

Seit Ende der 90er Jahre sind eine Vielzahl von Studien zur Therapie weiterer Malignome mit Taxol erschienen [34]: Insbesondere zur Behandlung des Mammakarzinoms mit dem Taxolderivat Docetaxel [35, 36] und zur Behandlung des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms [37, 38]. In der Folge gab es weitere Studien zur Verwendung bei Pleuramesotheliom, Kopf-Hals-Tumoren,

Urothelkarzinom, Ösophaguskarzinom, Keimzell-, Endometriumtumoren [39], bei Melanomen und malignen Lymphomen. Mittelweile hat sich Taxol so nicht nur zu einem der meistverwendeten, sondern auch zum gewinnbringendsten Zytostatikum der Geschichte entwickelt [40].

1.1.2 Der Wirkmechanismus von Taxol

Taxol wirkt, wie oben erwähnt, indem es Mikrotubuli stabilisiert und ihren Aufbau fördert [7, 41]. Mikrotubuli sind Hohlzylinder von etwa 25 nm Außendurchmesser, die in allen Zellen vorkommen und sich aus helikal angeordneten Protofilamenten zusammensetzen. Letztere wiederum sind Heterodimere, die aus α - bzw. β -Tubulin bestehen. Zusätzlich sind den Mikrotubuli so genannte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) angelagert. Mikrotubuli sind äußerst labile Gebilde und spielen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Zellfunktionen, wie z.B. der Erhaltung der Zellform, der Migration von eukaryotischen Zellen und dem intrazellulären Stofftransport, insbesondere dem axonalen Transport der Neurone. Außerdem bilden sie den Spindelapparat, der in der Metaphase der Mitose für die Verteilung der replizierten Chromosomen auf zwei Tochterzellen verantwortlich ist. Die α - und β -Tubuline besitzen verschiedene Bindungsstellen, unter anderem für GTP, das die Energie für den Prozess des Auf- bzw. Abbaus der Mikrotubuli bereitstellt, sowie für das bekannte Mitosegift Colchizin und die Vincaalkaloide Vincristin und Vinblastin. Diese lagern sich an freies Tubulin und können so die Bildung des Spindelapparates verhindern [42]. Im Gegensatz zu diesen bindet Taxol an β -Tubulin in Mikotubuli [43-45] und hemmt deren Depolymerisation Die Zelle verarmt an freiem Tubulin, das dynamische Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Mikotubuli und somit ihre Funktion wird gestört [7, 41, 46]. Die in Anwesenheit von Taxol gebildeten Mikrotubuli besitzen außerdem veränderte Eigenschaften. Sie sind kürzer, biegsamer [47] und bilden stern- bzw. bündelförmige Strukturen [48]. Interessanterweise korrelierte die Bildung von Mikrotubulibündeln mit dem Ansprechen auf Taxol. In Leukoblasten von

Patienten, die klinisch auf Taxol nicht mehr ansprechen, ließ sich *in vitro* keine Bildung von Tubulinbündeln mehr nachweisen [49].

Die unter Taxol gebildeten Bündel sind sehr stabil: Selbst in Anwesenheit von Calcium, bei niedrigen Temperaturen oder unter Einfluss von Mitoseinhibitoren, alles Faktoren die gewöhnlich zu einer Depolymerisation von Mikrotubuli führen, bleiben sie stabil [41]. Auch wenn der Mechanismus der zytostatischen Wirkung von Taxol letztlich noch nicht im Detail bekannt ist, konnte doch gezeigt werden, dass Taxol Einfluss auf die Mitose hat und eine fehlerlose Teilung der Zellen verhindern kann. Die Zellen bleiben am Übergang von der G2- zur Mitosephase stehen. Es entstehen Chromosomenbrüche und Zellen mit polyploidem Chromosomensatz [50, 51]. Schließlich beruht die Wirkung von Taxol auf maligne Zellen nicht zuletzt auf der Apoptose-induzierenden Wirkung dieser Substanz [52-54].

1.1.3 Die Nebenwirkungen von Taxol

Neben den typischen Nebenwirkungen vieler Zytostatika, wie Myelotoxizität, einer schleimhautschädigenden Wirkung und Nausea, kann es unter Therapie mit Taxol zu einer allergischen Reaktionen kommen, an der im Rahmen einer Phase I Studie ein Patient starb [12]. Durch Prämedikation mit Glukokortikoiden und Antihistaminika ließen sich diese allerdings in den Griff bekommen [55]. Weitere wichtige Nebenwirkungen sind die Myelosuppression mit Neutropenie und Thrombozytopenie, eine Kardio- und eine gewisse Nephrotoxizität, sowie eine periphere überwiegend sensible Neuropathie mit guter Prognose [56] (möglicherweise durch Hemmung des axonalen Transports). Außerdem wurden Arthralgien und Myalgien, sowie eine ausgeprägte Alopezie [55] beschrieben. Als dosislimitierend erwies sich vor allem die myelosuppressive Wirkung und hier in erster Linie die Neutropenie [55], die sich jedoch durch eine supportive Therapie mit G-CSF mildern lässt [17].

Eine Anämie (Hb < 11 g/dl) entwickelte sich in den Phase II Studien bei insgesamt 90% aller Patienten. Eine schwere Anämie mit Hämoglobinwerten

unter 8 g/dl fand sich bei immerhin 24%. Die Anämie erwies sich im Gegensatz zur Neutropenie und Thrombozytopenie als dosisabhängig [55, 57-59].

1.1.4 Die Pharmakokinetik von Taxol

Die Plasmaspiegel von Taxol zeigen nach intravenöser Injektion hohe interindividuelle Unterschiede. Mit steigender Dosis steigen die Plasmaspiegel überproportional an, zeigen also eine nichtlineare Abhängigkeit, die auf saturierbare Verteilungs- oder Eliminationsvorgänge hinweist [60]. Bei der heute üblichen Infusion über 3 Stunden werden deutlich höhere Plasmaspiegel erreicht als bei Infusion über 24 Stunden [61]. Diese erreichten bei einer Dosis von 250 mg/m² über 3 Stunden knapp 10 µmol/l [62]. Die intraperitoneale Applikation ist möglich, wobei hohe Wirkspiegel erreicht werden [15]. Taxol wird überwiegend über das Cytochrom-P450 System abgebaut und biliär eliminiert.

1.2 Aluminium

Aluminiumsalze werden als Antazida, v. a. aber als enterale Phosphatbinder bei chronischer Niereninsuffizienz mit Hyperphosphatämie aufgrund mangelnder Phosphatclearance eingesetzt [63]. Sie vermindern durch Bildung schwer löslicher Aluminium-Phosphatkomplexe die intestinale Resorption von Phosphat aus der Nahrung.

Die Verwendung von Aluminium als Phosphatbinder kann zu deutlich erhöhten Aluminium-Serumspiegeln bis hin zur früher häufiger beobachteten Aluminiumintoxikation führen [64]. Die klassische Trias der Nebenwirkungen besteht hierbei in der Entwicklung einer Enzephalopathie, einer Osteopathie und einer Anämie [64].

Letztere kann dabei theoretisch aufgrund einer verminderten Bildung von Erythrozyten sowie durch eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten bedingt sein. Da in Tierversuchen ein erhöhter Anteil von Retikulozyten bei Aluminiumintoxikation gefunden wurde [65] könnte die verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten eine ursächliche Rolle bei der Aluminium-induzierten Anämie spielen [66].

Um mögliche Hinweise auf eine Beteiligung des Zelltodes reifer Erythrozyten, der so genannten „Eryptose“ [67], an der Anämie bei Aluminiumintoxikation zu erhalten, wurde der Einfluss von Aluminium-Ionen auf eine Reihe von Eigenschaften roter Blutkörperchen *in vitro* untersucht.

1.3 Apoptose

1.3.1 Die Entdeckung des programmierten Zelltods

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und bezeichnet das Abfallen der Blätter im Herbst.

Entdeckt wurde die Apoptose bereits vor mehr als 150 Jahren von C. Vogt bei Amphibien [68]. Bis zu Beginn der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde der programmierte Zelltod für ein spezielles Phänomen im Verlauf der Metamorphose gehalten. Dies änderte sich, als Glücksmann 1951 den Zelltod im Rahmen der Embryogenese beschrieb. Hierbei erkannte er, dass es sich nicht einfach um eine Lyse der Zellen handelte, sondern um einen in Phasen ablaufenden Prozess. Er beschrieb die Kondensation des Chromatins, die Auflösung des Kerns und das Schrumpfen der Zelle [69]. 1972 folgte eine detaillierte Beschreibung dieses Prozesses durch den australischen Pathologen John Kerr [70]. Zeitgleich unternahmen Ellis, Horvitz, Shaham und Hengartner eine Reihe von Experimenten in *Caenorhabditis elegans*, einem Wurm und konnten schließlich zeigen, dass der Zelltod in Embryonen dieser Spezies von einigen wenigen Genen kontrolliert wird, es sich also tatsächlich um ein „programmierten“ Zell-Mechanismus handelt [71, 72].

1.3.2 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Für einen mehrzelligen Organismus ist es unabdingbar, den Tod einzelner Zellen kontrolliert ablaufen zu lassen, um zu verhindern, dass potentiell schädliche intrazelluläre Bestandteile wie Proteasen, Zytokine aber auch beispielsweise Viren aus infizierten Zellen freigesetzt werden, was in jedem Fall eine entzündliche Umgebungs-Reaktion auslösen und damit zu ausgedehntem Zellschaden führen würde. Nach Schätzungen machen in einem erwachsenen Menschen täglich 40-70 Milliarden Zellen den Prozess des programmierten Zelltodes durch [73]. Ebenso ist Apoptose für die embryonale Entwicklung mehrzelliger Organismen von entscheidender Bedeutung [69, 74-

76], indem sie es ermöglicht, nur zu einem bestimmten Zeitpunkt oder einer definierten Zeitspanne benötigte Zellen später wieder zu entfernen. Auch Zellen des Immunsystems werden, z. B. bei der Reifung von T-Lymphozyten im Thymus, mittels Apoptose aussortiert, wenn sie sich als autoreaktiv erweisen [77, 78]. Ebenso werden Leukozyten nach einer überstandenen Infektion entfernt, wenn sie nicht mehr benötigt werden [79]. Schließlich kommt dem programmierten Zelltod noch eine entscheidende Bedeutung zu, sowohl bei der Verhinderung, als auch bei der Entstehung von malignen Neoplasien [73, 80-84]. Auch bei der anti-proliferativen Therapie spielt die Apoptose eine wichtige Rolle, v.a. im Rahmen der Zytoreduktion bei der Therapie von Neoplasien [80, 82]. Darüber hinaus ist Apoptose ein wichtiger pathophysiologischer Faktor in einer Vielzahl weiterer entzündlicher und degenerativer Erkrankungen. So trägt bei der HIV-Infektion die vermehrte Apoptose von CD4-positiven T-Zellen bedeutend zur Pathogenese bei [85-88]. Und auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson [89, 90] und Alzheimer [91, 92] findet sich eine erhöhte Apoptoserate.

1.3.3 Apoptose im Gegensatz zur Nekrose

Gelingt es nicht, den Zelltod kontrolliert ablaufen zu lassen, weil sich beispielsweise die extrazellulären Bedingungen zu rasch ändern oder weil Viren die Apoptose einer infizierten Zelle hemmen [93], kommt es zur Nekrose. Diese kann ausgelöst werden durch abrupte Veränderungen der Osmolarität, des pH-Wertes, der Temperatur oder der Sauerstoffversorgung mit nachfolgendem Energiemangel. Bei der Nekrose kommt es typischerweise durch den Ausfall der Ionenpumpen in der Zellmembran zum Schwellen der Zelle, wodurch schließlich die Zelle ihre Integrität verliert. Es kommt zur Lyse, der Zellinhalt wird in die Umgebung freigesetzt und löst dort eine entzündliche Reaktion mit Einwanderung von Immunzellen aus.

Im Gegensatz dazu handelt es sich wie weiter oben beschrieben bei der Apoptose um einen aktiven, streng geregelt ablaufenden Vorgang. Beim apoptotischen Zelltod kommt es daher nicht zur Freisetzung intrazellulärer

Bestandteile und konsequenterweise zu keiner weiteren inflammatorischen Umgebungsreaktion [94]. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert, die DNA wird hydrolysiert, schließlich zerfällt der Zellkern (Karyorhexis) und es bilden sich membranumschlossene Vesikel, die von Makrophagen oder Nachbarzellen phagozytiert werden [95].

Ein weiteres neben dem Schrumpfen der Zelle charakteristisches Merkmal der Apoptose, das in allen bisher untersuchten Zellen gefunden wurde, ist das Erscheinen des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Zellmembran [96-100]. Normalerweise befindet sich der überwiegende Teil des Phosphatidylserins im inneren Blatt der Membran. Diese Asymmetrie wird von mindestens zwei entgegengesetzt arbeitenden Enzymen unter Energieaufwand aufrecht erhalten [101]. Das Erscheinen von Phosphatidylserin in der äußeren Membran wird von Makrophagen erkannt und führt zur Phagozytose der PS-positiven Zelle [99, 102-104]. Interessanterweise scheinen sowohl die Exposition von Phosphatidylserin im Rahmen der Apoptose als auch der Phosphatidylserin-Rezeptor von Makrophagen phylogenetisch hochgradig konserviert zu sein [100, 105], was auf eine wichtige Bedeutung dieses Mechanismus hinweist.

1.3.4 Der Ablauf der Apoptose

Wichtigste Effektoren der Apoptose in den meisten Zellen sind Cystein-Aspartat spezifische Proteasen, sog. Caspasen. Diese können über einen extrinsischen Weg durch so genannte Todesrezeptoren aus der TNF-Superfamilie [106] oder über einen intrinsischen Weg durch Freisetzung von Procaspase-9 aktivierenden Faktoren aus Mitochondrien aktiviert werden. Ein weiterer noch weitgehend unverstandener Weg der Caspasenaktivierung führt über das endoplasmatische Retikulum [107].

Daneben können noch weitere, von Caspasen unabhängige Wege, unterschieden werden [108, 109].

Reguliert wird die Apoptose unter anderem durch die in B-Zell-Lymphomen entdeckten Proteine der Bcl-2-Familie [110], der sowohl pro-, als auch antiapoptotische Mitglieder angehören.

1.3.5 Die Caspasen

Entdeckt wurde die Bedeutung der Caspasen für die Apoptose in *Caenorhabditis elegans* [111, 112]. Caspasen liegen in Zellen als inaktive Vorstufen vor, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden [95, 113]. Bis heute wurden im Menschen 12 bis 13 verschiedene Caspasen nachgewiesen [109]. Einige scheinen allerdings bei der Apoptose keine Funktion zu übernehmen, sondern sind an der Zytokinproduktion im Rahmen von Entzündungen beteiligt (beim Menschen Caspasen 1, 4 und 5) [114]. Caspase 12 beispielsweise scheint anti-inflammatorisch zu wirken. Menschen bei denen eine bestimmte Form von Caspase 12 exprimiert wird, haben ein höheres Risiko, eine schwere Sepsis zu entwickeln [115]. Außerdem sind Caspasen auch für Prozesse der Zellreifung nötig. Beispielsweise bei der Aktivierung von T-Lymphozyten über Caspase 8 [116]. Interessanterweise ist auch für die Erythrozytenreifung die Aktivierung von Caspasen nötig [117]. Ferner scheinen Caspasen auch bei der Reifung und Plastizität des Nervensystems eine wichtige Rolle zu spielen [118].

Die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 sind am programmierten Zelltod beteiligt. Hier lassen sich Initiatorcaspasen (2, 8, 9 und 10) und Effektorcaspasen (3, 6 und 7) unterscheiden [119, 120]. Initiatorcaspasen spalten dabei Effektorcaspasen. Im Verlauf dieser proteolytischen Kaskade können sich verschiedene Caspasen sowohl gegenseitig als auch autokatalytisch innerhalb derselben Klasse aktivieren (z. B. kann Caspase 3 Procaspase 3 spalten) und so das Apoptosesignal verstärken [121-123]. Über diese Kaskade kommt es schließlich zur Aktivierung aller für die Apoptose benötigten Caspasen, unabhängig vom ursprünglichen Signal [124].

Initiatorcaspasen können durch verschiedene Polyproteinkomplexe aktiviert werden, darunter das Apoptosom des intrinsischen Weges, welches Caspase 9

aktiviert [125], das Piddosom, welches Caspase 2 aktiviert [126] und durch den sog. Death-inducing-signaling-complex (DISC) [127] über den die Todesrezeptoren des extrinsischen Weges hauptsächlich Caspase 8 aktivieren (siehe unten).

1.3.6 Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren

Der extrinsische Weg aktiviert die Caspasen über Membranrezeptoren. Das Signal wird über Rezeptoren aus der TNF-Superfamilie (TNFR1, Fas/CD95 und DR3-6) ins Innere der Zelle vermittelt. Die Bindung von Zytokinen aus der TNF-Familie (TNF- α , FasL, Apo3L und TRAIL) [128, 129] induziert die Bildung von Todesrezeptor-Trimeren und intrazellulär das Anlagern von Adapterproteinen wie FADD sowie die Bindung von Initiatorcaspasen (Caspase 8 und 10). Dieser Komplex aus Ligand, Todesrezeptoren und Adapterproteinen wird Death-inducing-signaling-complex (DISC) [127] genannt. Er führt zur Aktivierung der Initiatorcaspasen. Diese wiederum aktivieren die Effektorcaspasen direkt.

Außerdem ist die indirekte Aktivierung der Effektorcaspasen über den intrinsischen Weg möglich: Im ersten Schritt werden hierbei von Initiatorcaspasen des extrinsischen Weges Proteine aus der Bcl-2-Familie wie das proapoptotisch wirkende Bid gespalten. T-Bid (truncated Bid) wiederum aktiviert die Bcl-Proteine Bax und Bak, welche die äußere Mitochondrienmembran für Cytochrom C permeabel machen [130, 131]. Die Freisetzung von Cytochrom C schließlich, dem wichtigsten Vermittler des intrinsischen Weges, führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen [132].

Reguliert wird der extrinsische Weg über FLIP-Proteine. Diese besitzen die gleichen Bindungsstellen für die Adapterproteine des Todesrezeptorkomplexes wie die Initiatorcaspasen 8 und 10 und sind somit in der Lage, über kompetitive Hemmung die Bindung und somit die Aktivierung der Initiatorcaspasen [133-135] zu verhindern. Eine weitere Regulationsmöglichkeit stellen die Rezeptoren DcR1 und DcR2 (Decoy-Death-Receptors) dar. Diese konkurrieren mit den Todesrezeptoren DR3 und DR4 um die Bindung von TRAIL, sind aber nicht in der Lage, das Todessignal nach intrazellulär weiterzugeben [136-138].

1.3.7 Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Signale

Durch verschiedene Stressfaktoren wie Schäden an der DNA durch UV-Strahlung, den Entzug von Wachstumsfaktoren oder Chemotherapeutika lässt sich über den intrinsischen Weg [139, 140] Apoptose auslösen. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die Mitochondrien ein. Vermittelt werden die Prozesse des intrinsischen Weges über BH3-only Proteine, die durch diverse Stressoren aktiviert werden können. Diese proapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie führen zur Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung u. a. von Cytochrom C [132]. Cytochrom C bindet dann an Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1). Es bilden sich Apaf-1-Oligomere, die Procaspase 9 binden und dadurch aktivieren. Der Komplex aus Cytochrom C, Apaf-1, (d)ATP und Caspase 9 wird als Apoptosom bezeichnet und katalysiert die proteolytische Spaltung der Effektorcaspasen [141-144].

1.3.8 Caspasenunabhängige apoptotische Vorgänge

Viele Vorgänge der Apoptose sind morphologisch definiert, so z.B. die Zell- und Kernschrumpfung, die Kondensation des Chromatins, die Fragmentation des Kerns und die Bildung apoptotischer Körperchen, die dann phagozytiert werden können. Auch die DNA-Fragmentierung, die sich in der Gelelektrophorese darstellen lässt und durch caspasenaktivierte DNAsen katalysiert wird, ist ein wichtiges Merkmal der Apoptose [109]. Werden nun die Caspasen in Anwesenheit proapoptotischer Stimuli gehemmt, so lassen sich beispielsweise die Chromatinkondensation, die Fragmentierung der DNA und die Bildung apoptotischer Körperchen nicht mehr beobachten, was zu dem Schluss verleiten könnte, Caspasen seien für die Apoptose von Zellen unabdingbar. Dagegen spricht, dass die Inhibition der Caspasen allein oft nicht ausreicht, Zellen vor Apoptose zu schützen und dass sich dennoch andere für die Apoptose typischen Vorgänge wie z. B. die mitochondriale Dysfunktion oder

der Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie beobachten lassen [145-150].

Auch bei reifen Erythrozyten, die ja keinen Kern und keine Mitochondrien mehr besitzen und somit die entsprechenden morphologischen Phänomene nicht mehr zeigen können, finden sich einige Merkmale der Apoptose kernhaltiger Zellen, ohne dass in der Regel die Aktivierung von Caspasen nötig ist [117, 151, 152].

1.3.9 Die Regulation der Apoptose

Es liegt nahe zu vermuten, die Apoptose sei aufgrund ihrer enormen Bedeutung für den Organismus ein fein regulierter Vorgang. Tatsächlich konnte neben den oben beschriebenen proapoptotischen Signalwegen auch eine entsprechende negative Regulation der Apoptose gefunden werden. Wichtigste Effektoren dieser antiapoptotischen Regulation sind die so genannten IAPs (Inhibitors of apoptosis). Diese Proteine sind in der Lage, sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen direkt zu hemmen [153-156]. Das erste Mitglied aus der Familie der IAPs wurde in Baculoviren entdeckt [157]. Der erste in Säugern entdeckte Vertreter war NAIP (Neuronal Inhibitory Apoptosis Protein). Sein Ausfall ist verantwortlich für den Verlust an motorischen Vorderhornzellen bei den spinalen Muskelatrophien [158]. Inzwischen sind eine Reihe weiterer Proteine aus dieser Familie gefunden worden [159-164]. Auch bei der Entstehung maligner Tumoren scheinen IAPs eine Rolle zu spielen [165, 166].

Eine weitere für die Regulation der Apoptose wichtige Gruppe sind die Proteine der Bcl-2-Familie. Wie oben kurz beschrieben, sind diese hauptsächlich an der Apoptoseregulation über die Mitochondrien beteiligt. Sie bestehen sowohl aus anti- als auch proapoptotischen Mitgliedern. Der erste Vertreter dieser Familie wurde in einem B-Zell-Lymphom entdeckt [110, 167] und schließlich als ein antiapoptotisch wirkendes Protein erkannt [168, 169]. Die verschiedenen Bcl-2-Proteine können miteinander interagieren, wobei die antiapoptotischen Mitglieder wie Bcl-2 und Bcl-x_L in der Lage sind, proapoptotisch wirkende Bcl-2-Proteine wie Bad und Bax zu inhibieren [170-

172]. So verhindern sie beispielsweise die Oligomerisation von Bak oder Bax zum mitochondrialen Kanal und somit die Freisetzung von Cytochrom C [173, 174].

1.4 Der Zelltod bei Erythrozyten

1.4.1 Einführung

Der Begriff „Erythrozytenapoptose“ wird kontrovers diskutiert. Da Erythrozyten weder Mitochondrien noch einen Zellkern besitzen, sind die markantesten morphologischen Phänomene der Apoptose in Erythrozyten nicht sichtbar. Außerdem wurde gezeigt, dass reife Erythrozyten unempfindlich sind gegenüber klassischen proapoptotischen Stimuli wie Serumdeprivation oder Behandlung mit dem Protein-Kinase-C-Inhibitor Staurosporin [117, 175].

Unreife, organellenhaltige Erythrozytenvorläuferzellen hingegen zeigen klassische Apoptose beispielsweise nach Infektion mit dem Parvavirus B19 [176] oder spontan in Abwesenheit von Erythropoietin [177], was die vermehrte Bildung von Erythrozyten durch dieses für die Erythrozytenbildung wichtigsten Hormons erklärt. Interessanterweise ist der Prozess der Erythrozytenreifung caspasenabhängig [178].

Erst 2001 berichteten die beiden Gruppen um Montreuil und Ameisen sowie um Schulze-Osthoff und Wesselborg, dass Erythrozyten in der Lage sind, einen Prozess durchzumachen, der einige wesentliche Phänomene der Apoptose kernhaltiger Zellen zeigt [151, 152]. Calciumeinstrom in den Erythrozyten führte zur Zellschrumpfung, zur Bildung von Membranvesikeln und zum Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie sowie in Anwesenheit von Makrophagen zur Phagozytose. Außerdem konnten sie zeigen, dass Erythrozyten zwar Caspase-8 und 3 enthalten, diese aber nicht aktiviert werden.

Mittlerweile konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die in der Lage sind, apoptotische Vorgänge in roten Blutzellen auszulösen, so z.B. die

Hyperosmolarität des Extrazellulärtraumes [179, 180], oxidativer Stress [181, 182], Energiemangel und der Entzug von extrazellulärem Chlorid [181, 183, 184]. Auch konnte gezeigt werden, dass verschiedene mit einer Anämie einhergehende Krankheiten eine erhöhte Empfindlichkeit der Erythrozyten auf proapoptotische Stimuli zeigen. So zeigen die Erythrozyten bei Sichelzellanämie, Thalassämie und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel eine erhöhte Apoptoserate [185]. Auch bei Vergiftungen mit Schwermetallen wie Blei oder Quecksilber und auch Aluminium, auf das in dieser Arbeit besonders eingegangen werden soll [186-188], sowie bei durch bestimmte Medikamente wie Chlorpromazin [189] und Cyclosporin [190] ausgelöste Anämien scheinen apoptotische Vorgänge in reifen Erythrozyten eine Rolle zu spielen.

Ebenso sind mittlerweile eine Reihe von Substanzen bekannt, die in der Lage sind, apoptotische Vorgänge zu hemmen, darunter Harnstoff [184], Katecholamine, Adenosin und Stickstoffmonoxid (NO) [191, 192].

Mittlerweile sind zwei Hauptmechanismen der Erythrozytenapoptose bekannt: der oben erwähnte Einstrom von Calciumionen und die Bildung von Ceramid.

1.4.2 Erythrozytenapoptose durch erhöhtes intrazelluläres Calcium

Der Entzug von extrazellulärem Chlorid, ein hyperosmolarer Extrazellulärtraum, oxidativer Stress und Energiemangel führen zur Öffnung von nicht-selektiven Kationenkanälen und zum Einstrom von Calcium. Die Erhöhung des intrazellulären Calciums führt einerseits zum Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie und andererseits zur Zellschrumpfung. Letztere ist bedingt durch den Verlust von Kaliumionen durch einen Calcium-abhängigen Kaliumkanal (KCNN4, hSK4, Gardos-Kanal). Die Aktivierung dieses Kanals durch intrazelluläres Calcium führt über die gesteigerte Kaliumleitfähigkeit der Membran zu einer Hyperpolarisation der Zelle und somit

zum Verlust von Chloridionen. Der mit dem Kaliumchloridverlust einhergehende Verlust an Wasser zeigt sich dann im verminderten Zellvolumen [193-201].

Das zweite durch Calcium mitverursachte Phänomen ist das Erscheinen von Phosphatidylserin im äußeren Blatt der Membran. Wie bereits oben kurz erwähnt, befindet sich Phosphatidylserin unter normalen Bedingungen fast ausschließlich im inneren Blatt der Membran [202]. Diese Asymmetrie wird von zwei entgegengesetzt arbeitenden Enzymen aufrechterhalten. Während die ATP-abhängige Translokase die Phosphatidylserinasymmetrie aufrecht erhält indem sie Phosphatidylserin von der Außenseite nach Innen transportiert [101, 202, 203], besteht die Funktion der Scramblase darin, die Phosphatidylserinasymmetrie aufzuheben [204-207]. Da die Aktivität der Scramblase durch Calcium erhöht und gleichzeitig die Translokase gehemmt wird [96, 97, 182], führt Calciumeinstrom in die Zelle zum Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie [207, 208].

1.4.3 Erythrozytenapoptose durch Bildung von Ceramid

Die Beobachtung, dass unter hyperosmolaren Bedingungen auch nach Hemmung des Kationenkanals sowie in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium weiterhin PS-Exposition stattfindet [184], führte zur Suche nach einem weiteren nicht-kalziumabhängigen Signalweg. Als Mediator der kalziumunabhängigen Apoptose erwies sich schließlich Ceramid [180]. Dieses kommt als Bestandteil des Membranlipids Sphingomyelin in Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle als „second messenger“ bei der Apoptose vieler Zelltypen [209-212]. Ceramid wird durch das Enzym Sphingomyelinase aus Sphingomyelin abgespalten und erhöht die Empfindlichkeit der Scramblase für Calcium [180].

1.4.4 Erythrozytenapoptose durch Caspasen

Nachdem die ersten Arbeiten zeigten, dass Caspasen in Erythrozyten zwar vorhanden, bei der durch Calciumeinstrom induzierten Apoptose jedoch nicht aktiviert werden [117, 151, 152], gelang es der Arbeitsgruppe um Basu, die Beteiligung von Caspasen bei der durch oxidativen Stress ausgelösten Erythrozytenapoptose zu zeigen [182].

1.4.5 Erythrozytenapoptose und Calpaine

Calpaine sind calcium-abhängige Proteasen, deren Bedeutung sowohl für die Erythrozytenalterung [213] als auch für die Erythrozytenapoptose [151, 214] gezeigt werden konnte. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von Calpainen beobachtet.

Calpaine sind in der Lage, eine Vielzahl intrazellulärer Proteine zu spalten, darunter zytoskelettale Proteine wie Aktin [215] und die Bcl-Proteine Bax und Bad, sowie die Caspasen 3 und 9 [132, 216].

In Erythrozyten findet sich μ -Calpain. Diese inaktive Vorstufe besteht aus einer schweren (80 kDa) katalytischen und einer leichten (30 kDa) regulatorischen Untereinheit [217, 218].

Unter dem Einfluss von Calcium kommt es zur Dissoziation der Untereinheiten, zur autokatalytischen Spaltung und somit zur Aktivierung der schweren Untereinheit [219]. Ob die Spaltung von Calpainen nur ein Calcium-assoziiertes Nebeneffekt ist, oder ob sie ursächlich an der Erythrozytenapoptose beteiligt ist, bleibt unklar.

2 Materialien und Methoden

2.1 Einführung

Viele der in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden an anderer Stelle ausführlich beschrieben [220].

2.2 Erythrozyten

Die Erythrozyten von Patienten unter Chemotherapie wurden nach Aufklärung und Einwilligung entnommen. Die entsprechende Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor. Das gewonnene Heparin-Vollblut wurde durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 2.000 g und 22°C in Plasma und Erythrozyten getrennt. Das Plasma wurde ohne weitere Behandlung verwendet. Erythrozyten wurden nach zweimaligem Waschen in plasmaisotoner Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS 0,9%), verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden für alle weiteren Experimente leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate der Blutbank der Universität Tübingen verwendet.

Hergestellt wurden diese mit dem „OptiPure RC quadruple blood pack set“ mit einem Filter von Baxter (Unterschleißheim, Deutschland). Dabei wurden 500 ml Blut automatisch mit 70 ml des CPD – Puffers (siehe Tabelle 1) gemischt. Die Blutkomponenten wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4795 g und 22°C getrennt. Anschließend wurden die Erythrozytenkonzentrate mittels eines Leukozytenfilters von weißen Blutzellen befreit und mit SAG-Manitol Lösung (siehe Tabelle 2) versetzt. Gelagert wurden die Erythrozytenkonzentrate bei 4°C für maximal 2 Wochen. Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37°C und einem Hämatokrit von 0,03% durchgeführt.

Tabelle 1: CPD – Puffer

Substanz	Konzentration (mg/ml)
Zitronensäure	3,27
Natriumcitrat	26,30
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	2,50
Dextrosemonohydrat	25,50

Tabelle 2: SAG – Mannitol Lösung

Substanz	Konzentration (mg/ml)
NaCl	8,77
Dextrosemonohydrat	9,00
Adenin	0,17
Mannitol	5,25

2.3 Patienten

Es wurde Blut von acht Patienten untersucht, die eine Chemotherapie mit Paclitaxel (Taxol®) erhielten. In sechs Fällen wurde Paclitaxel in Kombination mit Carboplatin, in zwei Fällen in Kombination mit Carboplatin und Gemcitabine verabreicht.

Fünf Patienten mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom wurden mit Paclitaxel entweder in Kombination mit Carboplatin (n=3) oder in Kombinationschemotherapie mit Carboplatin und Gemcitabine.

Zwei Patienten mit rezidiviertem Ovarialkarzinom und ein Patient mit primär fortgeschrittenem Endometriumkarzinom erhielten eine Kombinationschemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin.

Die Kombination von Paclitaxel mit Carboplatin wurde einmalig alle drei Wochen verabreicht. In der Dreierkombination wurde Gemcitabine an Tag 1 und 8 gegeben. Die Dosierungen waren 175 mg/m² Körperoberfläche für

Paclitaxel, 800 mg/m² Körperoberfläche für Gemcitabine und AUC 5 für Carboplatin.

Das Blut wurde unmittelbar vor bzw. nach einer dreistündigen Infusion von Paclitaxel (175 mg/m²) entnommen und sofort analysiert.

2.4 Blutbildanalyse der Patienten

Im Patientenblut wurden unter Verwendung eines automatischen Blutzellanalysegerätes (CellDyn 3000; Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) die Anteile der verschiedenen weißen Blutzellen, die Thrombozyten sowie bei den Erythrozyten alle gängigen Parameter einschließlich der Retikulozyten bestimmt.

Für die weiteren *in vitro* Experimente wurden leukozytenarme Erythrozytenkonzentrate verwendet [221].

Zur Analyse der verbliebenen Leukozyten in den Erythrozytenkonzentraten erfolgte eine FACS-Analyse an einem Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) unter Benutzung eines international standardisierten Kits (TrueCount) der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Germany). Der Leukozytenanteil der verwendeten Konzentrate betrug 0.012% ±0.001% (n=22) der sonst im Vollblut vorhandenen Menge. Die Erythrozytenkonzentrate können somit praktisch als leukozytenfrei angesehen werden.

2.5 Tierexperimente

Die Tierexperimente waren von der Ethik-Kommission genehmigt (Nummer PY 6/04) und wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Es wurden 4-6 Monate alte weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Erythrozyten wurden durch retrobulbäre Venenpunktion gewonnen.

2.5.1 Aktivierung der sauren Sphingomyelinase *in vivo*

Um die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase *in vivo* zu untersuchen, wurden 4,5 µg/kg KG Paclitaxel (Sigma, Taufkirchen) intravenös verabreicht. Blutproben wurden unmittelbar vor bzw. 10 Minuten nach Injektion von Paclitaxel entnommen.

Zur Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase im Serum wurden Serumproben in einer Lösung mit 250 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1,3 mM EDTA und 0,1% NP40 1:50 verdünnt. Dann wurden 0,05 µCi [¹⁴C]sphingomyelin (52 mCi/mmol, MP-Biomedicals, Eschwege, Deutschland) zu jeder Probe hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lipide wurden im 4fachen Volumen Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extrahiert. Ein Aliquot des wässrigen Überstands wurde entnommen und die enzymatische Freisetzung von [¹⁴C]cholinchlorid aus [¹⁴C]sphingomyelin mittels Szintillationsmessung bestimmt.

Zur Messung der Sphingomyelinase im Vollblut wurden die Proben für 10 Minuten im 4fachen Volumen eines Puffers lysiert, der 250 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1,3 mM EDTA und 1% NP40 enthält. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen Procedere.

2.5.2 Messung der mittleren Lebenszeit von Mäuseerythrozyten

Zur Messung der mittleren Lebenszeit Phosphatidylserin-positiver Erythrozyten wurden Mäuseerythrozyten in Ringer mit Ionomycin (1 µM) bzw. entsprechenden Mengen DMSO für eine Stunde inkubiert, zwei Mal in Ringer gewaschen (2.000 g, 5 Minuten, 25°C) und anschließend mit Carboxyfluoreszeindiacetat-succinimidylester (CFSE) der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande) für 10 Minuten bei 37°C gefärbt. Die verwendete CFSE-Konzentration betrug 50 µM, in PBS. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (2.000 g, 5 Minuten), in frischem, 37°C warmen PBS resuspendiert und in die Schwanzvene gesunder C57BL/6 Mäuse injiziert. Nach zwei Stunden wurde durch retrobulbäre Venenpunktion Blut entnommen und

die Mäuse anschließend getötet. Die Milz wurde entnommen und vorsichtig durch ein Netz filtriert. Die Fluoreszenzintensität im Vollblut bzw. in den aus der Milz gewonnenen Zellen wurde durchflusszytometrisch im FL1-Kanal gemessen. Der Anteil CFSE-positiver Zellen wurde in Prozent der gesamten Population berechnet.

2.6 Verwendete Substanzen

2.6.1 Paclitaxel, Docetaxel, Carboplatin, Doxorubicin

Paclitaxel und Carboplatin wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Paclitaxel wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in den jeweils angegebenen Endkonzentrationen verwendet. Carboplatin ((1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum) wurde in einer wässrigen Stammlösung (10 mM) verwendet.

Docetaxel und Doxorubicin wurden von der Firma Fluka (Buchs SG, Schweiz) bezogen. Docetaxel wurde in DMSO gelöst, Doxorubicinhydrochlorid in wässriger Lösung. Die entsprechenden Mengen an DMSO bzw. Wasser wurden den jeweiligen Kontrollen hinzugefügt. Diese wurden immer parallel und entsprechend den mit Substanzen behandelten Erythrozyten inkubiert.

2.6.2 Aluminium

Aluminium wurde in Form von Aluminiumchlorid in wässriger Lösung verwendet. Aluminiumchlorid wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.6.3 z-VAD-fmk

Dieser Pancaspaseninhibitor wurde von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen, in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 20

μM verwendet. Hierbei wurden die Zellen für eine Stunde mit z-VAD-fmk präinkubiert.

2.6.4 Ionomycin

Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor. Ionomycin wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eingesetzt.

2.6.5 Annexin – V – Fluos

Zur Bestimmung des Phospholipids Phosphatidylserin im äußeren Blatt der Membran als Merkmal des Zelltodes diente Annexin-V-Fluos. Da Annexin-V Phosphatidylserin mit hoher Affinität bindet, eignet es sich als fluorochromgekoppeltes Molekül zur Analyse dieses Merkmals des Zelltodes mittels FACS-Analyse [222-225]. Es wurde das Annexin-V-Fluos der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Eingesetzt wurde es in einer Verdünnung von 1:50 in einem calciumhaltigen Puffer (Annexin-Waschpuffer), (siehe Tabelle 7).

2.6.6 Fluo-3/AM

Fluo-3/AM, ein zellpermeabler Ca^{2+} -Indikator, wurde zur Bestimmung des intrazellulären Calciumgehaltes verwendet. Bezogen wurde er von der Firma Calbiochem (Bad Soden, Deutschland). Als Lösungsmittel diente DMSO.

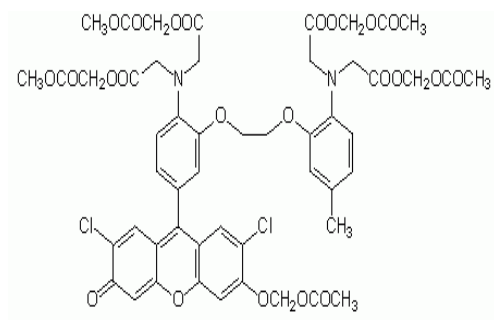


Abbildung 2: Fluo-3/AM (Calbiochem, Deutschland)

2.6.7 Anti-Ceramid-Antikörper

Der monoklonale Anti-Ceramid-Antikörper der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) wurde im Verhältnis 1:5 in PBS + 1% fetales Kälberserum (FCS) verdünnt verwendet.

2.6.8 α -Antikörper

Zum durchflusszytometrischen Nachweis des monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörpers wurden der Anti-Maus-IgG- und -IgM-Antikörper (Ziege, FITC-konjugiert) der Firma Pharmingen (Hamburg, Deutschland) verwendet. Er wurde 50-fach verdünnt mit PBS + 1% FCS eingesetzt.

2.6.9 Isotypischer Maus-IgM-Antikörper

Zur Negativkontrolle bei der Ceramid-Bestimmung diente der isotypische gematchte reine Maus-IgM-Antikörper der Firma Ancell (Bayport, USA).

2.6.10 Sphingomyelinase

Zur Positivkontrolle bei der Ceramid-Bestimmung wurde Sphingomyelinase (aus *Streptomyces* sp.) der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

2.7 Verwendete Lösungen

2.7.1 Ringerlösung

Plasmaisotone Ringerlösung diente mit ihrer weitgehend physiologischen Ionenzusammensetzung als Referenzlösung. Als Puffer diente HEPES (-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure). Die Gesamtosmolarität betrug 300 mOsmol, der pH-Wert 7,4 (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Ringerlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	11
HEPES	32,2
Glukose	5
CaCl ₂	1
NaOH	Titration bis pH 7,4

2.7.2 Calciumfreie Ringerlösung

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der beobachteten PS-Exposition durch Aluminium und dem Einstrom von Calcium nachzuweisen, wurde mit einer abgewandelten Ringerlösung gearbeitet, die kein Calcium enthielt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Calciumfreie Ringerlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	11
HEPES	32,2
Glukose	5
EGTA	2
NaOH	Titration bis pH 7,4

2.7.3 Glukose-freie Lösung

Um Zellstress durch Energiemangel oder Verlust an Reduktionsäquivalenten hervorzurufen, wurde eine Glukose-freie Lösung hergestellt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Glukose-freie Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	1
HEPES	32,2
CaCl ₂	1
NaOH	Titration bis pH 7,4

2.7.4 Hypertone Lösung 850 mOsmol

Durch Zugabe von 550 mmol Saccharose zu Ringerlösung wurde eine Osmolarität von 850 mOsmol erreicht. Diese Lösung diente der Simulation von hyperosmolaren Bedingungen.

Tabelle 6: Hypertone Lösung (850 mOsmol)

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	1
HEPES	32,2
Glukose	5
CaCl ₂	1
Saccharose	550
NaOH	Titration bis pH 7,4

Nach dem Herstellen der Lösungen wurden zur Kontrolle der pH-Wert und die Osmolarität bestimmt. Bei der Osmolarität wurde eine Abweichung von maximal 10% von den geforderten 300 mOsmol, beim pH-Wert eine Abweichung von 0,02 pH-Einheiten toleriert.

Kontrolliert wurden die Osmolaritäten mit Hilfe eines VAPRO 5520 Dampfdruck Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA).

2.7.5 Annexin- Waschpuffer

Annexin-Waschpuffer wurde zum Waschen der Erythrozyten nach der Inkubation sowie zum Verdünnen (1:50) des Annexin-V-Fluos (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet.

Tabelle 7: Annexin-Waschpuffer

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	140
CaCl ₂	5
HEPES	10
NaOH	Titration bis pH 7,4

2.7.6 PBS-Lösung

Zum Waschen der Erythrozyten wurde, wenn nicht anders vermerkt, plasmaisotone PBS-Lösung verwendet. Diese wurde mit handelsüblichen Fertigtabletten unter Zugabe einer entsprechenden Menge destilliertem Wasser hergestellt.

2.7.7 Jurkat-Medium

Jurkat-T-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem 10% FCS, 0,56 g/l L-Glutamin, 100.000 Einheiten/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin hinzugefügt wurden. Um die Spaltung und Aktivierung von Caspase 3 zu messen [140], wurde Paclitaxel in einer Endkonzentration von 10 µmol/l hinzugegeben.

2.8 FACS-Analyse

Der Begriff „FACS“ ist die Abkürzung für „Fluorescence Activated Cell Sorting“. Inzwischen hat sich der Begriff als allgemeine Bezeichnung für die Durchflusszytometrie eingebürgert.

Mit der Durchflusszytologie ist es möglich, eine Vielzahl von Eigenschaften einzelner Zellen mit Hilfe eines optischen Verfahrens zu messen. Sie ermöglicht somit je nach angewandter Methode die Beobachtung verschiedener Prozesse. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurden die Akkumulation von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche sowie die Bildung von Ceramid und der Calciumgehalt der Zellen durchflusszytometrisch gemessen sowie indirekt durch eine parallele Auswertung des Forward-Scatters (siehe auch Kapitel 2.8.1) die Zellgröße bestimmt.

2.8.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wandern die zu untersuchenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander durch eine dünne Messkammer. Hierbei werden sie vom Licht eines Lasers getroffen. Das entstehende Streulicht wird dabei von der Größe sowie der Binnenstruktur der Zelle bestimmt. Streulicht in einem Winkel von 0,7° - 10° zum Laserstrahl (sog. Vorwärtsstreulicht, Forward-Scatter, FSC) gibt dabei Auskunft über die Größe der Zellen. Das Streulicht senkrecht zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht, Side-Scatter, SSC) hingegen erlaubt eine Aussage über die Binnenstruktur der Zelle [226]. Durch

Anfärben verschiedener Zellbestandteile mit spezifischen fluoreszierenden Farbstoffen ist es außerdem möglich, eine Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften von Zellen zu bestimmen. Hierbei wird das von den Fluoreszenzfarbstoffen nach Anregung durch den Laser abgestrahlte Licht mit Hilfe von Interferenzfiltern und entsprechenden Sensoren analysiert. Die verschiedenen Wellenlängen des emittierten Lichts werden dabei verschiedenen Fluoreszenzkanälen zugeordnet. Der Fluoreszenzkanal 1 (FL1) entspricht dabei einem Bereich von 515 – 545 nm, FL2 reicht von 564 – 606 nm, FL4 von 653 – 669 nm und FL3 entspricht Wellenlängen über 670 nm [227].

Mittlerweile stehen viele verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung (z.B. Fluorochrom-gekoppelte spezifische Antikörper oder Rezeptoren, Farbstoffe für bestimmte Ionen usw.). Je nach Farbstoff können somit ganz verschiedene Eigenschaften bestimmt werden (z.B. intrazelluläres Calcium mit Fluo-3/AM, Ceramid in der Membran mit Anti-Ceramid Antikörpern in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern, DNA mit Ethidiumbromid usw.). Auch die simultane Messung verschiedener Eigenschaften (z. B. Retikulozyten und Phosphatidylserin) mit verschiedenfarbigen Markern ist möglich. Anhand der Intensität des emittierten Lichtes lassen sich auch quantitative Aussagen über die gemessenen Eigenschaften treffen [228, 229].

Nach Auswertung der Signale mittels der entsprechenden Software lassen sich die Messergebnisse dann graphisch in einem sog. Dot Plot darstellen. Hierbei entspricht jeder abgebildete Punkt einem Messwert (s. Abbildung 3). Die Achsen können je nach zu analysierendem Zusammenhang natürlich mit den gewünschten Fluoreszenzkanälen belegt werden.

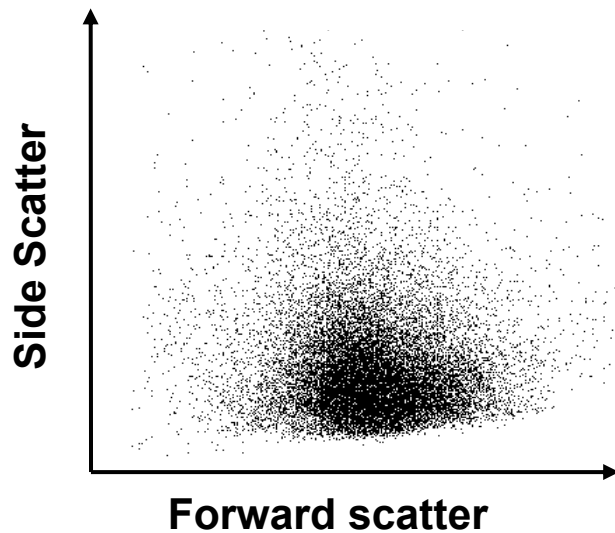


Abbildung 3: Dot Plot. Die Abbildung zeigt auf der x-Achse die Forward Scatter- und auf der y-Achse die Side Scatter Werte der analysierten Zellen.

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden FACS-Geräte der Firma Becton – Dickinson, Heidelberg (FACS Calibur) verwendet. Diese Geräte sind mit zwei, bzw. drei Lasern ausgestattet. Es können drei bzw. vier Farben simultan analysiert werden.

Wenn nicht anders angegeben, wurden 20.000 Zellen je Probe erfasst. Alle Fluoreszenzsignale wurden unter logarithmischer Verstärkung im Kanal „FL1“ aufgenommen. Als Maß für die Zellgröße diente das linear verstärkte Signal des Forward-Scatters (FSC).

2.8.2 Auswertung der Messdaten

Die Daten wurden an einem Rechner der Firma Macintosh mit Hilfe der Cell Quest Software von Becton-Dickinson erfasst und ausgewertet.

2.9 Bestimmung von Phosphatidylserin im äußeren Membranblatt

Nach Inkubation unter den Bedingungen des entsprechenden Experiments wurden 50 µl Zellsuspension (wenn nicht anders angegeben mit einem Hämatokrit von 0,3%) in 500 ml Annexin – Waschpuffer aufgenommen und anschließend bei 1500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dem gewaschenen Pellet wurden 50 µl verdünntes Annexin-V-Fluos (1:50 in Annexin-Waschpuffer) zugefügt. Das Pellet wurde resuspendiert und für 10 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert.

Die so gefärbten Zellen wurden 1:5 mit Annexin-Waschpuffer verdünnt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden sowohl Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) als auch die Fluoreszenz des gebundenen Annexin-V-Fluos im Fluoreszenzkanal „FL1“ bestimmt.

Bei Messung des Phosphatidylserins nach Inkubation der Zellen unter calciumfreien Bedingungen (siehe Kapitel „Ergebnisse“) wurden sowohl die Kontrollzellen (Ringerlösung) als auch die Testzellen (calciumfreie Ringerlösung) statt in Annexin-Waschpuffer, in calciumfreiem Ringer gewaschen. Erst unmittelbar vor der Messung wurde das calciumhaltige Annexin-V-Fluos zugegeben. Bei der folgenden Messung wurden jeweils zuerst die in calciumhaltigem Ringer inkubierten Zellen und dann die korrespondierenden in calciumfreiem Ringer inkubierten Zellen gemessen, um einen systematischen Fehler durch Einstrom des für die Bindung des Annexins notwendige Calciums auszuschließen.

2.10 Intrazelluläre Ca²⁺ Messungen mittels Fluo-3/AM

Der Gehalt an intrazellulärem Calcium wurde mittels Fluo-3/AM-Farbstoff (Calbiochem; Bad Soden, Deutschland) und FACS-Analyse bestimmt. Dazu wurde die Methode nach Andree et al. [222] verwendet.

Erythrozyten wurde in Ringerlösung mit Fluo-3/AM-Farbstoff beladen. Hierzu wurden die roten Blutzellen bei einem Hämatokrit von 0,3% für 20 Minuten bei 37°C und einer Endkonzentration des Fluo-Farbstoffs von 4 µM im Dunkeln inkubiert. Nach 20 Minuten wurde erneut die gleiche Menge an Fluo-3/AM zugegeben und für 40 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

Die so gefärbten Zellen wurden zweimal in Ringer gewaschen (5 Minuten, 1.500 g) und anschließend entsprechend der Anordnung des Experiments verwendet.

Für die FACS-Analyse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 100 µl der Zellsuspension entnommen. Diese wurde 1:3 mit Ringer verdünnt. Die Fluoreszenz wurde im FL1-Kanal bestimmt. Alle Schritte wurden unter Lichtabschluss durchgeführt. Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Beladung der Zellen mit Farbstoff dienten Erythrozyten, die mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin (1µM) behandelt worden waren.

2.11 Ceramid-Bestimmung

Das in der Membran gebildete Ceramid wurde mit Hilfe eines monoklonalen, ceramid-spezifischen Antikörpers [230, 231] und eines fluoreszenzmarkierten, gegen den ersten Antikörper gerichteten Sekundärantikörpers (α-Antikörper) gemessen. Die Fluoreszenz des α-Antikörpers wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Erythrozyten wurden vor der Messung des gebildeten Ceramids unter den jeweils angegebenen Bedingungen bei einem Hämatokrit von 0,03% und 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 100 µl Erythrozytensuspension entnommen und zweimal in plasmaitotener PBS-Lösung mit 1% FCS gewaschen (5 Minuten, 1.500 g).

Das so gewonnene Pellet wurde mit 50 µl des monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörpers (1:5 in PBS + 1% FCS verdünnt) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in PBS + 1% FCS bei 4°C (5 Minuten, 1.500 g), wurde 100 µl FITC-Anti-Maus IgM und IgG-Antikörper (1:50 in PBS + 1% FCS verdünnt) zugegeben und für 30 Minuten auf Eis unter Lichtabschluss inkubiert.

Nicht gebundener fluoreszenzmarkierter Antikörper wurde durch erneutes dreimaliges Waschen in PBS + 1% FCS bei 4°C (5 Minuten, 1.500 g), entfernt.

Anschließend wurde das Pellet in 150 µl PBS + 1% FCS aufgenommen und die FITC-abhängige Fluoreszenz mittels FACS-Analyse im Fluoreszenzkanal „FL1“ gemessen.

Als Positivkontrolle dienen Erythrozyten, die mit Sphingomyelinase von *Streptomyces* sp. (0,1 unit/ml) für 5 Minuten bei 37°C behandelt wurden. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifischer Mausantikörper vom gleichen Isotyp an Stelle des monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörpers verwendet.

2.12 ATP- Messung

In der Zelle kommt ATP als dem wichtigsten Energielieferant für verschiedene zelluläre Stoffwechsel- und Transportprozesse eine zentrale Bedeutung im System Zelle zu. Der ATP-Gehalt der Erythrozyten wurde mit Hilfe eines luminometrischen Verfahrens unter Verwendung des Enzyms Luciferase bestimmt. Das Enzym Luciferase stammt aus *Photinus pyralis* (dem Glühwürmchen) und erzeugt unter ATP-Verbrauch Licht, welches in einem Luminometer gemessen werden kann. Über eine Standardkurve lässt sich der ATP-Gehalt der Probe aus der Lumineszenz berechnen.

Erythrozyten wurden bei einem Hämatokrit von 0,3% unter den jeweiligen Bedingungen (z.B. in Anwesenheit von Aluminium-Ionen für 24 h) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen (5 Minuten, 1.500 g). 50 µl des gewonnenen Pellets wurden in 700 µl destilliertem Wasser bei 4°C lysiert. Nach 5 Minuten wurden die Proteine durch Zugabe von 500 µl Perchlorsäure (5%, 4°C) ausgefällt und bei 1.500 g und 4°C

abzentrifugiert. Dann wurden 400 µl des Überstandes mit gesättigter Kaliumhydrogenkarbonat-Lösung langsam auf einen pH-Wert von 7,7 titriert.

Zur Erstellung der Standardkurve diente lyophilisiertes ATP aus dem Luciferin-Luciferase Assay Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe (finale ATP-Konzentrationen: 1000, 500, 250, 125, 0 nM) wurde die Lumineszenz mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Biolumat LB9500, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Über eine Regressionsgerade wurde die ATP-Konzentration der Proben aus der Lumineszenz berechnet.

Alle Schritte vom Augenblick der Lyse der Zellen an wurden bei 4°C durchgeführt, um einen Abbau des ATP zu verhindern.

2.13 Glutathion-Messung

Frisch entnommene Erythrozyten gesunder Spender wurden zweimal in PBS gewaschen (1.500 g, 5 Minuten, 20°C) und bei einem Hämatokrit von 6% mit Aluminium (Konzentrationen von 10-100 µM) oder Paclitaxel (20 µM) in Ringerlösung bzw. nur in Ringerlösung oder Glukose-freier Ringerlösung (Positivkontrolle) inkubiert. Die Inkubationszeiten waren 24 Stunden (Aluminium) bzw. 48 Stunden (Paclitaxel).

Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal in PBS gewaschen (1.500 g, 5 Minuten, 20°C). Anschließend wurden 50 µl Erythrozytenpellet in 200 µl destilliertem Wasser für 10 Minuten auf Eis lysiert. Die entstandenen Ghostmembranen wurden bei 20.000 g für 15 Minuten abzentrifugiert. 150 µl des Überstands wurden mit 150 µl eisgekühlter, 10%-iger (w/v) Metaphosphorsäure versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden bei 8.000 g für 10 Minuten abzentrifugiert und 200 µl des Überstandes entnommen. Glutathion (GSH und GSSG) wurde dann mittels des Glutathione Assay Kits der Firma Cayman Chemicals (bezogen über IBL-Hamburg, Hamburg, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt. Die Konzentration an GSH wurde in mmol/l Erythrozytenpellet angegeben.

2.14 Western-Blotting

Das Western-Blotting wurde entsprechend der im Labor etablierten Standardmethode durchgeführt [214]. Nach Inkubation der Erythrozyten (Hämatokrit 0,3%) in Ringer bzw. Glukose-freiem Ringer in Anwesenheit von Paclitaxel (10 μ M) oder der korrespondierenden Menge DMSO bei 37°C für 24 Stunden, wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und 100 μ l des Zellpellets in 50 ml Lysepuffer folgender Zusammensetzung lysiert:

Tabelle 8: Lysepuffer

Substanz	Konzentration
HEPES	50 mM
NaOH	Titration bis pH 7,4
EDTA	2,5 mM
Pepstatin A	10 μ g/ml
Leupeptin	5 μ g/ml
Aprotinin	5 μ g/ml
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,1 mM

Die entstandenen Ghostmembranen wurden bei 20.000 g für 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert, in 10 mM HEPES-Puffer (mit Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Der Protease-Inhibitor-Cocktail wurde von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Die so gewonnenen weißen Ghostmembranen wurden in einem Puffer folgender Zusammensetzung aufgelöst:

Tabelle 9: Blotting-Puffer

Substanz	Konzentration
HEPES	10 mM
NaOH	Titration bis pH 7,3
NaCl	125 mM
EDTA	10 mM
Natrium-Pyrophosphat	10 mM
Natrium-Fluorid	10 mM
Natriumdodecyl-Sulfat (SDS)	0,1%
Deoxycholsäure	0,5%
Triton-X-100	1%
β-Mercaptoethanol	10 µl/2 ml

Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford (Biorad, München, Deutschland) bestimmt. Für die Standardkurve wurde Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

Jeweils 50 µg Protein pro Bahn wurden mittels Gelelektrophorese (6%-iger SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine Protan BA83 Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) überführt. Der Proteintransfer wurde mittels Ponceaurotfärbung kontrolliert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5%-iger fettarmer Milch über Nacht bei 4°C wurden die Blots für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen Anti-µ-Calpain-Antikörper (Domäne IV) vom Kaninchen (Sigma, affinitätschromatographisch isolierter Antikörper C5611) bzw. mit einem polyklonalen Anti-Caspase 3 Antikörper vom Kaninchen (Biomol, Hamburg, Deutschland) jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Blots für eine Stunde mit einem Horseradish Peroxidase konjugierten Anti- Kaninchen Antikörper (Amersham, Freiburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 gefärbt. Die Bindung des zweiten Peroxidasegekoppelten Antikörpers wurde mit dem Chemolumineszenz-Kit (ECL) der Firma Amersham detektiert.

2.15 Hämolysemessung

Für die Messung der Hämolyse wurden Erythrozyten bei einem Hämatokrit von 0,3% inkubiert. Von den unter Kontrollbedingungen inkubierten Zellen wurden 400 µl der Erythrozytensuspension entnommen, die Zellen wurden bei 1.500 g für 5 Minuten abzentrifugiert und das gewonnene Pellet in 400 µl destilliertem Wasser lysiert. Die entstandenen Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 20.000 g für 15 Minuten entfernt. Vom Überstand wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei der unverdünnte Überstand mit 100%iger Hämolyse gleichgesetzt wurde. Die Absorption bei 405 nm wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen. Die prozentuale Hämolyse wurde gegen die Absorption aufgetragen. Aus der so gewonnenen Regressionsgerade wurde die Hämolyse im Überstand der verschiedenen Proben in Prozent berechnet.

2.16 Statistik

Es wurden das arithmetische Mittel sowie der Standardfehler berechnet und dargestellt.

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des gepaarten oder ungepaarten t – Tests beim Vergleich von zwei experimentellen Reihen bzw. mit dem ANOVA– Test beim Vergleich mehrerer Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden p- Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

3 Fragestellung der Arbeit

Für eine Vielzahl von Substanzen wurde das Potential beschrieben, eine Anämie auszulösen. Darunter finden sich so unterschiedliche Agenzien wie Taxane und das Aluminiumion. Eine Anämie kann dabei aus einer verminderten Bildung und aus einem erhöhten Verbrauch von Erythrozyten resultieren. Ein möglicher Mechanismus für eine verkürzte Lebenszeit roter Blutkörperchen ist die in dieser Arbeit untersuchte erythrozytäre „Apoptose“.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt herauszufinden, ob Taxane bzw. Aluminium in der Lage sind, diese Form des erythrozytären Zelltods in vitro auszulösen. Außerdem sollten die jeweils zu Grunde liegenden Mechanismen dieser sogenannten „Erytose“ aufgeklärt werden. Hierbei sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Wirkung von Taxane und Aluminium auf Erythrozyten aufgedeckt werden.

Im Hinblick auf die Taxane sollte zusätzlich sowohl in der klinischen Anwendung als auch im Tiermodell eine mögliche Beteiligung des Erythrozyten-Zelltodes an der taxanbedingten Anämie untersucht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Taxane und Erythrozytenzelltod

4.1.1 Blutbildveränderungen unter Behandlung mit Paclitaxel

Es wurden Blutproben von Patienten mit malignen Ovarial- (n=7) und Endometriumtumoren (n=1) untersucht, die eine Behandlung mit einem paclitaxelhaltigen Regime erhielten. Die in Tabelle 10 dargestellten Parameter wurden unmittelbar vor bzw. nach einer Infusion von Paclitaxel (175 mg/m², 3 Stunden) bestimmt. Es zeigte sich, dass die Patienten mit einem Hämoglobingehalt von 10,63 g/dl bereits vor der Infusion anämisch waren. Die Zahl der Retikulozyten war mit 1,9% leicht erhöht. Die Behandlung mit Paclitaxel führte zu einer weiteren, signifikanten Abnahme des Hämoglobingehaltes um 6,3%, des Hämatokrits um 7,5% und der Zahl an roten Blutzellen um 7,5%. Dieser Abfall an Erythrozyten wurde nicht von einem entsprechenden Abfall der Retikulozyten begleitet. Diese zeigten im Gegenteil eine ansteigende Tendenz, was einen Abfall der roten Blutzellen aufgrund einer verminderten Hämatopoese unwahrscheinlich erscheinen lässt und eher auf einen gesteigerten Erythrozytenverlust hindeutet (siehe Tabelle 10).

Ergebnisse

Tabelle 10: Differentialblutbilder vor und nach Paclitaxelinfusion.

Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8). In Spalte 4 sind die p-Werte angegeben, die einen signifikanten Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den Ergebnissen vor und nach Infusion von Paclitaxel (175mg/m²) anzeigen. n.s. = nicht signifikant im gepaarten t-Test.

	Mittelwerte ± Standardfehler		Gepaarter t-test
	vorher	nachher	
Leukozyten (µl ⁻¹)	6120 ± 682	6536 ± 1092	n.s.
Neutrophile (%)	85 ± 3	89 ± 1	n.s.
Eosinophile (%)	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	n.s.
Basophile (%)	0.20 ± 0.05	0.13 ± 0.03	n.s.
Lymphozyten (%)	10 ± 1	9 ± 1	n.s.
Monozyten (%)	3.8 ± 1.7	1.3 ± 0.3	n.s.
Unklassifizierte (%)	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	n.s.
Erythrozyten (10 ⁶ /µl)	3.51 ± 0.16	3.29 ± 0.10	0.033
Hämatokrit (%)	33.2 ± 0.8	30.7 ± 0.6	0.008
Hämoglobin (g/dl)	10.63 ± 0.37	9.83 ± 0.27	0.0009
MCH (pg)	29.9 ± 0.8	29.3 ± 0.6	n.s.
MCHC (g/dl)	31.5 ± 0.8	31.5 ± 1.0	n.s.
Hypochrom. Ery (%)	17.9 ± 9.7	11.8 ± 5.6	n.s.
MCV (fl)	95 ± 4	93 ± 4	n.s.
Reticulozyten (%)	1.9 ± 0.3	2.4 ± 0.5	n.s.
HB/Reti (g/dl)	33.9 ± 0.8	33.8 ± 0.7	n.s.
Thrombozyten (1000/µl)	326 ± 34	317 ± 37	n.s.

4.1.2 „Eryptose“ in der klinischen Anwendung von Paclitaxel

Um zu klären, ob der beobachtete Verlust an Erythrozyten von den in der Einleitung beschriebenen apoptoseähnlichen Vorgängen herrührt, wurden zwei wesentliche Parameter der Eryptose durchflusszytometrisch bestimmt. Zum einen ist dies das Erscheinen von Phosphatidylserin (PS) an der Membranoberfläche zum anderen die Zellschrumpfung. Beide Meßgrößen wurden vor und nach der Infusion von Paclitaxel durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 4 gezeigt, fand sich tatsächlich ein signifikanter Anstieg Annexin-V-Fluos positiver Eyrthrozyten als Maß für Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, von 1,11% vor der Behandlung, auf 1,51% nach der Behandlung (n=8). Die Zunahme Annexin bindender Zellen ging bei dieser Subpopulation einher mit einer signifikanten Abnahme des Signals im Forward Scatter, was einer Abnahme des Zellvolumens entspricht. Dies ist ein weiteres typisches Zeichen des apoptotischen Zelltodes im Unterschied zur Nekrose, die mit Zellschwellung und schließlich dem Verlust der Integrität der Zelle einher geht. Abbildung 4 zeigt eine repräsentative Verteilung der Zellen als Funktion von Fluoreszenz im FL1-Kanal und Vorwärtsstreuung des Lichts sowie den verwendeten Schwellenwert zur Trennung der annexin-positiven Population von den übrigen Erythrozyten.

Ergebnisse

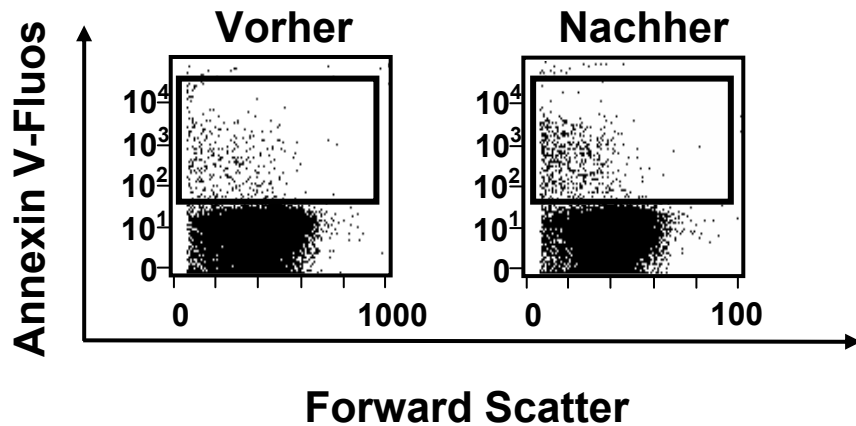


Abbildung 4: Stimulation der PS-Exposition von Patienten-Erythrozyten vor und nach Infusion von Paclitaxel.

Zweidimensionale Durchflusszytometer-Histogramme des Forward-Scatters (x-Achse, linearer Maßstab) und der Fluoreszenz (y-Achse, logarithmischer Maßstab). Links ein Histogramm vor, rechts nach Infusion von Paclitaxel (175 mg/m²). Zellen innerhalb der Fenster wurden in der quantitativen Auswertung als annexin-positiv gewertet.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Annexin-positiven Zellen vor und nach Paclitaxelinfusion bzw. den Forward Scatter der annexin-positiven und annexin-negativen Zellen vor sowie nach Behandlung mit Paclitaxel. Diese Ergebnisse zeigen, dass *in vivo* eine Subpopulation der Erythrozyten tatsächlich die typischen apoptotischen Merkmale der Zellschrumpfung und der Phosphatidylserin-Exposition zeigt.

Ergebnisse

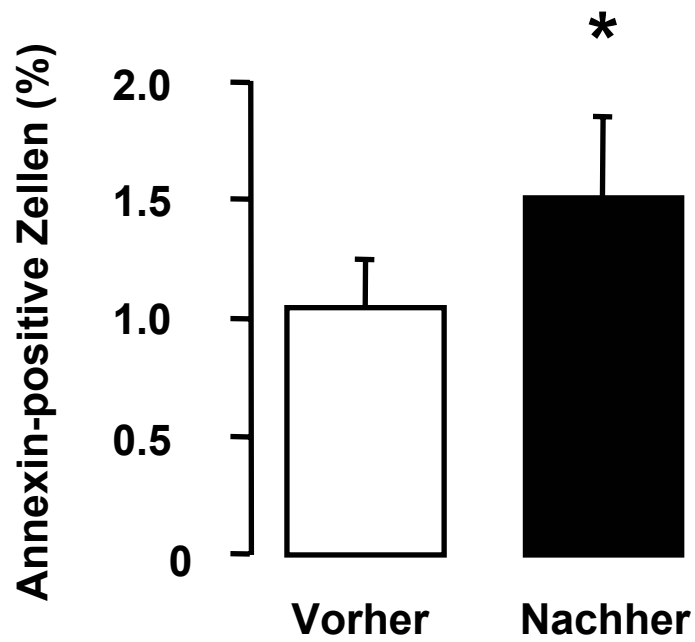


Abbildung 5: Stimulation der PS-Exposition von Patienten-Erythrozyten vor und nach Infusion von Paclitaxel.

Quantitative Darstellung (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=8$) des Anteils Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation, vor (offener Balken) und nach (geschlossener Balken) Infusion von Paclitaxel (175 mg/m^2).

* bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, Einproben t-Test und gepaarter t-Test) gegenüber der Kontrolle (vor Infusion).

Ergebnisse

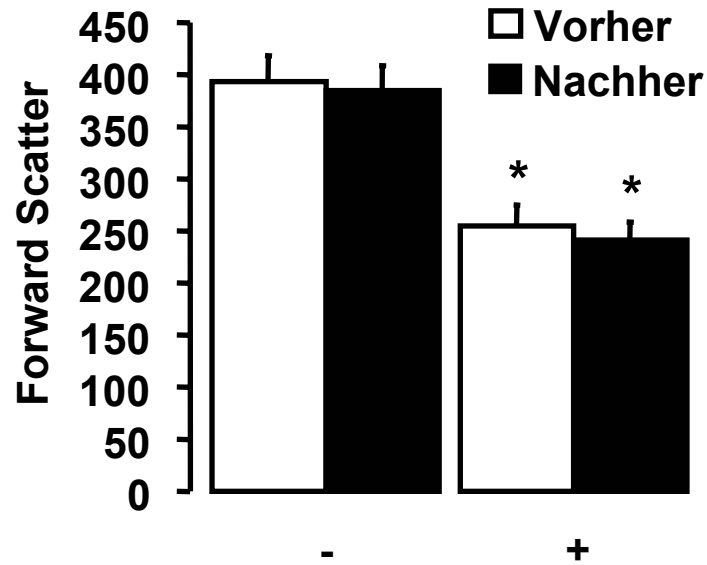


Abbildung 6: Schrumpfung von PS-positiven Patienten-Erythrozyten nach Infusion von Paclitaxel.

Quantitative Darstellung (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=8$) des geometrischen Mittels der Häufigkeitsverteilung der Zellen im Forward-Scatter vor (offene Balken) und nach (geschlossene Balken) Infusion von Paclitaxel (175 mg/m^2) jeweils für die annexin-positive (+) und annexin-negative (-) Population. Die Einteilung in Annexin-positive bzw. Annexin-negative Zellen erfolgte entsprechend der in Abbildung 4 dargestellten Fensterung. * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, gepaarter t-Test) gegenüber der Kontrolle (Annexin-negative Zellen).

4.1.3 „Erythrozytenapoptose“ *in vitro*

Um die Mechanismen dieser *in vivo* Beobachtung aufzuklären, wurden weitere Experimente *in vitro* durchgeführt.

4.1.3.1 Phosphatidylserin-Exposition

In Übereinstimmung mit den oben dargestellten Ergebnissen fand sich ein signifikanter Anstieg der annexin-bindenden Erythrozyten gesunder Spender nach einer 24- bzw. 48-stündigen Inkubation mit Paclitaxel in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ auf ungefähr das Doppelte, verglichen mit Kontrollerythrozyten, die nur mit der entsprechenden Trägerlösung behandelt wurden (Abbildung 7). Außerdem zeigte sich eine positive Dosis-

Ergebnisse

Wirkungsbeziehung im Bereich einer Paclitaxelkonzentration von 10 μM -100 μM nach 48 Stunden (Abbildung 8).

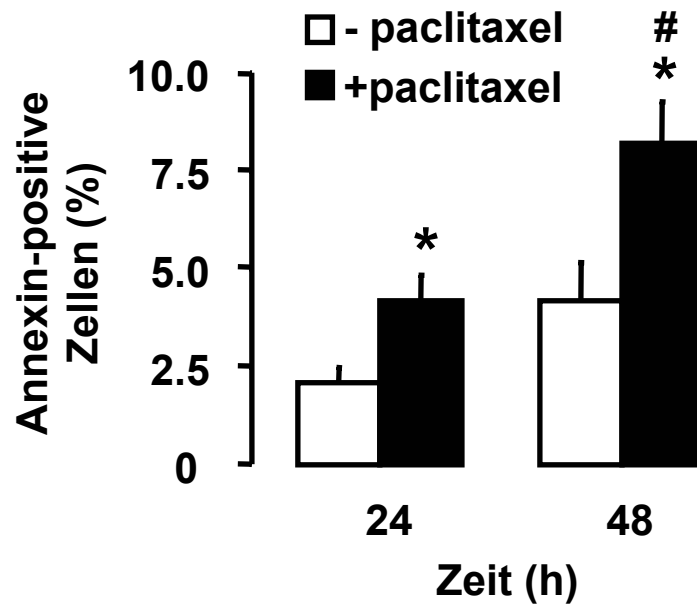


Abbildung 7: PS-Exposition durch Paclitaxel *in vitro*.

Effekt von Paclitaxel (10 μM) (geschlossene Balken) auf den Anteil Annexin-positiver Zellen (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=8 - 16$) nach 24 Stunden (Balken links) und 48 Stunden (Balken rechts). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber der entsprechenden Kontrolle (offene Balken). # zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) Annexin-positiver Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Paclitaxel verglichen mit dem entsprechenden Wert nach 24 Stunden.

Ergebnisse

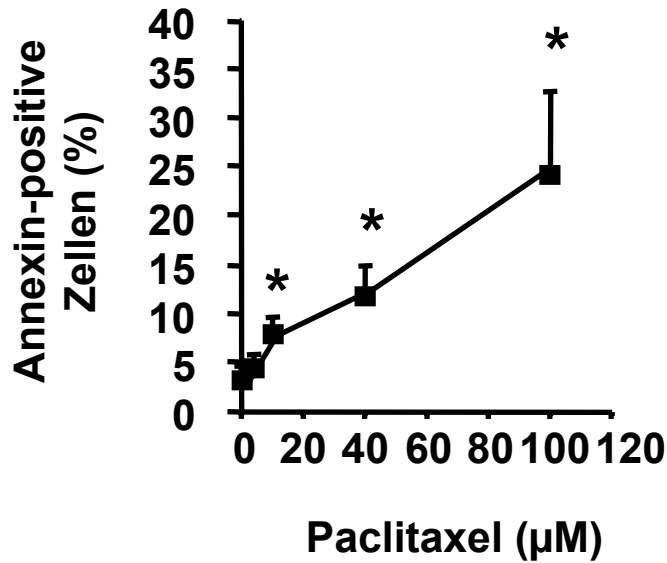


Abbildung 8: Dosiswirkungskurve der PS-Exposition von Paclitaxel *in vitro*.

Konzentrationsabhängiger Effekt von Paclitaxel auf den Anteil Annexin-positiver Zellen (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=10 - 26$). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber der Kontrolle (Inkubation in Ringer ohne Paclitaxel)

Interessanterweise zeigte die Inkubation von Erythrozyten mit Zytostatika, die nicht über Hemmung der Mikrotubuli wirken, keinen signifikanten Anstieg der PS-Exposition. Exemplarisch wurden die Zytostatika Carboplatin und Doxorubicin im Hinblick auf die PS-Exposition untersucht. Das Taxol-Derivat Docetaxel hingegen zeigte ebenso wie Paclitaxel einen signifikanten Anstieg PS-exponierender Zellen in der Durchflusszytometrie (Tabelle 11).

Ein weiterer interessanter Befund ist die Tatsache, dass Colchizin als Mikrotubuli destabilisierende Substanz einen protektiven Effekt auf die Erythrozyten hat. Nach 72-stündiger Inkubation von Erythrozyten mit 50 µM Colchizin fanden sich dreimal weniger PS-exponierende Zellen als in der entsprechenden Kontrolle (Daten nicht dargestellt). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei der Wirkung der Taxane möglicherweise um einen Effekt handelt, der über das Zytoskelett vermittelt wird.

Ergebnisse

Tabelle 11: Effekte verschiedener Zytostatika auf die PS-Exposition nach 48 Stunden *in vitro*.

Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler in Prozent der entsprechenden Kontrolle (unbehandelte Erythrozyten) angegeben. P-Werte, die einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle anzeigen, sind in Spalte 4 angegeben. n. s. = nicht signifikant. Die absoluten Anteile Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation unter Kontrollbedingungen sind ^a 4,0 \pm 1,0%, ^b 2,1 \pm 0,4%, ^c 2,1 \pm 0,4%, ^d 6,6 \pm 1,3%.

Zytostatikum (Konzentration)	Annexin-V-positive Zellen (% der Kontrolle)	n	Gepaarter t-test
Paclitaxel (10 μ M)	229 \pm 30 ^a	15	0.01
Docetaxel (10 μ M)	345 \pm 45 ^b	14	0.0001
Carboplatin (10 μ M)	138 \pm 15 ^c	12	n.s.
Doxorubicin (10 μ M)	93 \pm 8 ^d	8	n.s.

4.1.3.2 Zellschrumpfung

Ebenso wie die PS-Exposition der Zellen ließ sich auch die Zellschrumpfung *in vitro* nachvollziehen. Abbildung 9 zeigt die Häufigkeitsverteilung einer repräsentativen Zellpopulation im Forward Scatter. Verglichen mit der entsprechenden Kontrolle findet sich ein Verlust an Zellen mittlerer Größe und zugleich die Zunahme einer Population besonders kleiner Zellen nach der Inkubation mit Paclitaxel (10 μ M) für 48 h.

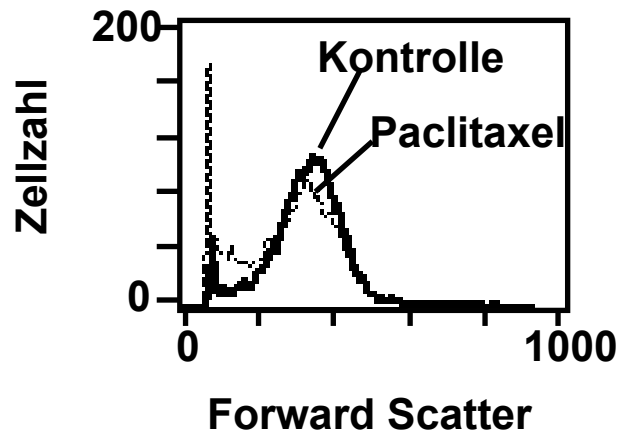


Abbildung 9: Forward-Scatter unter Einwirkung von Paclitaxel.

Repräsentative Häufigkeitsverteilung der Erythrozyten im Forward Scatter nach 48-stündiger Inkubation mit Paclitaxel (10 μM) und nach 48-stündiger Inkubation in Ringer (Kontrolle).

Auch die mittlere Größe behandelter Zellen zeigt eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme im Bereich von Paclitaxelkonzentrationen zwischen 10 und 100 μM nach 48 Stunden (Abbildung 10).

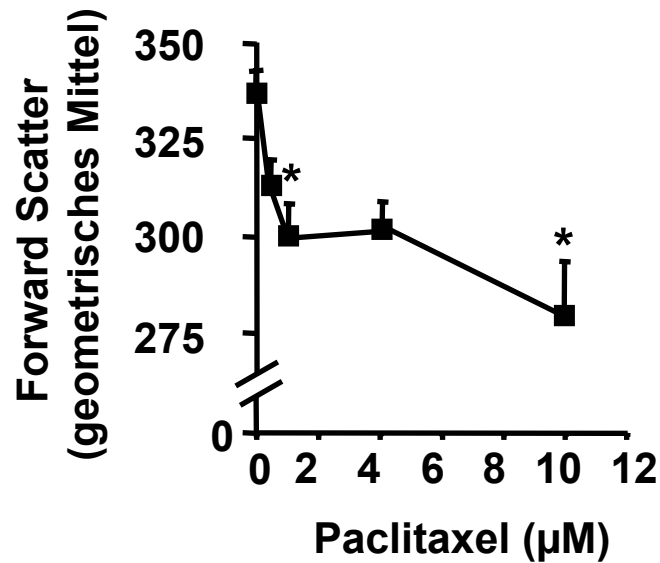


Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve des Forward-Scatter unter Paclitaxel *in vitro*.

Konzentrations-abhängiger Effekt von Paclitaxel (48 Stunden) auf den Forward Scatter (geometrisches Mittel). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber der Kontrolle (Inkubation in Ringer ohne Paclitaxel).

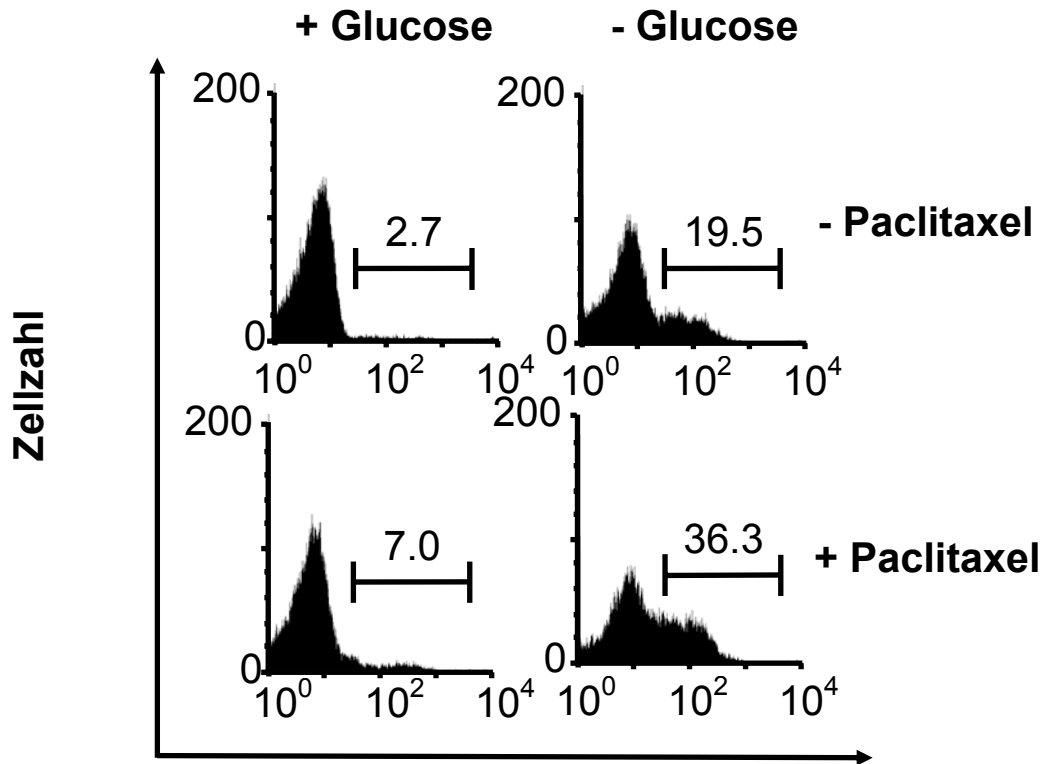
4.1.3.3 Paclitaxel in Kombination mit Stressoren

Um den Einfluss von Paclitaxel auf den bekannten stressinduzierten Erythrozytenzelltod [67, 180] zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Hierzu wurden bei den Zellen einerseits durch Wegnahme von Glukose, andererseits durch Inkubation in hyperosmolarer Lösung, „Apoptose“ induziert.

4.1.3.4 Paclitaxel in Kombination mit Glukosemangel

Es zeigte sich, dass Paclitaxel zu einer Verstärkung des durch Glukosemangel induzierten Zelltodes führt. Abbildung 11 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Erythrozyten im Fluoreszenzkanal FL1 als Maß für die Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Membran. Es zeigte sich, dass die Wegnahme von Glukose zur PS-Exposition nach 48 Stunden führte -

ein Effekt, der sich durch die gleichzeitige Anwesenheit von Paclitaxel signifikant verstärken ließ (Abbildung 12).



Annexin V-Fluos-abhängige Fluoreszenz

Abbildung 11: Verstärkung der durch Glucosemangel induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Histogramme).

Repräsentative Häufigkeitsverteilungen der PS-abhängigen Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 Stunden in glucosefreier Ringerlösung (Histogramme links) und in Ringerlösung (Histogramme rechts) jeweils in Abwesenheit von Paclitaxel (Histogramme oben) und in Anwesenheit von 10 μ M Paclitaxel (Histogramme unten).

Ergebnisse

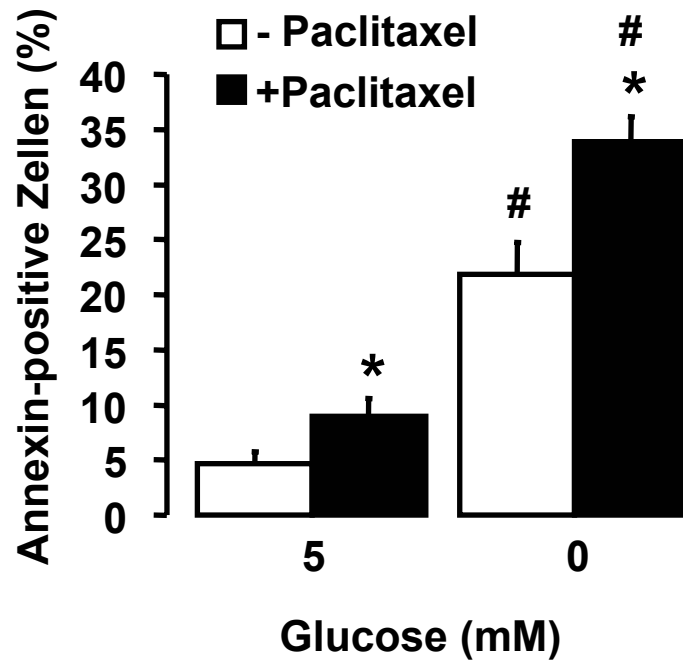


Abbildung 12: Verstärkung der durch Glucosemangel induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).

Annexin-positive Zellen (% der gesamten Population) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer (Balken links) und glucosefreiem Ringer (Balken rechts), in Abwesenheit von Paclitaxel (offene Balken) und in Anwesenheit von 10 μ M Paclitaxel (geschlossene Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=10-18). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Werten der Kontroll-Lösung in Abwesenheit von Paclitaxel. # bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Werten der jeweiligen glukosehaltigen Ringerlösung.

4.1.3.5 ATP-Gehalt unter Paclitaxel

Nach 48-stündiger Inkubation von Erythrozyten mit Paclitaxel (20 μ M) fand sich kein Hinweis auf einen Einfluss auf den ATP-Gehalt der Zellen (Abbildung 13). Der erwartete Abfall des ATP-Gehalts in Glukose-freier Lösung (Positivkontrolle) war hingegen statistisch signifikant.

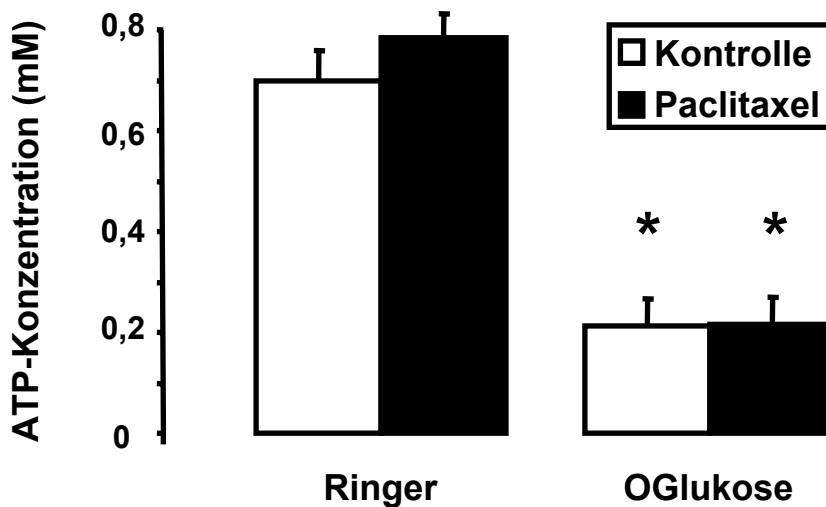


Abbildung 13: Intrazelluläres ATP unter Paclitaxel.

Intrazelluläre Konzentration an ATP (mM) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer (Balken links) und Glukose-freiem Ringer (Balken rechts) in Abwesenheit von Paclitaxel (offene Balken, Kontrolle) und Anwesenheit von 20 μ M Paclitaxel (geschlossene Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Werten in Anwesenheit von Glukose.

4.1.3.6 Redoxstatus unter Paclitaxel

Nach 48-stündiger Inkubation von frischen Erythrozyten in Anwesenheit von 20 μ M Paclitaxel fand sich kein Anhalt für einen Abfall des intrazellulären Glutathions der Erythrozyten. Auch in Kombination mit Glukosemangel, der alleine zu einem deutlich niedrigeren Glutathion-Gehalt führte, zeigte sich kein zusätzlicher Effekt von Paclitaxel (Abbildung 14).

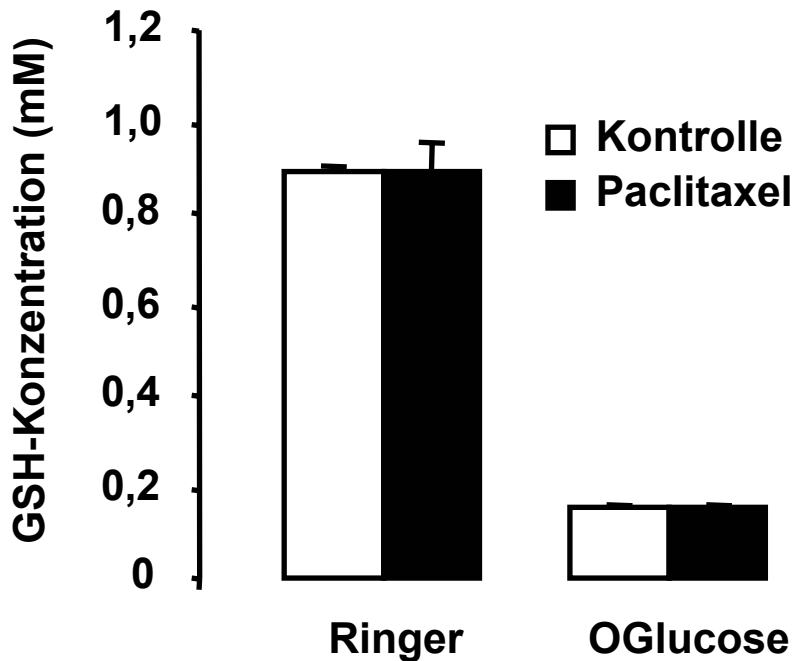


Abbildung 14: Glutathion-Gehalt unter Paclitaxel und Glukose-Mangel.

Intrazelluläre Konzentration an reduziertem Glutathion (mM) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer (Balken links) und Glukose-freiem Ringer (Balken rechts), in Abwesenheit von Paclitaxel (offne Balken, Kontrolle) und Anwesenheit von 20 μ M Paclitaxel (geschlossene Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=2).

4.1.3.7 Paclitaxel in Kombination mit Hyperosmolarität

Ähnlich wie beim durch Glukosemangel verursachten Zelltod fand sich auch unter Inkubation der Zellen in einer Lösung mit einer Osmolarität von 850 mOsmol eine Paclitaxel-induzierte Verstärkung der PS-Exposition. Abbildung 15 zeigt die Häufigkeitsverteilung annexin-positiver Zellen unter den einzelnen Bedingungen. In Abbildung 16 ist der signifikante Anstieg „apoptotischer“ Zellen unter hyperosmolarem Stress und nach Behandlung mit Paclitaxel (10 μ M), sowie nach der Kombination beider Faktoren nach 6 Stunden zu erkennen.

Ergebnisse

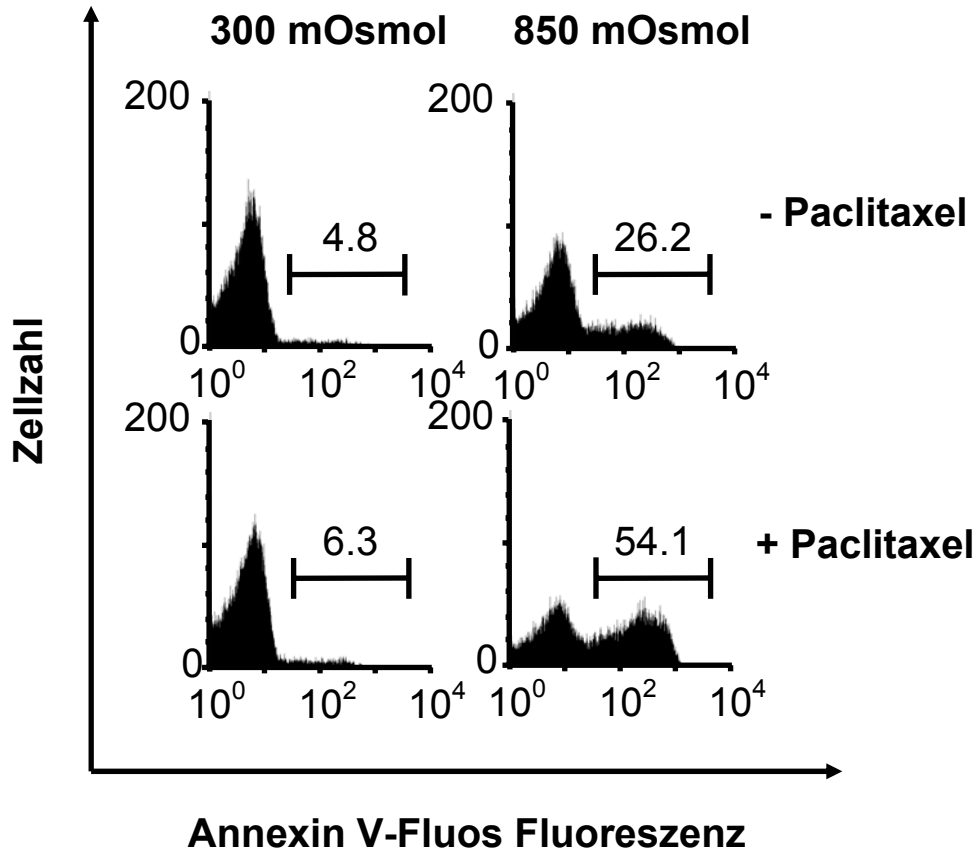


Abbildung 15: Verstärkung der durch Hyperosmolarität induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Histogramme).

Repräsentative Häufigkeitsverteilungen der PS-abhängigen Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 6 Stunden in Ringerlösung einer Osmolarität von 850 mOsmol (Histogramme rechts) und in isotoner Ringerlösung (Histogramme links), in Abwesenheit von Paclitaxel (Histogramme oben) oder in Anwesenheit von 10 μ M Paclitaxel (Histogramme unten).

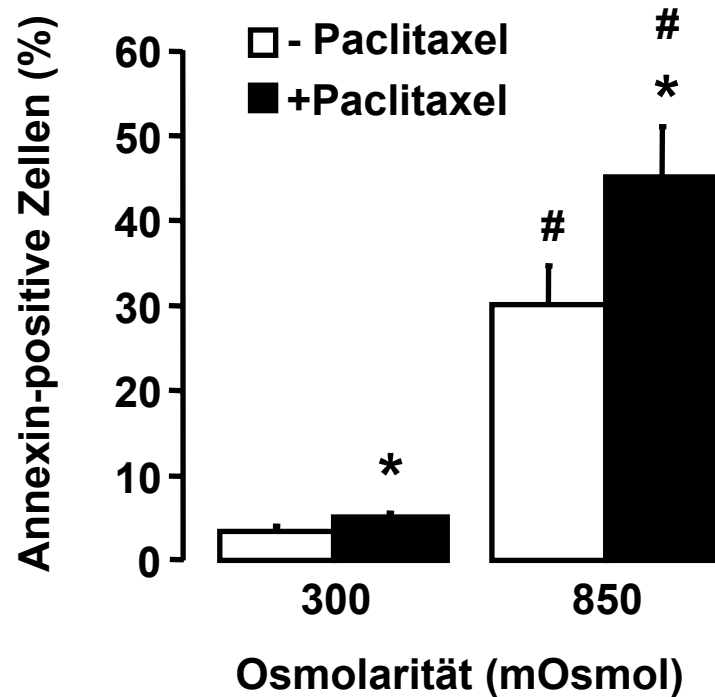


Abbildung 16: Verstärkung der durch Hyperosmolarität induzierten PS-Exposition durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).

Annexin-positive Zellen (% der gesamten Population) nach 6-stündiger Inkubation in isotonem Ringer (Balken links) und hypertonem (850mOsmol) Ringer (Balken rechts), in Abwesenheit von Paclitaxel (offne Balken) und Anwesenheit von 10 μ M Paclitaxel (geschlossene Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=8-18). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den entsprechenden Kontroll-Werten in Abwesenheit von Paclitaxel. # bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den jeweiligen Werten in isotoner Ringerlösung.

4.1.4 Mechanismen der Erythrozytenapoptose durch Paclitaxel

Der programmierte Erythrozytenzelltod wird im wesentlichen über zwei Wege vermittelt: 1. den Einstrom von Calcium, und 2. durch die Bildung von Ceramid durch die erythrozytäre Sphingomyelinase. Beides führt letztlich zur Verlagerung von Phosphatidylserin ins äußere Blatt der Membran. Calcium führt darüber hinaus über die Aktivierung von Kaliumkanälen zur Zellschrumpfung [179, 232, 233].

4.1.4.1 Calcium-Gehalt unter Paclitaxelbehandlung

Da Calciumeinstrom in die Erythrozyten, wie oben beschrieben, einen wesentlichen Mechanismus des Erythrozyten-Zelltodes darstellt, wurde der Einfluss von Paclitaxel auf den Calciumgehalt der Zellen untersucht. Dieser wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des calciumspezifischen Farbstoffs Fluo-3/AM bestimmt.

Bereits nach 20 Minuten fand sich ein signifikanter Anstieg von Zellen mit erhöhter Fluo-3/AM Fluoreszenz. Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Häufigkeitsverteilung im FL1-Kanal sowie das für die quantitative Auswertung verwendete Fenster. Abbildung 18 gibt den prozentualen Anteil Fluo-3-AM positiver Zellen in Anwesenheit von Paclitaxel (10 μM) verglichen mit der entsprechenden Kontrolle wieder. Das Calcium-Ionophor Ionomycin zeigt einen massiven Calciumanstieg und diente als Positivkontrolle.

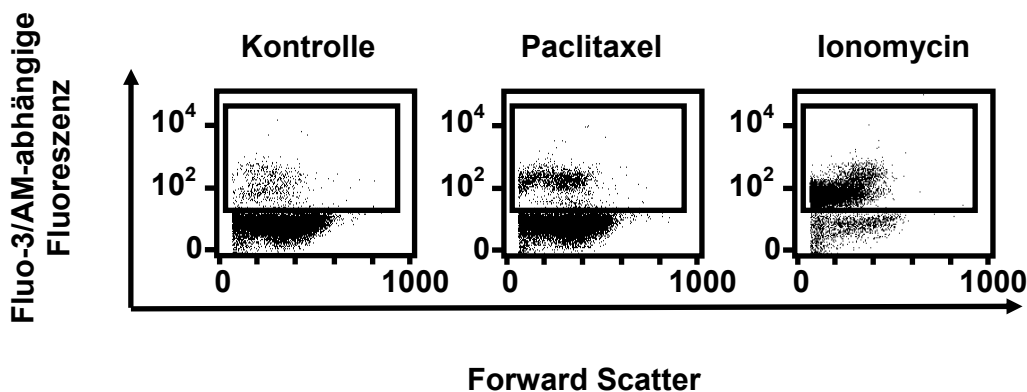


Abbildung 17: Erhöhte zytosolische Calciumkonzentration durch Paclitaxel (Histogramme).

Zweidimensionale Darstellung einer repräsentativen Zellverteilung als Funktion der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz (y-Achse) und des Forward Scatters (x-Achse). Links nach 20-minütiger Inkubation der Fluo-3/AM beladenen Erythrozyten in Ringer-Lösung. In der Mitte nach 20-minütiger Inkubation mit Paclitaxel (10 μM). Rechts nach 20-minütiger Inkubation mit Ionomycin (1 μM). Dargestellt ist außerdem das verwendete Fenster für die quantitative Auswertung.

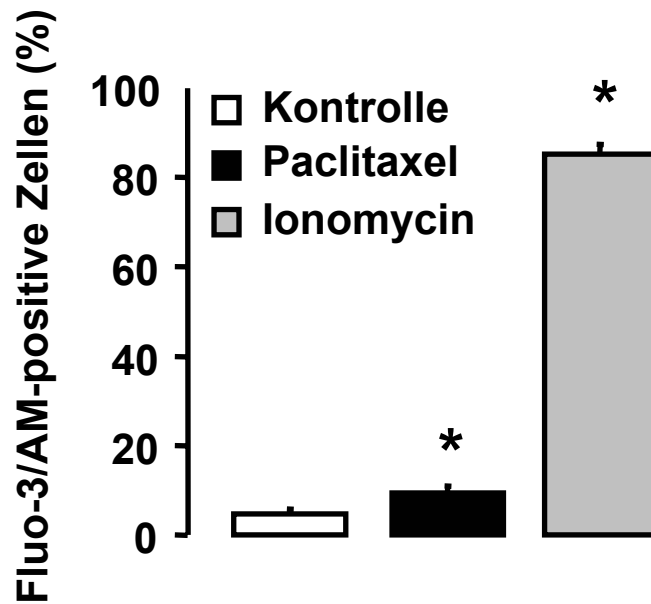


Abbildung 18: Erhöhte zytosolische Calciumkonzentration durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).

Mittlerer Prozentsatz \pm Standardfehler (n=8) der Erythrozyten mit vermehrter Fluo-3/AM-Fluoreszenz nach 20-minütiger Inkubation in Ringer (Links), mit Paclitaxel 10 μ M (Mitte) und mit Ionomycin 1 μ M (Rechts). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Werten der Kontrolle (Ringer-Lösung).

4.1.4.2 Ceramid-Bildung unter Paclitaxelbehandlung

Der neben Calcium wichtigste Mediator des erythrozytären Zelltodes, das enzymatisch gebildete Ceramid [180], wurde mit Hilfe der oben beschriebenen, antikörperbasierten Methode im Durchflusszytometer bestimmt. Es fand sich ein erhöhter Ceramidgehalt der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Paclitaxel in einer Konzentration von 10 μ M. Abbildung 19 zeigt repräsentative Häufigkeitsverteilungen der Zellen als Funktion des Signals des FL1-Kanals und des Forward-Scatters, sowie das für die quantitative Auswertung verwendete Fenster. Abbildung 20 zeigt den signifikanten Anstieg der Ceramid-abhängigen Fluoreszenz nach Inkubation mit Paclitaxel, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die für 5 Minuten mit bakterieller Sphingomyelinase präinkubiert worden waren.

Ergebnisse

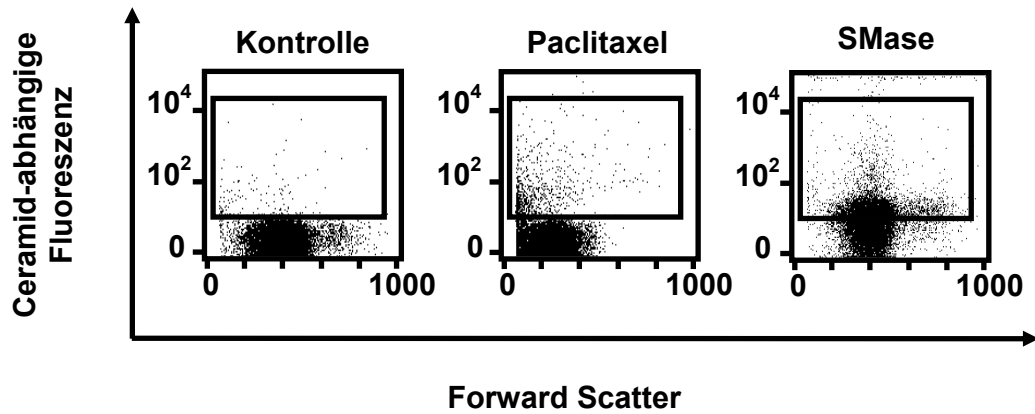


Abbildung 19: Vermehrte Ceramid-Bildung durch Paclitaxel (Histogramme).

Zweidimensionale Darstellung einer repräsentativen Zellverteilung als Funktion der ceramid-abhängigen Fluoreszenz (y-Achse) und des Forward Scatters (x-Achse). Links nach 24-stündiger Inkubation der Erythrozyten in Ringer-Lösung. In der Mitte nach 24-stündiger Inkubation mit Paclitaxel (10 μ M). Rechts nach 5-minütiger Inkubation mit 1U/ml bakterieller Sphingomyelinase (SMase). Dargestellt ist außerdem das verwendete Fenster für die quantitative Auswertung.

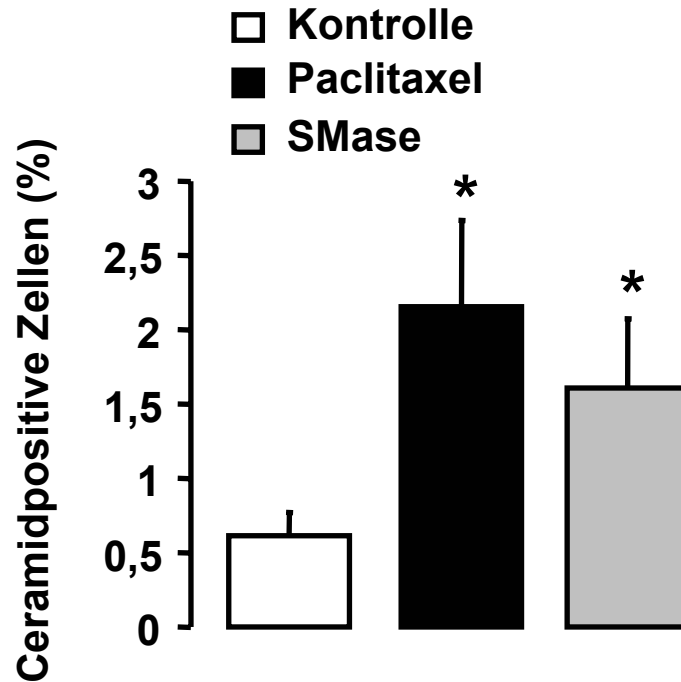


Abbildung 20: Vermehrte Ceramidbildung durch Paclitaxel (Quantitative Auswertung).

Mittlerer Prozentsatz \pm Standardfehler (n=6) der Erythrozyten mit vermehrter Fluoreszenz des Anti-Ceramid FITC-gekoppelten Antikörpers nach 24-stündiger Inkubation in Ringer (Links), mit Paclitaxel 10 μ M (Mitte) und nach 5-minütiger Inkubation mit 1 U/ml bakterieller Sphingomyelinase (Rechts). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Kontroll-Werten (Ringer-Lösung).

4.1.4.3 Ceramidbildung unter Paclitaxelbehandlung im Tiermodell

Um die Bildung von Ceramid auch *in vivo* nachzuvollziehen, wurde C57BL6 Mäusen Paclitaxel injiziert und die Aktivität der sauren Sphingomyelinase sowohl in Vollblut als auch aufgrund der Sekretion aktivierter Sphingomyelinase im Serum bestimmt. Dabei wurden Blutproben unmittelbar vor und 10 Minuten nach Injektion von 4,5 μ g/g Körpergewicht Paclitaxel untersucht. Abbildung 21 zeigt einen signifikanten Anstieg der sauren Sphingomyelinaseaktivität relativ zur Kontrolle sowohl im Vollblut als auch im Serum.

Ergebnisse

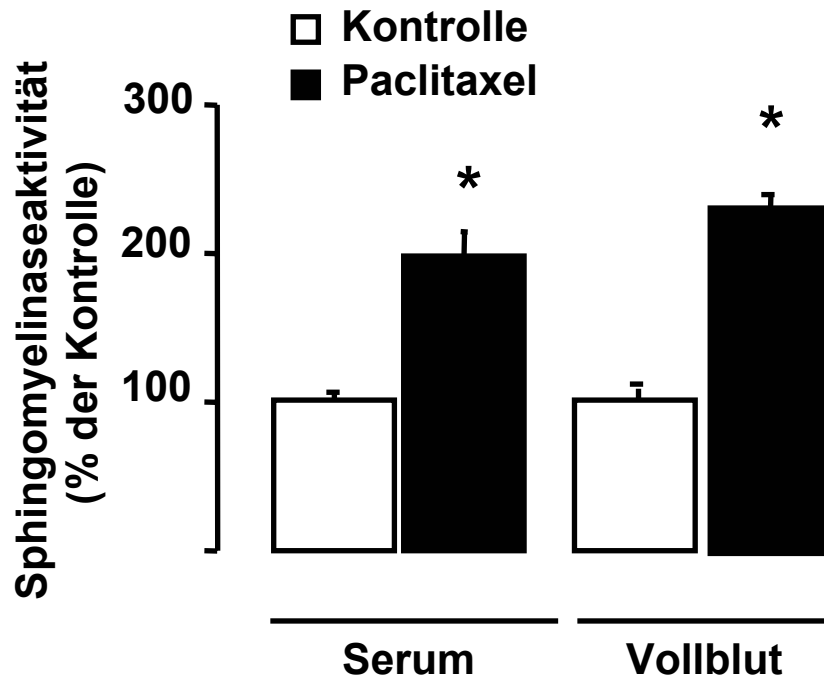


Abbildung 21: Aktivierung der sauren Sphingomyelinase nach Paclitaxelinjektion *in vivo*.

Aktivität der sauren Sphingomyelinase 10 Minuten nach Injektion von 4,5 µg/g Körpergewicht Paclitaxel in C57BL/6 Mäuse. Darstellung der Mittelwerte ±Standardfehler als % der Kontrolle, links im Serum und rechts im Vollblut, nach Injektion von Trägerlösung (offene Balken) bzw. von Paclitaxel (geschlossene Balken). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den entsprechenden mit Trägerlösung behandelten Kontrollen.

4.1.4.4 Die Rolle der Caspasen

Da Caspasen bei der paclitaxel-induzierten Apoptose kernhaltiger Zellen eine wesentliche Rolle spielen [54, 234, 235], wurde die Beteiligung der Caspasen an der Erythrozytenapoptose durch Paclitaxel genauer untersucht.

4.1.4.4.1 Caspasenaktivierung im Western-Blot

Um eine mögliche Beteiligung von Caspasen beim Paclitaxel-induzierten Erythrozytenzelltod aufzudecken, wurden Erythrozyten für 24 Stunden mit Paclitaxel (10 μ M) inkubiert und mittels Western-Blotting auf die Spaltung der Effektorcaspase 3 untersucht.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, fand sich zwar wie erwartet Procaspase 3 in den Erythrozyten [151], die bei einer proteolytischen Aktivierung zu erwartenden Spaltprodukte ließen sich jedoch nicht nachweisen. Selbst nach Inkubation der Zellen in Glukose-freier Lösung und simultaner Behandlung mit Paclitaxel fand sich keine Aktivierung von Pro-Caspase 3. Bei den als Positivkontrolle dienenden Jurkat-Zellen hingegen fanden sich die entsprechenden Spaltprodukte (p21, p20 und p17) nach Inkubation mit Paclitaxel.

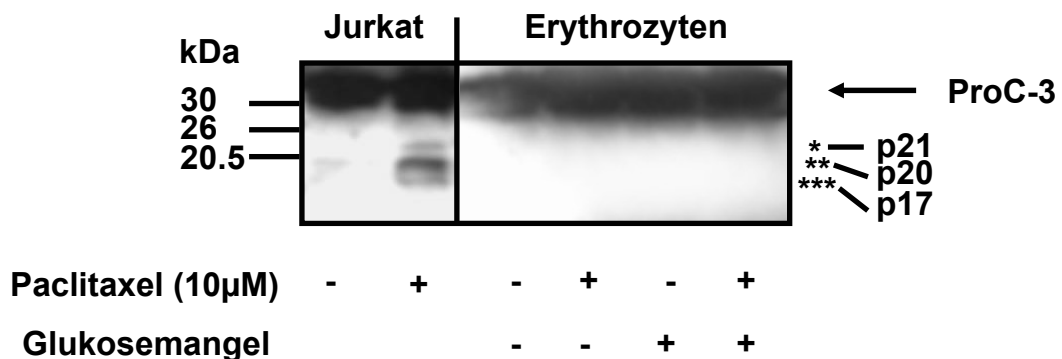


Abbildung 22: Fehlende Caspase-3-Aktivierung unter Paclitaxel in Erythrozyten.

Western-Blot von Zellextrakten von Jurkat-T-Zellen (25 μ g/Bahn) nach 24-stündiger Inkubation in Medium (linke Bahn) und Paclitaxel-enthaltendem Medium (2. Bahn von links). Rechts Darstellung des Blots (300 μ g/Bahn) nach 24-stündiger Inkubation von Erythrozyten in Ringer (Bahnen 3 und 4 von links) und in glukosefreiem Ringer (Bahnen 5 und 6 von links), in Anwesenheit von 10 μ M Paclitaxel (Bahnen 4 und 6 von links) und in Abwesenheit von Paclitaxel (Bahnen 3 und 5). Links sind die Positionen des Markerproteine angegeben. Der Pfeil rechts zeigt die Position von Pro-Caspase 3 an, die Sterne geben die erwarteten Positionen der aktiven Spaltprodukte von Pro-Caspase 3 an.

4.1.4.4.2 Caspasenhemmung mittels Pancaspaseninhibitor

Neben der direkten Untersuchung der Caspasenaktivierung durch Western-Blotting wurde die Rolle von Caspasen funktionell mit Hilfe des Pan-Caspasen-Inhibitors z-VAD-fmk untersucht.

Wie Abbildung 23 zu entnehmen ist, ließ sich die Paclitaxel-induzierte PS-Exposition durch den Pancaspaseninhibitor z-VAD-fmk nicht hemmen. Bei Paclitaxel-behandelten Jurkat-Zellen ließ sich die Annexinbindung nach Inkubation mit 10 µM Paclitaxel für 24 Stunden dagegen signifikant abschwächen.

Wie bereits für andere Auslöser der Erythrozytenapoptose beschrieben [151, 152, 180], scheint also auch der durch Paclitaxel hervorgerufene, programmierte Erythrozytentod nicht von der Caspasenaktivierung abhängig zu sein.

Ergebnisse

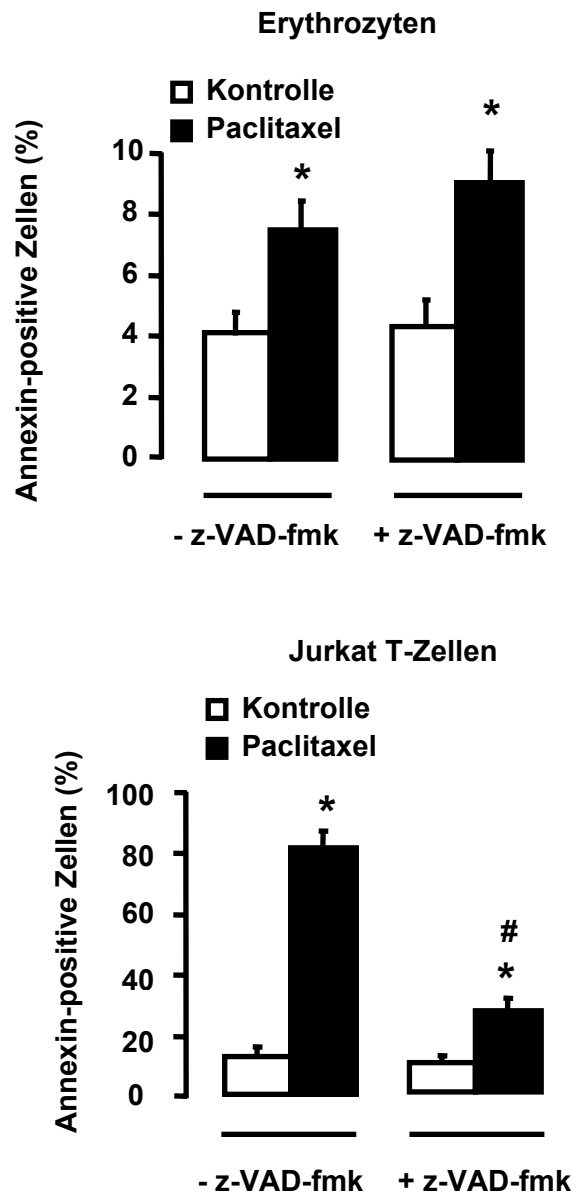


Abbildung 23: Hemmung der Paclitaxel induzierten PS-Exposition in Jurkat T-Zellen, aber nicht in Erythrozyten.

Anteil Annexin-positiver Jurkat-Zellen (oberes Diagramm) und Annexin-positiver Erythrozyten (unteres Diagramm) an der gesamten Population nach 24 Stunden als Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=4-10$). Rechts sind jeweils die Ergebnisse nach einstündiger Präinkubation mit z-VAD-fmk (25 μ M), links ohne z-VAD-fmk dargestellt. Offene Balken zeigen die Inkubation unter Kontrollbedingungen (Jurkat-Zellen in entsprechendem Medium, Erythrozyten in Ringer), geschlossene Balken die Inkubation mit Paclitaxel (10 μ M) an. * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den mit Trägerlösung behandelten Kontrollen. # zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber Paclitaxel-behandelten Zellen in Abwesenheit von z-VAD-fmk.

4.1.4.5 Die Rolle der Calpaine

Calpaine sind Calcium-abhängige Proteasen die, wie oben beschrieben, eine Rolle bei der Erythrozytenalterung [213] und bei der Erythrozytenapoptose [151, 214] spielen. Um ihre Bedeutung beim programmierten Erythrozytentod nach Behandlung mit Paclitaxel aufzuklären, wurde die Aktivierung von μ -Calpain mittels Western-Blotting untersucht. Tatsächlich ließ sich nach einer Inkubation der roten Blutzellen mit 10 μ M Paclitaxel für 24 Stunden eine Spaltung des μ -Calpains (p80) in die aktive Form (p76) nachweisen (Abbildung 24). Auch unter Glukosemangel konnte die Spaltung von μ -Calpain beobachtet werden.

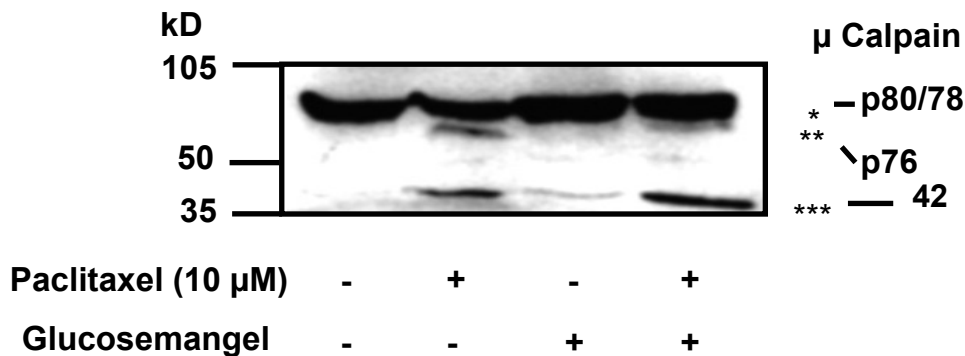


Abbildung 24: Spaltung von μ -Calpain in Erythrozyten durch Paclitaxel.

Western-Blot von erythrozytären Zellextrakten nach Inkubation für 24 Stunden in Ringer (Bahn 1 und 2 von links) und Glucose-freiem Ringer (Bahn 3 und 4 von links), in Abwesenheit von Paclitaxel (Bahn 1 und 3 von links) und Anwesenheit von 10 μ M Paclitaxel (Bahn 2 und 4 von links). Zur Darstellung kommen die μ -Calpain-spezifischen Banden. Links sind die Positionen der Markerproteine angegeben. * markiert die p80/78 inaktive, latente Form des μ -Calpains, ** markiert die p76 aktive Form des μ -Calpains, *** markiert eine spezifische p42 Form des μ -Calpains.

4.1.5 Die physiologische Bedeutung der erythrozytären PS-Exposition

Wie oben bereits beschrieben, stellt die Exposition von PS auf der Zelloberfläche ein wichtiges Signal für Makrophagen mit den entsprechenden Rezeptoren für PS dar. Apoptotische Zellen können auf diesem Weg aus der Blutzirkulation beseitigt werden [102, 103, 105, 236, 237].

Ergebnisse

Um die Bedeutung der PS-Exposition von roten Blutzellen im Hinblick auf die Entwicklung von Anämien zu bestimmen, wurde die Clearance PS-exponierender Erythrozyten aus der Blutbahn im Mausmodell genauer untersucht.

Hierzu wurde in Mäuseerythrozyten mit Hilfe des Calcium-Ionophors Ionomycin PS-Exposition ausgelöst (60%± 4% PS-positive Zellen) und die Zellen mittels CFSE (siehe Materialien und Methoden) markiert (annähernd 100% CFSE-positive Zellen). Die so behandelten Erythrozyten wurden gesunden Mäusen intravenös injiziert. Als Kontrolle dienten CFSE markierte, nicht mit Ionomycin behandelte Zellen.

Abbildung 25 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der durchflusszytometrisch bestimmten Häufigkeitsverteilung CFSE-positiver Zellen im Blut bzw. in der Milz 2 Stunden nach Injektion. Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, fand sich ein signifikanter Verlust an Ionomycin-behandelten Erythrozyten verglichen mit unbehandelten Zellen. In der Milz fand sich ein entsprechender signifikanter Anstieg CFSE-positiver Zellen bei der Ionomycin-behandelten Population.

Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass PS-exponierende Zellen innerhalb relativ kurzer Zeit aus der Blutbahn entfernt werden, um sich in der Milz wieder zu finden.

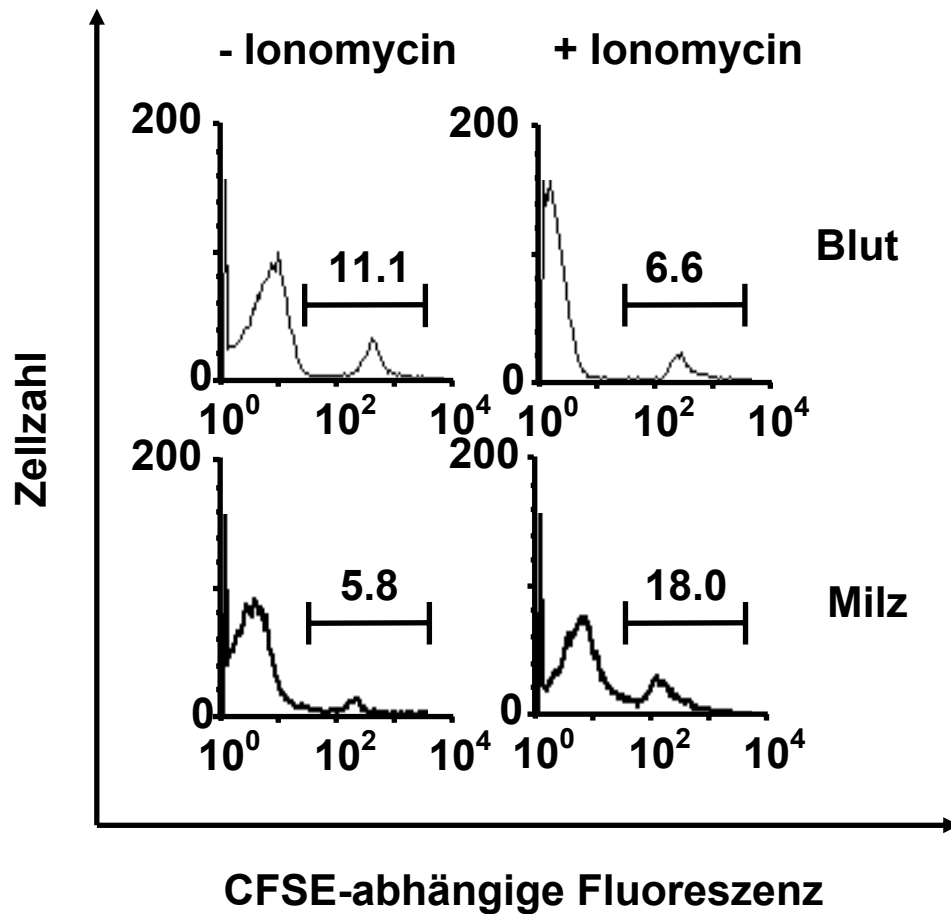


Abbildung 25: Verstärkte Clearance PS-positiver Erythrozyten *in vivo* (Histogramme).

Histogramme der Häufigkeitsverteilung CFSE-positiver Erythrozyten im peripheren Blut (obere Histogramme) und in der Milz (untere Histogramme). Links die Verteilung 2 Stunden nach Injektion CFSE-markierter ($50 \mu\text{M}$, 10 Minuten), Ionomycin-nativer Erythrozyten in gesunde C57BL/6 Mäuse. Rechts die Verteilung nach Injektion CFSE-markierter, Ionomycin-behandelter ($1 \mu\text{M}$, 1 Stunde) Erythrozyten. Der Anteil Annexin-positiver Zellen vor Injektion betrug bei den Kontrollerythrozyten $6 \pm 1\%$ ($n=8$), bei den Ionomycin-behandelten Erythrozyten $60 \pm 4\%$ ($n=8$).

Ergebnisse

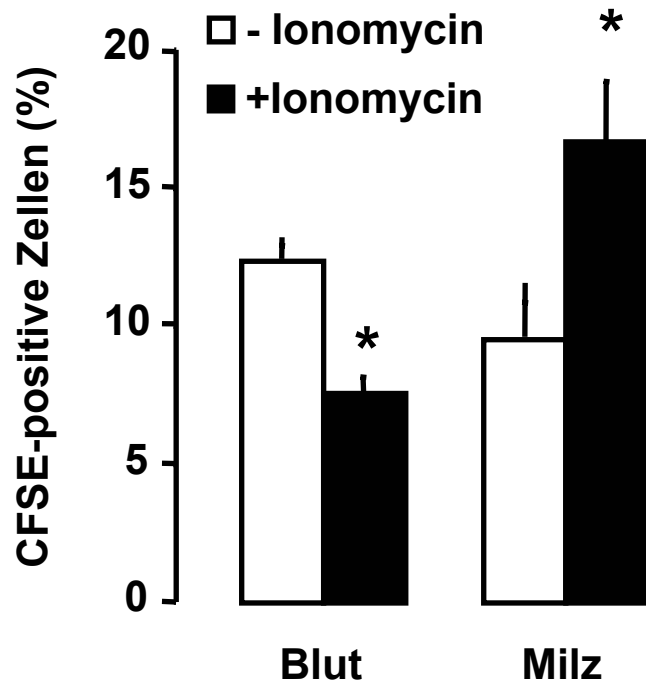


Abbildung 26: Verstärkte Clearance PS-positiver Erythrozyten *in vivo* (Quantitative Auswertung).

Anteil CFSE-positiver Erythrozyten an der Gesamtpopulation als Mittelwert \pm Standardfehler (n=8), im Blut (Balken links) und in der Milz (Balken rechts), 2 Stunden nach Injektion von CFSE-markierten (50 μ M, 10 Minuten) Ringer-behandelten Erythrozyten (offene Balken) und 2 Stunden nach Injektion von CFSE-markierten Ionomycin-behandelten (1 μ M, 1 Stunde) Erythrozyten (geschlossene Balken) in gesunde C57BL/6 Mäuse. * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Werten für Ringer-behandelte Kontrollzellen.

4.2 Aluminium und Erythrozytenzelltod

4.2.1 Phosphatidylserin-Exposition

Nach 24-stündiger Inkubation von Erythrozyten in aluminiumhaltiger Ringer-Lösung fand sich eine signifikante Zunahme der PS-Exposition als charakteristisches Zeichen des suizidalen Erythrozytenzelltodes. Abbildung 27 zeigt eine repräsentative Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität Annexin-gefärbter Zellen im FL1-Kanal. Nach Inkubation mit 30 μM Aluminium findet sich eine Zunahme von Zellen mit verstärkter Fluoreszenz als Maß für das vermehrte Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Dabei zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit von der Aluminiumkonzentration. Ab einer Aluminium-Konzentration von 10 μM ist dieser Zusammenhang signifikant (Abbildung 28). Bei 30 μM Aluminiumionen zeigt sich hierbei eine Verdoppelung der basalen Eryptose.

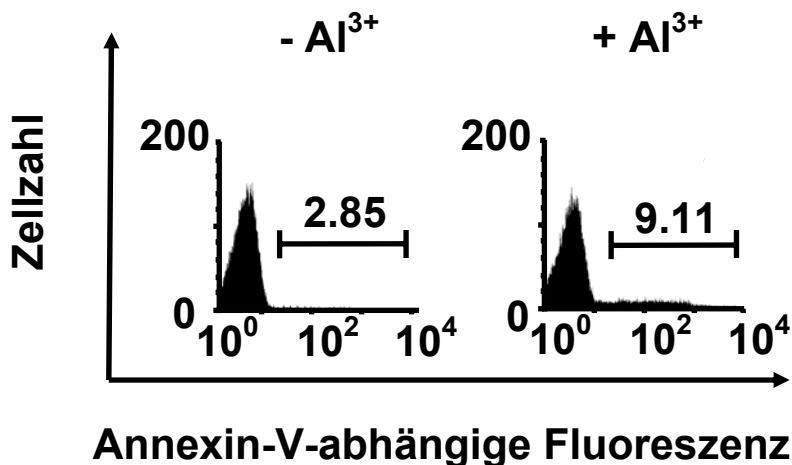


Abbildung 27: PS-Exposition auf der Erythrozytenoberfläche durch Aluminiumionen (Histogramme).

Typische Häufigkeitsverteilung der PS-abhängigen Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation von Erythrozyten in Anwesenheit von 30 μM Al³⁺-Ionen (rechts) und in Ringer (links). Zellen unter den Markern wurden in der quantitativen Auswertung als Annexin-positiv gewertet. Die Zahlen auf den Markern sind der prozentuale Anteil der Annexin-positiven Zellen an der Gesamtpopulation.

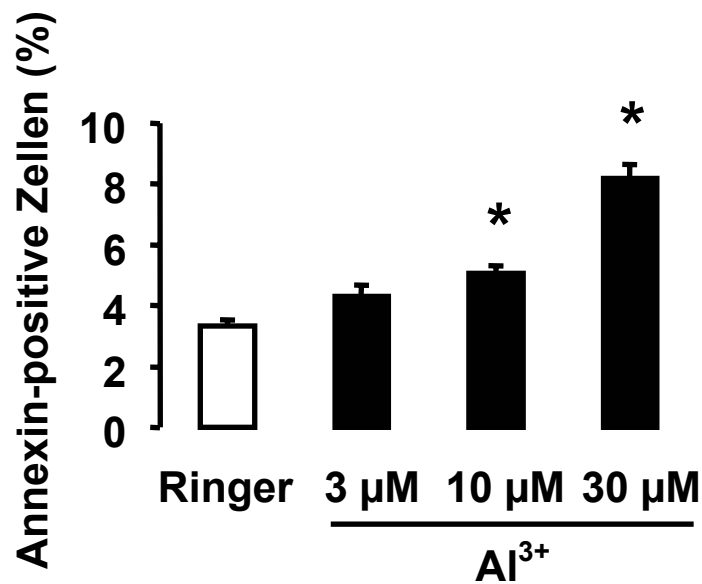


Abbildung 28: Dosis-Wirkungsbeziehung der PS-Exposition durch Aluminium (Quantitative Auswertung).

Mittelwerte \pm Standardfehler (n=8-28) des Anteils Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation in Prozent nach 24-stündiger Inkubation in Ringer (offener Balken) oder in Anwesenheit von Aluminium (geschlossene Balken). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber der Kontrolle (Ringer).

4.2.2 Zellschrumpfung

Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche wurde begleitet von einer Abnahme des Zellvolumens. Abbildung 29 zeigt die Zellverteilung als Funktion von Forward- und Side-Scatter. Bei einer Aluminiumkonzentration von 30 μ M findet sich eine Zunahme der Zellpopulation mit geringerem Signal im Forward-Scatter (FSC) als Maß für das Zellvolumen. Diese Aluminium-bedingte Schrumpfung der Erythrozyten wird bei Auswertung des geometrischen Mittels des FSC-Signals ab einer Aluminium Konzentration von 30 μ M statistisch signifikant (Abbildung 30).

Aluminium ist also offensichtlich in Lage, den suizidalen Erythrozytentod auszulösen. Nach Inkubation von Erythrozyten in Anwesenheit von Aluminiumionen zeigen diese die beiden Hauptmerkmale der „Erythrozytenapoptose“ – Zellschrumpfung und PS-Exposition.

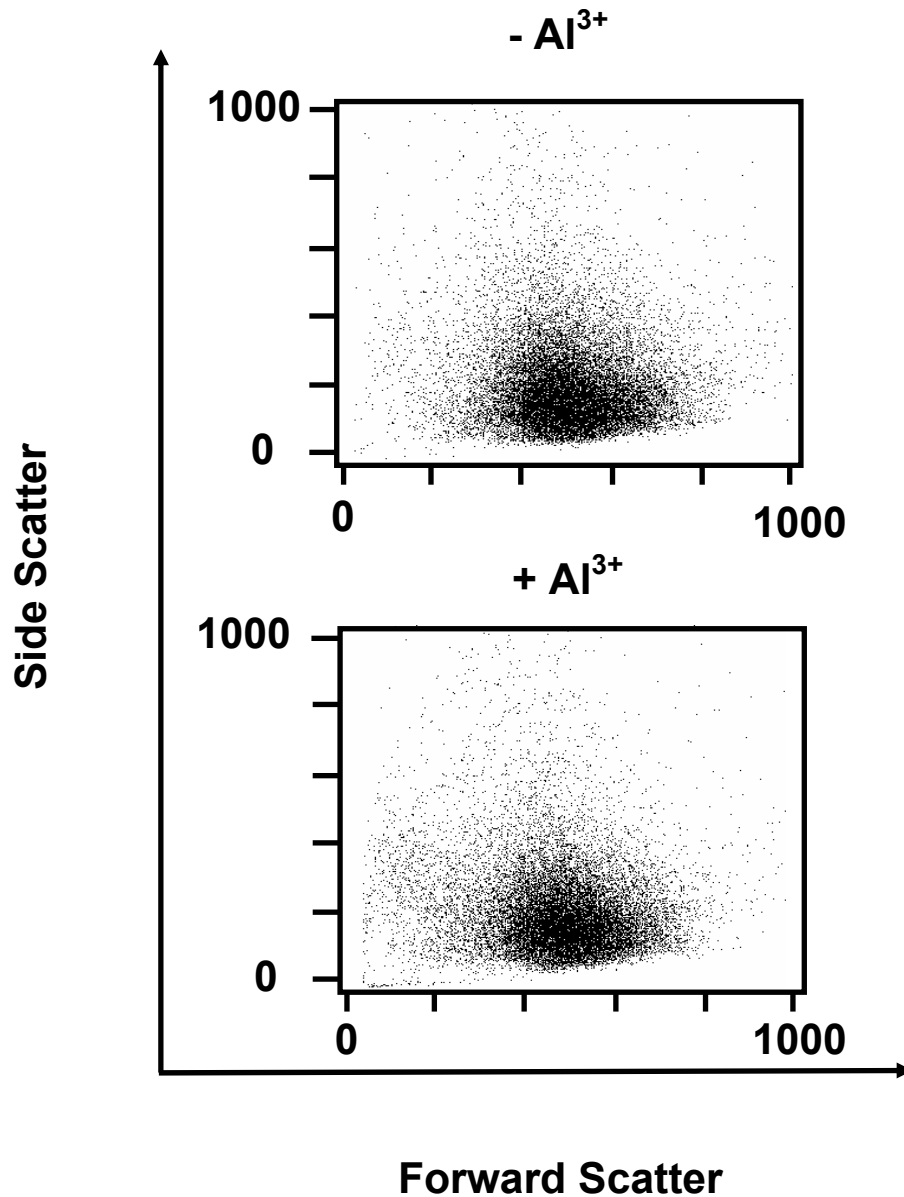


Abbildung 29: Zellschrumpfung durch Aluminium (Histogramme).

Zweidimensionale Darstellung der Zellverteilung als Funktion von Forward-Scatter (x-Achse) und Side-Scatter (y-Achse) in einem repräsentativen Experiment. Oben die Verteilung nach 24-stündiger Inkubation in Ringer, darunter nach Inkubation in Anwesenheit von 30 μM Aluminium-Ionen.

Ergebnisse

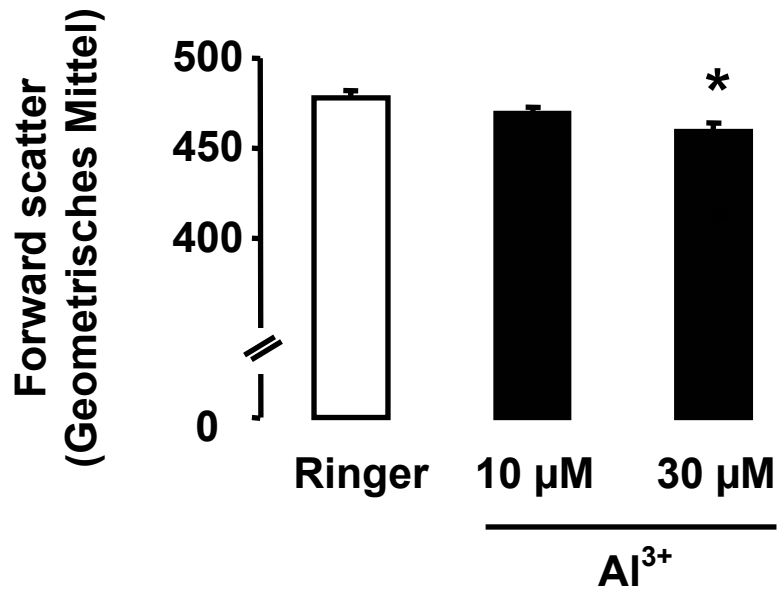


Abbildung 30: Zellschrumpfung durch Aluminium (Quantitative Auswertung).

Mittelwerte \pm Standardfehler (n=8-28) des Forward-Scatters (geometrisches Mittel der Häufigkeitsverteilung) in Abwesenheit von Aluminium (Ringer, offener Balken) und in Anwesenheit verschiedener Aluminium-Konzentrationen (geschlossene Balken) nach 24 Stunden. * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber der Kontrolle (Ringer).

4.2.3 Morphologische Zellveränderungen durch Aluminium

Abbildung 31 zeigt die morphologischen Veränderungen Aluminium-behandelter und mit Annexin-gefärbter Erythrozyten. Links oben die physiologische Diskusform eines nativen Erythrozyten, darunter ein geschrumpfter Erythrozyt nach Einwirkung von Aluminium. Schön zu sehen ist auch die Mikrovesikulation der Membran – ein typisches Zeichen des apoptotischen Zelltodes. Rechts dieselben Zellen im Fluoreszenzlicht. Der „apoptotische“ Erythrozyt fluoresziert aufgrund des gebundenen Annexin-V-Fluos auf der Oberfläche.

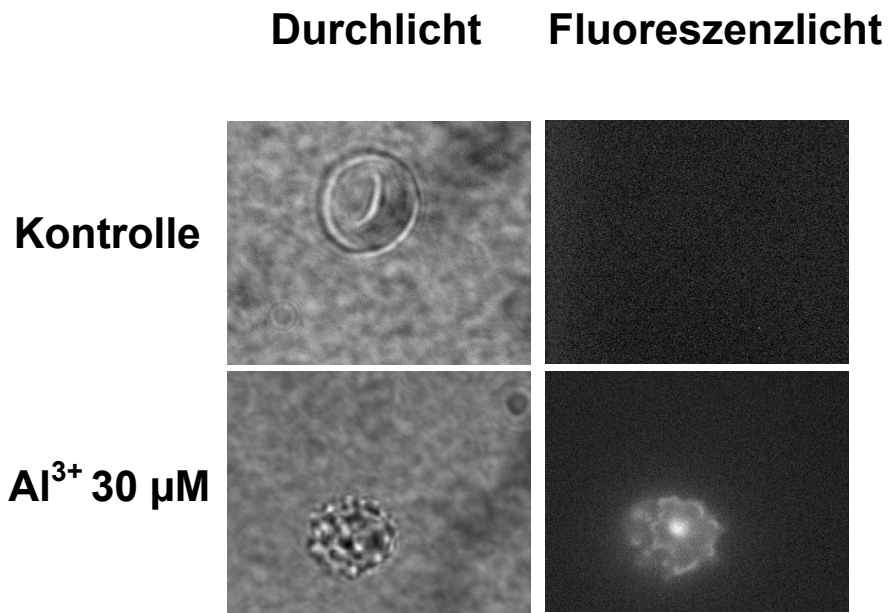


Abbildung 31: Morphologische Veränderungen durch Aluminium.

Darstellung eines Annexin-gefärbten Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringer (obere Bilder) und in Anwesenheit von 30 µM Aluminium (untere Bilder). Links ist die jeweilige Zelle im Durchlicht, rechts im Fluoreszenzlicht zu sehen.

4.2.4 Mechanismen des Erythrozytentodes durch Aluminium

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Aluminium „Erythrozytenapoptose“ triggern kann, wurden weitere Experimente durchgeführt, um die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Aluminium-behandelte Erythrozyten wurden auf die beiden bekannten Zelltodsignale Calcium und Ceramid untersucht. Da sich in der Literatur Hinweise für einen vermehrten oxidativen Stress von Zellen unter Einwirkung von Aluminium fanden [238-240] und oxidativer Stress als ein Auslöser des Erythrozytentodes bekannt ist [181], wurde der Redoxstatus der Erythrozyten durch die Messung des erythrozytären Glutathions bestimmt. Weiterhin wurde zur Bestimmung des Energiestatus die Menge an intrazellulärem ATP gemessen. Schließlich wurde Aluminium auf eine mögliche hämolytische Wirkung hin untersucht.

4.2.4.1 Calciumgehalt der Erythrozyten durch Aluminium

Da die PS-Exposition und insbesondere die Schrumpfung der Zellen durch Calcium verursacht werden können, wurde die zytosolische Calciumaktivität mittels F3AM-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

Bereits nach 3-stündiger Inkubation der Zellen mit Aluminium zeigte sich eine signifikante Zunahme der Calcium-abhängigen Fluoreszenz verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Abbildung 32 zeigt die Häufigkeitsverteilung des Calcium-abhängigen Signals. Bei einer Aluminiumkonzentration von 30 μM findet sich eine Subpopulation von Erythrozyten mit deutlich höherem Calciumgehalt. Abbildung 33 zeigt die quantitative Auswertung der geometrischen Häufigkeitsverteilung.

Das als Positivkontrolle dienende Ionomycin zeigt erwartungsgemäß ein starkes Calciumsignal und bestätigt die erfolgreiche Beladung der Zellen mit dem Farbstoff Fluo-3AM.

Die Erhöhung des zytosolischen Calciums stellt zumindest für Aluminiumkonzentrationen ab 30 μM eine Ursache der beobachteten PS-Exposition dar.

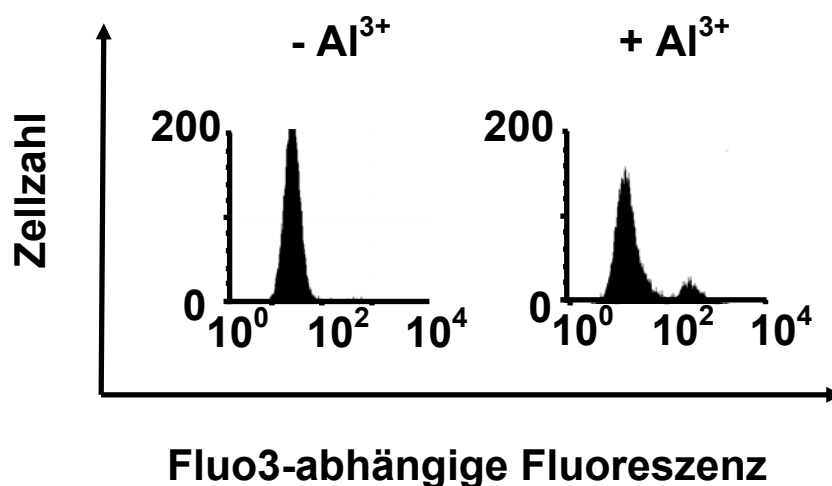


Abbildung 32: Erhöhung des zytosolischen Calciums durch Aluminium (Histogramme).

Typische Häufigkeitsverteilung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz Fluo-3-AM beladener Erythrozyten nach 6-stündiger Inkubation in Anwesenheit von 30 μM Al^{3+} -Ionen (rechts) und in Ringer (links).

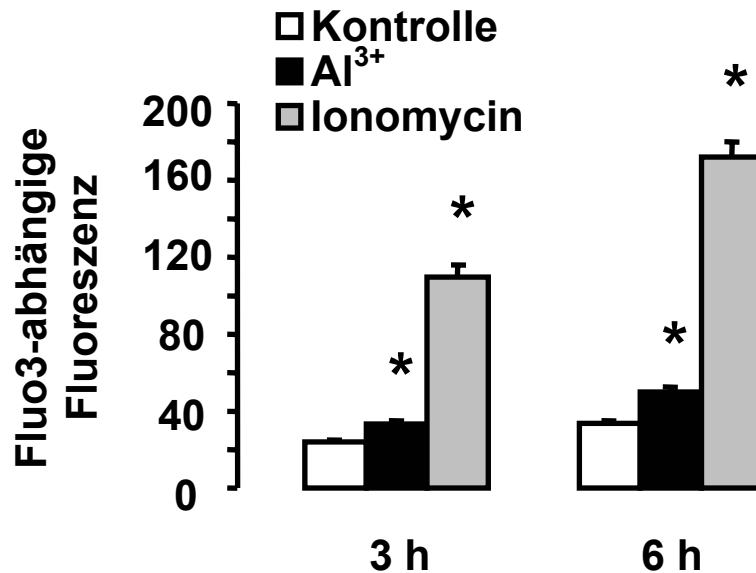


Abbildung 33: Erhöhung des zytosolischen Calciums durch Aluminium (Quantitative Auswertung).

Mittelwert \pm Standardfehler (n=10-12) der Erythrozyten mit vermehrter Fluo-3AM-Fluoreszenz Gezeigt wird das geometrische Mittel der Häufigkeitsverteilung im FL1-Kanal nach 3-stündiger (links) und 6-stündiger (rechts) Inkubation in Ringer (offene Balken), mit Aluminium 30 μ M (geschlossene Balken) und mit Ionomycin 1 μ M (graue Balken). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA) gegenüber den Werten in den Kontrollzellen (Ringer).

4.2.4.2 Abhängigkeit der PS-Exposition von Calcium

Um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen PS-Exposition und Calciumaufnahme der Zellen nachzuweisen, wurden Erythrozyten verschiedenen Konzentrationen von Aluminium in An- oder Abwesenheit von Calcium ausgesetzt und die PS-Exposition gemessen. Abbildung 34 zeigt die deutliche Abhängigkeit der PS-Exposition vom extrazellulären Calcium, die jedoch erst bei Aluminiumkonzentrationen von 100 μ M statistische Signifikanz erreicht.

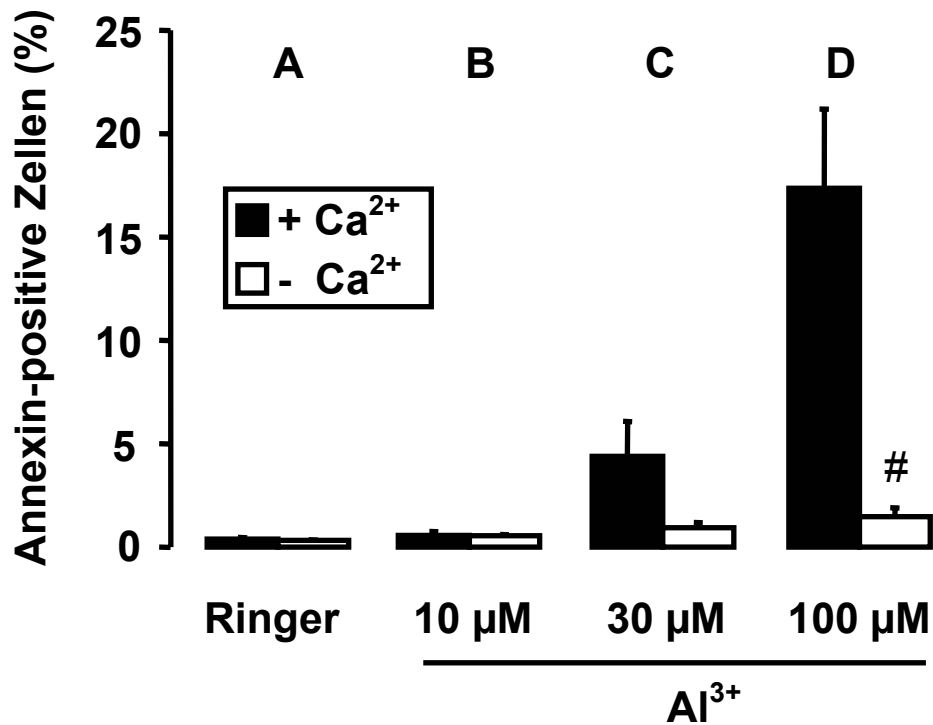


Abbildung 34: Abhängigkeit der PS-Exposition von Calcium.

Mittelwert ± Standardfehler (n=6) des Anteils Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation nach 24-stündiger Inkubation in Ringer mit 1 mM Calcium-Ionen (geschlossene Balken) und ohne Calcium-Ionen (offene Balken), in Abwesenheit von Aluminium (A), und mit 10 μM (B), 30 μM (C) oder 100 μM (D) Aluminium. # bedeutet einen signifikanten Unterschied (p<0,05, Student's t-Test) von der entsprechenden Ca²⁺-haltigen Kontrolle.

4.2.4.3 Keine Ceramidbildung der Erythrozyten durch Aluminium

Der zweite wichtige Signalstoff der Erythrozytenapoptose, das Ceramid, wurde mittels der oben beschriebenen Antikörper-basierten Methode untersucht. Wie die Abbildung 35 und 36 zeigen, konnte keine Bildung von Ceramid selbst für Aluminium-Konzentrationen von 100 μM nachgewiesen werden. Spingomyelinase-behandelte Erythrozyten (Positivkontrolle) hingegen zeigten eine deutliche Zunahme des Ceramid-abhängigen Signals und bestätigten die erfolgreiche Färbung.

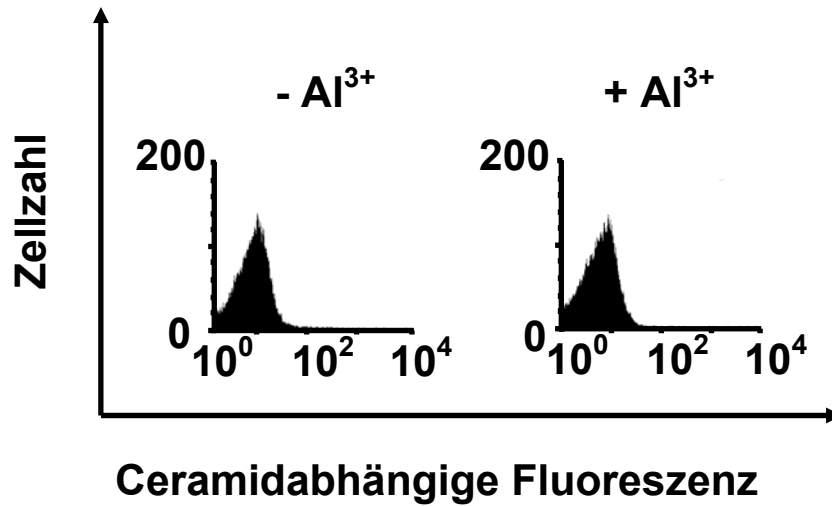


Abbildung 35: Keine Bildung von Ceramid durch Aluminium (Histogramme).

Typische Häufigkeitsverteilung der Erythrozyten nach Markierung mit FITC-Antikörper gekoppeltem Anti-Ceramid Antikörper im FL1-Kanal. Links nach 24-stündiger Inkubation in Abwesenheit von Al³⁺-Ionen, rechts nach Behandlung der Erythrozyten mit 30 μ M Aluminium-Ionen.

Ergebnisse

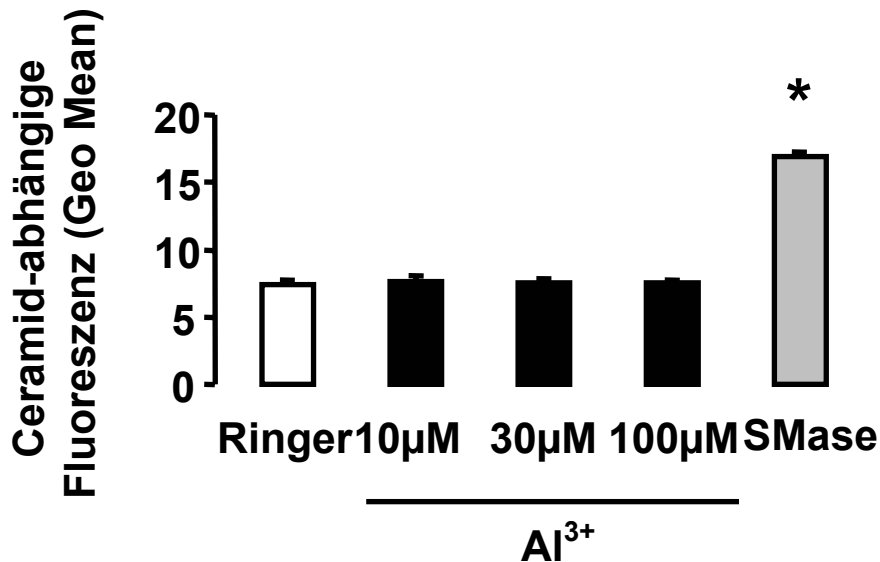


Abbildung 36: : Effekt von Aluminium auf den Ceramidlevel.

Mittlerer Prozentsatz \pm Standardfehler ($n=4$) der Erythrozyten mit vermehrter Fluoreszenz des Anti-Ceramid FITC-gekoppelten Antikörpers nach 24-stündiger Inkubation in Ringer (offener Balken) und nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Aluminium-Konzentrationen (geschlossene Balken) sowie nach 5-minütiger Inkubation mit 1U/ml bakterieller Sphingomyelinase (grauer Balken). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA mit Dunnett's Test als post hoc-Test) gegenüber dem Wert der Ringer-Kontrolle (offener Balken).

4.2.4.4 ATP-Abfall durch Aluminium

Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob Aluminium-Ionen den Energie-Status von Erythrozyten beeinflussen. Tatsächlich fand sich bereits nach 24 Stunden ein signifikanter Verlust an intrazellulärem ATP für Aluminium-Konzentrationen ab 10 μM . Der ATP-Abfall scheint hierbei Konzentrations-abhängig zu sein (Abbildung 37). Verglichen mit den in Glukose-freier Lösung inkubierten Erythrozyten ist die Energiedepletion allerdings moderat.

Ergebnisse

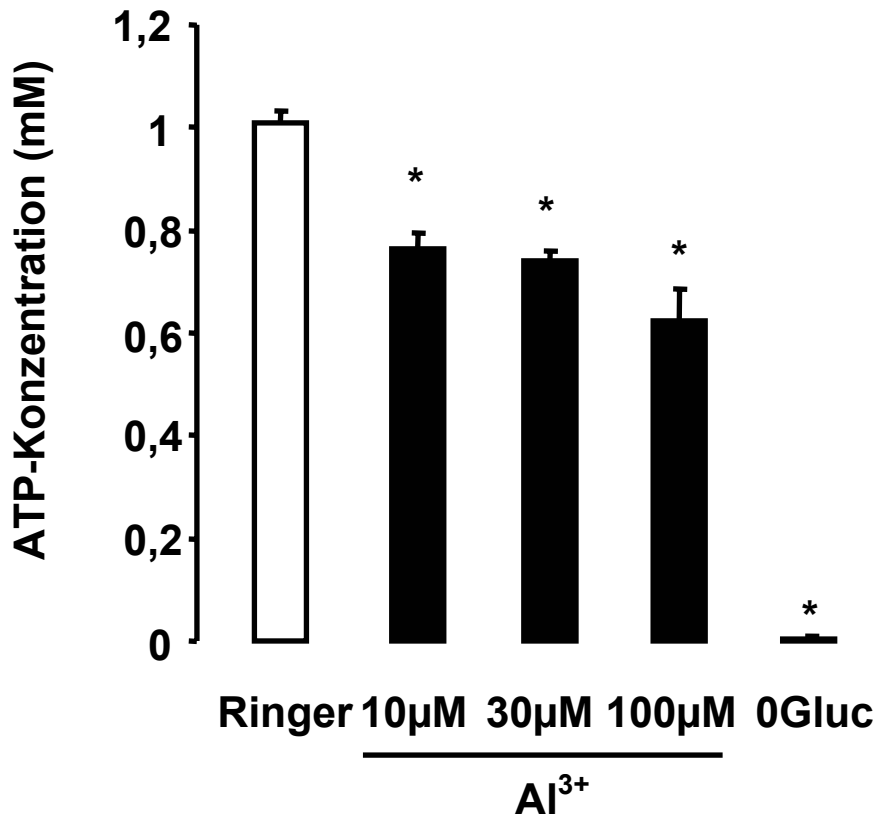


Abbildung 37: ATP-Depletion durch Aluminium.

Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) der intrazellulären ATP-Konzentration in Abwesenheit von Aluminium (Ringer, offener Balken) und in Anwesenheit von 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M Aluminium³⁺ (geschlossene Balken) sowie in Glukose-freiem Ringer (0Gluc). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA mit Dunnett's Test als post hoc-Test) gegenüber dem Wert der Ringer-Kontrolle (offener Balken).

4.2.4.5 Aluminium in Kombination mit Glukosemangel

Bei der Kombination aus Glukose-Mangel und Aluminium zeigte sich zwar ein signifikanter Einfluss des Glukose-Mangels auf die PS-Exposition, Aluminium (10 μ M) zeigte jedoch keinen weiteren signifikanten Anstieg Annexin-positiver Zellen (Abbildung 38).

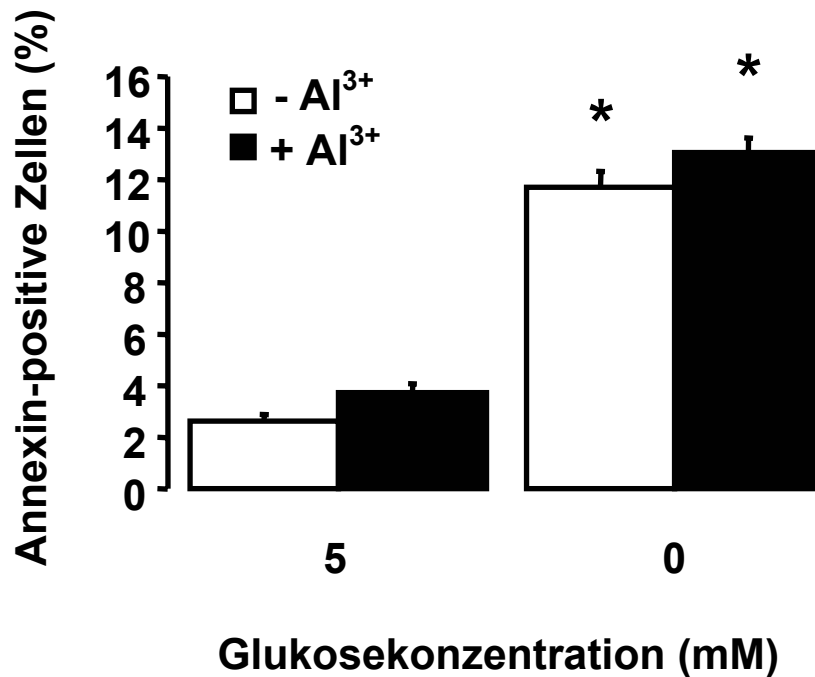


Abbildung 38: PS-Exposition unter Bedingungen des Glukose-Mangels.

Annexin-positive Zellen (%) nach 24-stündiger Inkubation in Ringer (Balken links) und Glukose-freiem Ringer (Balken rechts), in Abwesenheit von Aluminium (offene Balken) und Anwesenheit von 10 μM Aluminium (geschlossene Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=7$). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, ANOVA mit Turkey's Test als post hoc-Test) gegenüber den entsprechenden Werten in glucosehaltigem Ringer.

4.2.4.6 Erythrozytärer Redoxstatus unter Aluminium

Es fand sich selbst für Aluminium-Konzentrationen bis 100 μM nach 24 Stunden kein Einfluss auf den Redoxstatus. Die als Positiv-Kontrolle verwendeten Glukose-depletierten Zellen zeigten dagegen eine deutliche Abnahme der intrazellulären Glutathion-Konzentration (Abbildung 39).

Ergebnisse

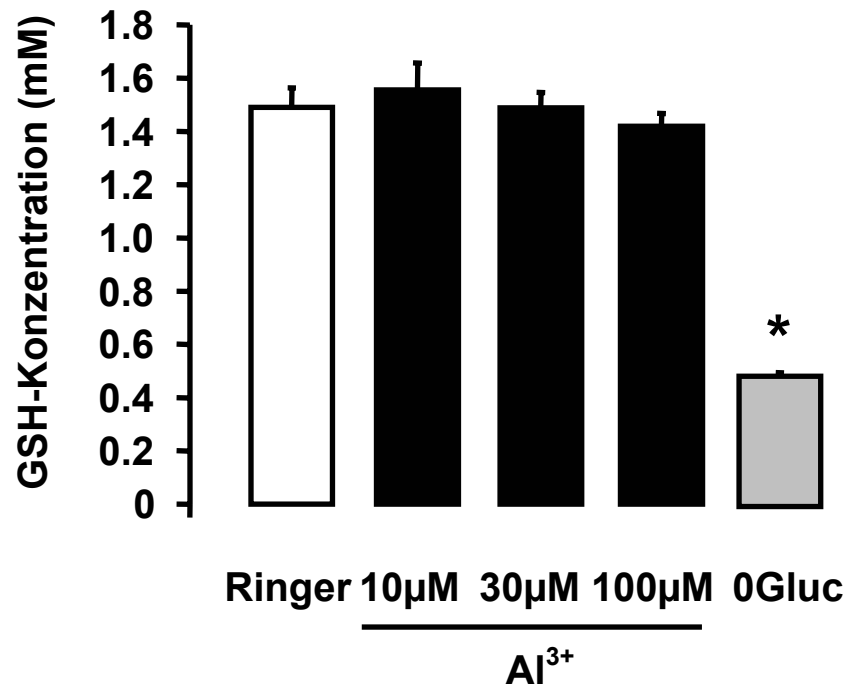


Abbildung 39: Intraerythrozytäres Glutathion unter Aluminium.

Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) der intrazellulären Glutathion-Konzentration in Abwesenheit von Aluminium (Ringer, offener Balken) und in Anwesenheit von 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M Aluminium³⁺ (geschlossene Balken), sowie in Glukose-freiem Ringer (grauer Balken, 0Gluc). * bedeutet einen signifikanten Unterschied (p < 0,05, ANOVA mit Dunnett's Test als post hoc-Test) vom Wert der Ringer-Kontrolle (offener Balken).

4.2.5 Hämolyse durch Aluminium

Neben den für den programmierten Erythrozytenzelltod typischen Phänomenen fand sich für Aluminium ein weiterer Mechanismus der Erythrozytenschädigung. Die photometrische Messung des extrazellulären Hämoglobins zeigt eine hämolytische Wirkung des Aluminiums, die für Aluminium-Konzentrationen von 100 μ M statistisch signifikant wird (Abbildung 40). Insbesondere höhere Aluminiumkonzentrationen scheinen also die Integrität der Zellmembran zu stören.

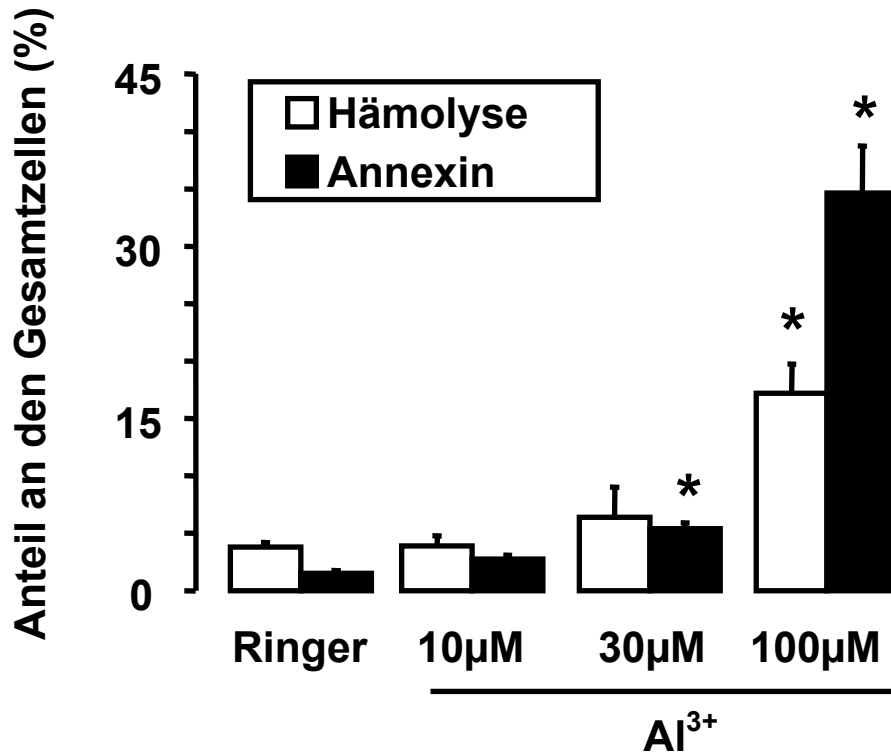


Abbildung 40: Hämolyse durch Aluminium.

Mittelwerte ± Standardfehler (n=6) der Freisetzung von Hämoglobin in % des gesamten Hämoglobins (offene Balken) und der Annexin-positiven Zellen in % der Gesamtpopulation (schwarze Balken) in Abwesenheit von Aluminium (Ringer) und in Anwesenheit von 10 μM, 30 μM, 100 μM Al³⁺. * bedeutet einen signifikanten Unterschied (p < 0,05, ANOVA mit Dunnett's Test als post hoc-Test) gegenüber dem korrespondierenden Wert der Ringer-Kontrolle (Ringer).

5 Diskussion

5.1 Eryptose

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Form des Erythrozytenzelltodes (Eryptose) findet sich bei einer Reihe von Erythrozytopathien [185] sowie unter Einwirkung diverser Medikamente [189, 190], bei Bleiintoxikation [187] und bei der Eisenmangelanämie [241]. Ein wesentliches Charakteristikum dieser so genannten Eryptose ist das Erscheinen des Phospholids Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche der äußeren Membran [117, 151, 152, 179, 242]. Erythrozyten, die PS präsentieren, werden von Makrophagen, die mit den entsprechenden Rezeptoren ausgestattet sind [105, 237, 243], erkannt, phagozytiert und somit aus dem Blutstrom eliminiert [236, 241].

Die Eryptose weist Unterschiede zur bekannten Erythrozytenalterung [67, 244-247] auf und scheint einen eigenständigen pathophysiologischen Mechanismus bei der Entwicklung bestimmter Formen der Anämie darzustellen. Darüber hinaus könnte es sich bei diesem Phänomen um einen physiologischen Schutzmechanismus ähnlich der Apoptose kernhaltiger Zellen handeln.

5.2 „Erythrozytenapoptose“ durch Taxane

Die oben dargestellten Ergebnisse beschreiben eine bisher unbekannte Wirkung der Taxane auf reife Erythrozyten und untersuchen die Mechanismen dieser Wirkung. Taxane sind in der Lage, eine spezielle Form des Erythrozyten-Zelltodes auszulösen, der einige wesentliche Gemeinsamkeiten und einige Unterschiede zur Apoptose kernhaltiger Zellen aufweist [152].

Nach Taxan-Exposition zeigen Erythrozyten vermehrt Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Außerdem schrumpfen die Zellen. Beides sind typische

Diskussion

Merkmale des programmierten Erythrozytenzelltodes, sie sind aber zugleich typisch für apoptotische Vorgänge in vielen anderen Zelltypen. Interessanterweise scheinen diese Effekte in roten Blutzellen spezifisch für Chemotherapeutika zu sein, die mit den Mikrotubuli wechselwirken. Für die Zytostatika Carboplatin und Doxorubicin konnten diese Wirkungen nicht nachgewiesen werden. Außerdem zeigte Colchizin, das bekanntlich Mikrotubuli destabilisiert, einen protektiven Effekt auf die basale Apoptoserate der Erythrozyten nach 72-stündiger Inkubation in Ringer. Dies kann als ein weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich bei der Wirkung der Taxane um eine Mikrotubuli vermittelte Wirkung handeln könnte.

Bei der „Erythrozytenapoptose“ spielen Caspasen nur in ganz bestimmten Fällen eine Rolle und zwar beim oxidativen Stress und beim Todesrezeptor-induzierten Erythrozytentod [182, 248]. Im Unterschied zur Apoptose kernhaltiger Zellen durch Taxol, bei der Caspasen einen wesentlichen Faktor darstellen [52-54], waren diese bei der Eryptose durch Taxane nicht beteiligt.

Die entscheidenden Mediatoren der Taxanwirkung in Erythrozyten sind eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration und die Bildung von Ceramid durch die erythrozyteneigene Sphingomyelinase [180, 221].

Ersteres führt dabei über Aktivierung von calcium-sensitiven Kalium-Kanälen [249, 250] zum Verlust von Kalium und über die daraus folgende Hyperpolarisation der Zellmembran zum Ausstrom von Chloridionen [233, 251]. Dieser Verlust an Kaliumchlorid führt zum osmotisch bedingten Wasserausstrom und damit zum Schrumpfen der Erythrozyten. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die calciumbedingte Zellschrumpfung durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration in den Bereich intrazellulärer Werte sowie durch den Einsatz der Kaliumkanal-Blocker Charybdotoxin und Clotrimazol hemmen lassen [251-253]. Ähnlich wie in Erythrozyten sind Zellschrumpfung und Kaliumverlust auch in anderen Zelltypen bekannte Auslöser des apoptotischen Zelltodes [185, 232, 254-259].

Auch der zweite gezeigte Mechanismus des Erythrozytentodes durch Paclitaxel, die Bildung von Ceramid, ist ein bekannter Auslöser der Apoptose in

kernhaltigen Zellen [211]. Für Tumorzellen konnte die Bildung von Ceramid auch durch Paclitaxel gezeigt werden [260, 261].

Die in dieser Arbeit gezeigten Wirkungen der Taxane auf Erythrozyten korrespondieren also in einigen Aspekten mit den bereits bekannten Effekten dieser Substanzklasse auf kernhaltige Zellen.

Während die Aktivierung von Caspasen durch Taxane in kernhaltigen Zellen einen wesentlichen Wirkmechanismus darstellt [54, 234, 235], wurde sie in Erythrozyten trotz der reichlich enthaltenen Procaspase 3 [151] nur für den Erythrozytentod durch oxidativen Stress [182] und für die FAS-Ligand induzierte „Erythrozytenapoptose“ [248] gezeigt.

5.2.1 Taxane und Anämie

Unter Behandlung mit Taxol entwickelte sich eine Anämie (Hb < 11 g/dl) in Phase II Studien bei insgesamt 90% aller Patienten. Eine schwere Anämie mit Hämoglobinwerten unter 8 g/dl fand sich bei 24%. Die Anämie erwies sich als dosisabhängig [55, 57, 59].

Im Prinzip kann eine Anämie durch eine verminderte Bildung von Erythrozyten oder durch einen vermehrten Verlust bedingt sein. Ersteres kann für die Wirkung der exemplarisch untersuchten Zytostatika Doxorubicin und Carboplatin angenommen werden. Diese zeigen keinen erythrozytenschädigenden Effekt *in vitro*, und erzeugen vermutlich über ihre myelosuppressive Wirkung eine Anämie. Im Unterschied dazu ist es wahrscheinlich, dass die beschriebenen Wirkungen der Taxane auf Erythrozyten zur Entstehung dieser Anämie beitragen. Darauf deutet hin, dass auch *in vivo* bei Patienten nach Taxolgabe eine vermehrte PS-Exposition der Erythrozyten gefunden wurde. Die tendenziell ansteigenden Retikulozyten nach Infusion von Taxol deuten ebenfalls auf eine erhöhte Clearance der Erythrozyten und nicht auf eine verminderte Hämatopoese hin. Der Zusammenhang zwischen Clearance und PS-Exposition *in vivo* konnte exemplarisch im Mausmodell durch die vermehrte Clearance Ionomycin-behandelter, CFSE-markierter Erythrozyten gezeigt werden.

Diskussion

Die Mechanismen dieser Entfernung „apoptotischer“ Erythrozyten aus der Zirkulation liegen dabei nahe. Makrophagen besitzen Rezeptoren für Phosphatidylserin [105, 237] und sind in der Lage, PS-exponierende Zellen zu erkennen und abzubauen [236]. Das gezeigte Erscheinen PS-positiver Erythrozyten in der Milz unterstützt dieses Szenario.

Dass neben der PS-Exposition auch andere Mechanismen der Clearance eine Rolle spielen könnten, z.B. das Bande-3- und Komplement-vermittelte Entfernen von Erythrozyten aus der Zirkulation [262, 263], kann anhand der beschriebenen Ergebnisse natürlich nicht ausgeschlossen werden.

Zur Frage, ob der *in vivo* beobachtete Anstieg PS-exponierender Erythrozyten um ca. 50 % für den ausgeprägten Abfall des Hämoglobins nach Gabe von Taxanen verantwortlich sein kann, ist zu bedenken, dass der im Blut beobachtete Unterschied PS-positiver Erythrozyten vor und nach Paclitaxelinfusion eine unbekannte Menge bereits aus der Zirkulation entfernter roter Blutzellen nicht abbildet. Dies gilt insbesondere deshalb, weil es sich bei der Clearance PS-positiver Erythrozyten, wie im Mäusemodell gezeigt, um einen Prozess zu handeln scheint, der maximal im zeitlichen Rahmen von Minuten bis maximal 2 Stunden abläuft. Eine vor kurzem publizierte Arbeit unserer Gruppe konnte außerdem zeigen, dass bereits ein Anstieg der basalen PS-Exposition von Eisenmangel-Erythrozyten um 35% auf insgesamt 3,7% zu einer signifikant geringeren Überlebenszeit dieser Zellen in gesunden Mäusen führte [241].

Ein Zusammenhang der Eryptose mit bestimmten Formen der Anämie erscheint also wahrscheinlich.

Die verwendeten Paclitaxelkonzentrationen lagen bei den durchgeführten Experimenten im Bereich therapeutisch erreichter Konzentrationen.

Diese liegen bei einer Dosis von 250 mg/m² über 3 Stunden bei knapp 10 µmol/l [62].

5.3 „Erythrozytenapoptose“ durch Aluminium

Die dargestellten Ergebnisse beschreiben eine bisher unbekannte Wirkung von Aluminium-Ionen auf Erythrozyten. Die unter Einwirkung von Al^{3+} -Ionen beobachteten, für die Erythrozytenapoptose typischen Phänomene deuten auf eine mögliche Beteiligung der Erythrozytenapoptose bei der unter Aluminiumintoxikation beobachteten Anämie hin.

5.3.1 Mechanismen des Erythrozytenzelltodes durch Aluminium

Nach Inkubation in Anwesenheit von Aluminium zeigen Erythrozyten vermehrt PS auf der Oberfläche. Um die Ursache dieser PS-Exposition genauer zu untersuchen, wurden eine Reihe weiterer Experimente durchgeführt.

Ab einer Al^{3+} -Konzentration von $30 \mu\text{M}$ findet sich eine erhöhte Konzentration von Calcium in den Erythrozyten. Aufgrund des oben beschriebenen Mechanismus führt Ca^{2+} über den Verlust von Kalium schließlich zum Schrumpfen der Zellen. Erst ab einer Al^{3+} -Konzentration von $30 \mu\text{M}$ konnte diese Schrumpfung der Zellen auch tatsächlich beobachtet werden.

Dass der Einstrom von Calcium ursächlich an der beobachteten PS-Exposition beteiligt ist, konnte durch Inkubation der Zellen in Calcium-freier, aluminiumhaltiger Lösung gezeigt werden.

Neben dem Second-Messenger Calcium wurde die Bildung von Ceramid untersucht, die unter einer Reihe von Bedingungen ein wesentliches Signal des Erythrozytentodes darstellt. Im Gegensatz zum Zelltod unter hyperosmolaren Bedingungen [180] fand sich allerdings keine Bildung von Ceramid durch Aluminium.

Bei der Untersuchung des erythrozytären Energiestatus fand sich ein Abfall des ATP. Es konnte gezeigt werden [264], dass der Abfall an intrazellulärem ATP unter Bedingungen des Glukose-Mangels und nach Blockade der Glykolyse zeitlich der PS-Exposition vorausgeht. Der gefundene Abfall an intrazellulärem ATP könnte ein frühes Merkmal des nachfolgenden Zelltodes darstellen. Theoretisch könnte ein Mangel an Energieäquivalenten sekundär zu

einem Abfall der Reduktionsäquivalente (GSH-Reduktase und ATP, Pentose-Phosphat-Weg) führen. Oxidativer Stress wiederum wurde als ein Auslöser der Erythrozytenapoptose entdeckt, der zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums über Aktivierung calcium-permeabler Kationen-Kanäle führt [179]. Tatsächlich finden sich in der Literatur Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress von Zellen durch Aluminium [238-240]. Bei der Untersuchung des erythrozytären Glutathion-Gehalts unter Aluminium fanden sich allerdings kein Abfall der Glutathion-Konzentration, zumindest nicht nach 24 Stunden. Im Gegensatz dazu fielen die GSH-Level bei Glukose-Mangel nach 24 Stunden deutlich ab.

Im Unterschied zu anderen Substanzen, die in der Lage sind, „Erythrozytenapoptose“ auszulösen [186, 187, 189, 190, 265], fand sich bei Aluminium eine signifikante hämolytische Komponente. Bei sehr langer Inkubationszeit oder bei hohen Konzentrationen des „Apoptose“-auslösenden Agens findet sich zwar meist auch eine gewisse Hämolyse, im Fall des Aluminiums tritt diese aber deutlich früher auf.

5.3.2 Aluminium und Anämie

Die Anämie ist Teil der klassischen Trias, die unter Aluminiumintoxikation zu beobachten ist. Neben der Anämie finden sich typischerweise eine Enzephalopathie sowie eine Osteopathie mit Osteoporose.

Die für die *in vitro* Experimente verwendeten Aluminium-Konzentrationen lagen im Bereich bzw. leicht über den bei einer Intoxikation beobachteten Konzentration. Die beschriebenen Mechanismen könnten also auch *in vivo* eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Anämie spielen. Dennoch lassen sich die *in vitro* gemachten Beobachtungen natürlich nicht ohne weiteres übertragen.

So sind rote Blutkörperchen in der Zirkulation dem Einfluss von Aluminium-Ionen potentiell über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten ausgesetzt. Hier entfalten möglicherweise auch geringere Aluminium-Konzentrationen eine Wirkung. Längere Zeiträume konnten *in vitro* aber nicht untersucht werden, da

die Inkubation der Erythrozyten in Ringer bereits nach wenigen Tagen zu einer erheblichen PS-Exposition der Zellen führt.

Die Zusammenhänge, die über die Entfernung PS-exponierender Erythrozyten aus dem Blut schließlich zur Entwicklung einer Anämie führen könnten, wurden oben am Beispiel der Taxane diskutiert und können in ähnlicher Form auch für Aluminium angenommen werden.

5.4 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Taxanen und Aluminium

Im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer Substanzen sind sowohl Taxane als auch Aluminium in der Lage, die beschriebene Form des erythrozytären Zelltodes auszulösen. Dabei zeigen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Wirkmechanismus.

Beide Substanzen führen schließlich sowohl zur Exposition von Phosphatidylserin als auch zum Schrumpfen der Zellen. Letztere ist dabei in beiden Fällen durch erhöhte zytosolische Calcium-Konzentrationen bedingt.

Paclitaxel löst im Unterschied zu Aluminium die Bildung von Ceramid in Erythrozyten aus. Ebenso wie Aluminium fand sich auch bei Paclitaxel kein Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration von reduziertem Glutathion.

Ein deutlicher Unterschied zwischen Paclitaxel und Aluminium zeigt sich im Hinblick auf die Hämolyse: Während bei Paclitaxel in den verwendeten Konzentrationen und innerhalb der untersuchten Inkubationszeiten keine vermehrte Hämolyse gefunden wurde (Daten nicht dargestellt), zeigte sich für Aluminium eine vermehrte Hämolyse. Worauf die hämolytische Komponente des Aluminiums zurückzuführen ist, bleibt unklar.

5.5 Die physiologische Bedeutung der „Erythrozytenapoptose“

An den Beispielen Paclitaxel und Aluminium und an ihren unterschiedlichen Wirkmechanismen zeigt sich erneut, dass das erythrozytäre Zelltodprogramm einen differenzierten und auf mehreren unabhängigen Wegen operierenden

Mechanismus darstellt. Die Redundanz der PS-Exposition auslösenden Wege legt die Interpretation nahe, diese Form des Zelltodes als mehrfach „abgesichert“ zu betrachten. Im Hinblick auf die für den Organismus negativen Auswirkungen eines unkontrollierten, d.h. im Falle der roten Blutkörperchen eines hämolytischen Zelltodes, wie er beispielsweise beim Hämolytisch-Urämischen-Syndrom beobachtet wird, könnte sich das erythrozytäre „Apoptoseprogramm“ als ein empfindlicher Mechanismus entwickelt haben, um geschädigte rote Blutzellen aus der Blutbahn zu entfernen, bevor es zur hämolytischen Dekompensation kommt.

Die Eryptose kann in dieser Hinsicht als ein eigenständiger Mechanismus betrachtet werden, der sich von der Erythrozytenalterung unterscheidet, die u.a. auf den schleichenden Veränderungen des mengenmäßig häufigsten erythrozytären Membranproteins, der Bande 3 (Anionenaustauscher, AE1), zu beruhen scheint und wahrscheinlich für die begrenzte Erythrozytenlebenszeit unter normalen Bedingungen verantwortlich ist [262, 266-268] .

Im Falle des Aluminiums finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass es sich bei der durch Aluminiumintoxikation bedingten Anämie nicht um eine generative, sondern um eine Anämie durch vermehrten Verbrauch roter Blutkörperchen, möglicherweise auch um eine hämolytische Anämie handelt [66]. Die in dieser Arbeit beschriebene Hämolyse könnte also im Gegensatz zur Erythrozytenapoptose durch Blei auf ein gewisses Versagen des Apoptoseprogramms bei höheren Aluminium-Konzentrationen hindeuten. Eine ähnliche Interpretation ließe sich für das Hämolytisch-Urämische-Syndrom anführen, für das auch die typischen Phänomene der Erythrozytenapoptose gezeigt wurden [269].

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit charakterisiert zwei bislang unbekannte Auslöser der Eryptose. Diese Form des erythrozytären Zelltodes zeichnet sich aus durch die apoptosetypischen Merkmale der Zellschrumpfung aufgrund des Verlustes von Kalium sowie durch die Exposition des Membranlipids Phosphatidylserin (PS) an der Außenseite der Plasmamembran. Erythrozyten, die PS exponieren, werden aus der Blutzirkulation entfernt. Vermehrte Eryptose stellt somit einen möglichen pathogenetischen Mechanismus bei der Entstehung von Anämien dar. Diese Arbeit beschreibt exemplarisch die Wirkung des Zytostatikums Paclitaxel sowie des Metalls Aluminium in seiner ionisierten Form auf die Eryptose. Von beiden Substanzen war bereits bekannt, dass sie in Lage sind, eine Anämie zu verursachen.

Wichtige Mediatoren des Erythrozytenzellendes sind der Einstrom von Calcium sowie die Bildung von Ceramid. Weitere Auslöser sind eine Schwächung der antioxidativen Abwehr und ein Mangel an ATP.

Für die beiden untersuchten Induktoren der Eryptose konnte eine Erhöhung des zytosolischen Calciums nachgewiesen werden. Für Paclitaxel konnte auch eine vermehrte Bildung von Ceramid gezeigt werden. Im Gegensatz zu Paclitaxel zeigte sich für Aluminiumionen keine Zunahme an Ceramid, dafür aber eine Abnahme des intrazellulären ATP. Aluminium führte weiterhin zu einer Freisetzung von Hämoglobin. Beide Substanzen scheinen keinen wesentlichen Einfluss auf den erythrozytären Redoxstatus zu haben. Die gezeigten Veränderungen fanden sich im Bereich therapeutischer bzw. toxikologisch relevanter Konzentrationen. Für Paclitaxel konnte auch bei der Anwendung am Menschen das Auslösen der Eryptose gezeigt werden. Außerdem wurde im Tiermodell eine vermehrte Clearance eryptotischer Erythrozyten gefunden, so dass eine ursächliche Beteiligung der Eryptose bei der durch Aluminium bzw. Paclitaxel verursachten Anämie plausibel erscheint.

7 Danksagung

Worte sind nur ein unzulängliches Mittel, großen Dank auszudrücken. Von ganzem Herzen danke ich als erstes meinen Eltern, denen ich letztlich alles verdanke. Sie gaben mir nicht nur alles, was ich benötigte, sondern eröffneten mir insbesondere die Freiheit und die schwere Verantwortung, jeden Weg zu gehen, für den ich mich entscheiden wollte. Sie unterstützten mich in allen Entscheidungen, die ich getroffen habe. Ich danke meiner Mutter für die unbedingte Liebe, die zweifellos das Fundament meines Lebens darstellt. Ich danke meinem Vater für das unermüdliche und tiefsinnige Beantworten aller meiner Fragen. Er nährte eine Faszination und einen Wissensdurst und eröffnete mir dadurch eigentlich erst die Welt.

Dann danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Florian Lang dafür, dass er mir nicht nur die Gelegenheit bot, an erfolgreichen Projekten mitzuarbeiten, sondern der mir darüber hinaus auch noch die seltene Entfaltungsmöglichkeit bot, eigene Gedanken zu verwirklichen. Er kümmerte sich persönlich um jede Person und um jedes Projekt unserer Gruppe. Und er stand zu jeder Zeit nicht nur mit Rat und Tat zur Verfügung, sondern vermittelte darüber hinaus eine leidenschaftliche Faszination, die ihresgleichen sucht, wenn es darum ging, Neues zu entdecken und zu verwirklichen. Ich empfinde es als ein Privileg und eine große Bereicherung, dass ich über gute zwei Jahre so eng mit Herrn Professor Lang zusammen arbeiten durfte.

Außerdem danke ich ganz besonders Privatdozent Dr. Thomas Wieder, dem Leiter unseres Labors, der mit seiner großen Erfahrung und unerschütterlichen Freundlichkeit aus jeder scheinbar ausweglosen Schwierigkeit des Experimentierens einen Weg weisen konnte.

Malgorzata Sobiesiak danke ich für die Hilfestellung bei den Western Blots und Daniela Kempe für die Unterstützung bei den Clearance Versuchen.

Weiterhin danke ich Michael Föller für wertvolle Anregungen beim gemeinsamen Experimentieren und für seine Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Danksagung

Die Zahl der Menschen, mit denen ich im Physiologischen Institut zusammenarbeiten konnte, ist zu lang, um sie alle mit Namen zu nennen. Auch ihnen gilt mein Dank für die Hilfe, die sie stets bereit waren zur Verfügung zu stellen, und für die Freundlichkeit, mit der sie mir immer begegneten.

Insbesondere danke ich Tobias Hermle, der mir half, die ersten Schritte in diesem Forschungsgebiet zu gehen und in dem ich einen echten Freund gefunden habe.

8 Literaturverzeichnis

8.1 Literaturverzeichnis alphabetisch

Abraham MC, Shah am S: Death without caspases, caspases without death. Trends Cell Biol 2004;14:184-193.

Abubakar MG, Taylor A, Ferns GA: Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. Int J Exp Pathol 2003;84:49-54.

Afford S, Randhawa S: Apoptosis. Mol Pathol 2000;53:55-63.

Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 2003;3:745-756.

Akel A, Hermle T, Niemoeller OM, Kempe DS, Lang PA, Attanasio P, Podolski M, Wieder T, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. Eur J Pharmacol 2006;532:11-17.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med 1997;3:917-921.

Amos LA, Lowe J: How Taxol stabilises microtubule structure. Chem Biol 1999;6:R65-R69.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. J Biol Chem 1990;265:4923-4928.

Anfinogenova YJ, Rodriguez X, Grygorczyk R, Adragna NC, Lauf PK, Hamet P, Orlov SN: Swelling-induced K(+) fluxes in vascular smooth muscle cells are mediated by charybdotoxin-sensitive K(+) channels. Cell Physiol Biochem 2001;11:295-310.

Arese P, Turrini F, Schwarzer E: Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. Cell Physiol Biochem 2005;16:133-146.

Arroyo A, Modriansky M, Serinkan FB, Bello RI, Matsura T, Jiang J, Tyurin VA, Tyurina YY, Fadeel B, Kagan VE: NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. J Biol Chem 2002;277:49965-49975.

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human

Bibliographie

lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;41:899-906.

Barrett MJ, Goll DE, Thompson VF: Effect of substrate on Ca²⁺(+)-concentration required for activity of the Ca²⁺(+)-dependent proteinases, mu- and m-calpain. *Life Sci* 1991;48:1659-1669.

Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE: Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:1-18.

Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S: Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:1197-1206.

M. Bethesda. National Cancer Institute: Taxol Clinical Brochure. (NSC 125973). 1991.

Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF: Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1439:317-330.

Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME, Huang Y: Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1993;7:563-568.

Bieberich E, MacKinnon S, Silva J, Noggle S, Condie BG: Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. *J Cell Biol* 2003;162:469-479.

Boas FE, Forman L, Beutler E: Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3077-3081.

Bookchin RM, Ortiz OE, Lew VL: Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res* 1987;240:193-200.

Bortner CD, Cidlowski JA: Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:21953-21962.

Bortner CD, Hughes FM, Jr., Cidlowski JA: A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:32436-32442.

Bosman GJ, Willekens FL, Werre JM: Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005;16:1-8.

Bibliographie

Brand VB, Sandu CD, Durantou C, Tanneur V, Lang KS, Huber SM, Lang F: Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:347-356.

Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC: Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001;8:1143-1156.

Brown T, Havlin K, Weiss G, Cagnola J, Koeller J, Kuhn J, Rizzo J, Craig J, Phillips J, Von Hoff D: A phase I trial of taxol given by a 6-hour intravenous infusion. *J Clin Oncol* 1991;9:1261-1267.

Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL: Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993;92:520-526.

Brunsting A, Mullaney PF: Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J* 1974;14:439-453.

Cannata-Andia JB, Fernandez-Martin JL: The clinical impact of aluminium overload in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17 Suppl 2:9-12.

Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, Wang RY, Schober WD, Milella M, Sung HG, Reed JC, Andreeff M: Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood* 2003;102:4179-4186.

Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Roumier T, Piacentini M, Kroemer G: Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:19-28.

Chabner BA. Taxol. In PPO Updates. [Philadelphia, Pa: JB Lippincott Co.], 1-10. 1991. *Cancer Principles & Practice of Oncology*.

Chan SL, Mattson MP: Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 1999;58:167-190.

Chanoine C, Hardy S: Xenopus muscle development: from primary to secondary myogenesis. *Dev Dyn* 2003;226:12-23.

Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC: Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:444-450.

Chipuk JE, Green DR: Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:268-275.

Bibliographie

Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ: Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002;419:395-399.

Clem RJ: Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 2001;8:137-143.

Comfurius P, Senden JM, Tilly RH, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF: Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* 1990;1026:153-160.

Comfurius P, Williamson P, Smeets EF, Schlegel RA, Bevers EM, Zwaal RF: Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. *Biochemistry* 1996;35:7631-7634.

Connor J, Schroit AJ: Determination of lipid asymmetry in human red cells by resonance energy transfer. *Biochemistry* 1987;26:5099-5105.

Cotman CW, Anderson AJ: A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 1995;10:19-45.

Coucouvani EC, Martin GR, Nadeau JH: Genetic approaches for studying programmed cell death during development of the laboratory mouse. *Methods Cell Biol* 1995;46:387-440.

Daleke DL: Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003;44:233-242.

Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219.

R. J. P. C. H. A. Darzynkiewicz Z. *Flow Cytometry*. 2nd Edition. 1994. Academic Press: San Diego.

Daugas E, Cande C, Kroemer G: Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 2001;8:1131-1133.

Dawson TM, Dawson VL: Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003;302:819-822.

De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C: Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999;401:489-493.

De Souza MV: (+)-discodermolide: a marine natural product against cancer. *ScientificWorldJournal* 2004;4:415-436.

Bibliographie

Degli Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813-820.

Del Carlo B, Pellegrini M, Pellegrino M: Calmodulin antagonists do not inhibit IK(Ca) channels of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2002;1558:133-141.

Desagher S, Osen Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC: Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999;144:891-901.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-304.

Donehower RC, Rowinsky EK, Grochow LB, Longnecker SM, Ettinger DS: Phase I trial of taxol in patients with advanced cancer. *Cancer Treat Rep* 1987;71:1171-1177.

du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall Lundqvist E, Bookman M, Bowtell D, Brady M, Casado A, Cervantes A, Eisenhauer E, Friedlaender M, Fujiwara K, Grenman S, Guastalla JP, Harper P, Hogberg T, Kaye S, Kitchener H, Kristensen G, Mannel R, Meier W, Miller B, Neijt JP, Oza A, Ozols R, Parmar M, Pecorelli S, Pfisterer J, Poveda A, Provencher D, Pujade Lauraine E, Randall M, Rochon J, Rustin G, Sagae S, Stehman F, Stuart G, Trimble E, Vasey P, Vergote I, Verheijen R, Wagner U, Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC, Ozols RF: 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004)
Focus on epithelial ovarian cancer
Update on Gynecologic Oncology Group (GOG) trials in ovarian cancer. *Ann Oncol* 2005;16:viii7-viii12.

Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB: A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;15:2685-2694.

Dunn PM: The action of blocking agents applied to the inner face of Ca(2+)-activated K⁺ channels from human erythrocytes. *J Membr Biol* 1998;165:133-143.

Durantion C, Huber SM, Lang F: Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 2002;539:847-855.

Dustin P. *Microtubules*. 2. Auflage. 1984. Springer-Verlag, Berlin, New York.

Bibliographie

Dye RB, Fink SP, Williams RCJ: Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem* 1993;268:6847-6850.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.

Eckert A, Marques CA, Keil U, Schussel K, Muller WE: Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:604-609.

Einzig AI, Gorowski E, Sasloff J, Wiernik PH: Phase II trial of taxol in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 1991a;9:133-136.

Einzig AI, Hochster H, Wiernik PH, Trump DL, Dutcher JP, Garowski E, Sasloff J, Smith TJ: A phase II study of taxol in patients with malignant melanoma. *Invest New Drugs* 1991b;9:59-64.

Einzig AI, Wiernik PH, Sasloff J, Runowicz CD, Goldberg GL: Phase II study and long-term follow-up of patients treated with taxol for advanced ovarian adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10:1748-1753.

Eisele K, Lang PA, Kempe DS, Klarl BA, Niemoller O, Wieder T, Huber SM, Durantion C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;210:116-122.

Eisenhauer EA, Bokkel Huinink WW, Swenerton KD, Gianni L, Myles J, van der Burg ME, Kerr I, Vermorken JB, Buser K, Colombo N: European-Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion. *J Clin Oncol* 1994;12:2654-2666.

Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817-829.

Emmett M: A comparison of clinically useful phosphorus binders for patients with chronic kidney failure. *Kidney Int Suppl* 2004;S25-S32.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC: Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000;20:929-935.

Esposito M, Venturini M, Vannozzi MO, Tolino G, Lunardi G, Garrone O, Angiolini C, Viale M, Bergaglio M, Del Mastro L, Rosso R: Comparative effects of paclitaxel and docetaxel on the metabolism and pharmacokinetics of epirubicin in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1999;17:1132.

Estevez LG, Sanchez Rovira P, Domine M, Leon A, Calvo I, Jaen A, Casado V, Rubio G, Daz M, Miro C, Lobo F, Estevez LG, Gradishar WJ: Biweekly

Bibliographie

docetaxel and gemcitabine as neoadjuvant chemotherapy in stage II and III breast cancer patients: preliminary results of a phase II and pharmacogenomic study

Evidence-based use of neoadjuvant taxane in operable and inoperable breast cancer. *Semin Oncol* 2004;31:31-36.

Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JI, Orrenius S, Samali A: Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:504-511.

Fadok VA, Bratton DL, Henson PM: Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001;108:957-962.

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM: A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405:85-90.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.

Fischer U, Janicke RU, Schulze Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003;10:76-100.

Frago LM, Leon Y, de la Rosa EJ, Gomez Munoz A, Varela Nieto I: Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci* 1998;111:549-556.

Francis PA, Kris MG, Rigas JR, Grant SC, Miller VA: Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): active chemotherapeutic agents in lung cancer. *Lung Cancer* 1995;12:S163-S172.

Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL: Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000;275:23065-23073.

Friedrich K, Wiedner T, von Haefen C, Radetzki S, Janicke R, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT: Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 2001;20:2749-2760.

Gao G, Dou QP: N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 2000;80:53-72.

GARDOS G: The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1958;30:653-654.

Bibliographie

- Garrido C, Kroemer G: Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:639-646.
- Gherzi D, Wilcken N, Simes RJ, Gherzi D, Wilcken N, Simes J, Donoghue E: A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:293-301.
- Gianni L, Kearns CM, Giani A, Capri G, Vigano L, Lacatelli A, Bonadonna G, Egorin MJ: Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in humans. *J Clin Oncol* 1995;13:180-190.
- Giger U, Sticher B, Naef R, Burger R, Lutz HU: Naturally occurring human anti-band 3 autoantibodies accelerate clearance of erythrocytes in guinea pigs. *Blood* 1995;85:1920-1928.
- Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, Barak S, Eshhar Z, Kosower NS: Calpain (Ca(2+)-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7879-7883.
- Glücksman A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. [26], 59-86. 1951. *Biol.Rev.Cambridge Phil. Soc.*
- Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA: Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J Biol Chem* 2000;275:19609-19619.
- Goodnow CC: Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2264-2271.
- Gougeon ML: Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 2003;3:392-404.
- Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E: Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 2002;168:298-307.
- Green DR: Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-698.
- Grem JL, Tutsch KD, Simon KJ, Alberti DB, Willson JK, Tormey DC, Swaminathan S, Trump DL: Phase I study of taxol administered as a short i.v. infusion daily for 5 days. *Cancer Treat Rep* 1987;71:1179-1184.
- Grever MR, Schepartz SA, Chabner BA: The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin Oncol* 1992;19:622-638.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is

Bibliographie

required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999;274:1156-1163.

Grygorczyk R, Schwarz W: Properties of the Ca^{2+} -activated K^{+} conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* 1983;4:499-510.

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA: The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:627-633.

Herr I, Debatin KM: Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98:2603-2614.

Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A: The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca^{2+} -activated K^{+} channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7366-7371.

Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN: Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1797-1805.

Homburg CH, de Haas M, dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D: Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995;85:532-540.

Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO: The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:377-385.

Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ: Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12401-12406.

Huber SM, Gamper N, Lang F: Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 2001;441:551-558.

Hughes FM, Jr., Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA: Intracellular K^{+} suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 1997;272:30567-30576.

Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, Ohki M, Inazawa J: Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:6629-6634.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195.

Bibliographie

Jaattela M, Tschopp J: Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2003;4:416-423.

Jensen BS, Strobaek D, Olesen SP, Christophersen P: The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* 2001;2:401-422.

Jiang X, Wang X: Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004;73:87-106.

Johnson DH, Chang AY, Ettinger DS: Taxol (paclitaxel) in the treatment of lung cancer: the Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Ann Oncol* 1994;5:S45-S50.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW: Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153-164.

Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S: Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 2005;24:980-991.

Kasof GM, Gomes BC: Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001;276:3238-3246.

Kaufmann SH, Earnshaw WC: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256:42-49.

Kaye SB, Piccart M, Apro M, Francis P, Kavanagh J: Phase II trials of docetaxel (Taxotere) in advanced ovarian cancer--an updated overview. *Eur J Cancer* 1997;33:2167-2170.

Ke N, Godzik A, Reed JC: Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 2001;276:12481-12484.

Kempe DS, Lang PA, Duranton C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T, Lang F: Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J* 2006;20:368-370.

Kempe DS, Lang PA, Eisele K, Klarl BA, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C396-C402.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

Kitagaki H, Tomioka S, Yoshizawa T, Sorimachi H, Saido TC, Ishiura S, Suzuki K: Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:689-695.

Bibliographie

Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F: Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C244-C253.

Kluck RM, Bossy Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.

Kolesnick R, Fuks Z: Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 2003;22:5897-5906.

Kolesnick RN, Kronke M: Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:643-665.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-1420.

Krammer PH: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-795.

Kris MG, O'Connell JP, Gralla RJ, Wertheim MS, Parente RM, Schiff PB, Young CW: Phase I trial of taxol given as a 3-hour infusion every 21 days. *Cancer Treat Rep* 1986;70:605-607.

Kroemer G, Martin SJ: Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005;11:725-730.

Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D: Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998;78:247-306.

Lang F, Lang KS, Wieder T, Myssina S, Birka C, Lang PA, Kaiser S, Kempe D, Durantou C, Huber SM: Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflugers Arch* 2003a;447:121-125.

Lang KS, Lang PA, Bauer C, Durantou C, Wieder T, Huber SM, Lang F: Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 2005a;15:195-202.

Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F, Wieder T: Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2004a;11:231-243.

Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F, Durantou C: Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004b;286:F1046-F1053.

Bibliographie

Lang KS, Myssina S, Tanneur V, Wieder T, Huber SM, Lang F, Durantont C: Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003b;367:391-396.

Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Wieder T: Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:365-372.

Lang PA, Beringer O, Nicolay JP, Amon O, Kempe DS, Hermle T, Attanasio P, Akel A, Schafer R, Friedrich B, Risler T, Baur M, Olbricht CJ, Zimmerhackl LB, Zipfel PF, Wieder T, Lang F: Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med* 2006a;84:378-388.

Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, Niemoeller OM, Dreischer P, Eisele K, Klarl BA, Gulbins E, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem* 2006b;18:151-164.

Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM: Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003c;285:C1553-C1560.

Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, Niemoeller OM, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F, Durantont C: Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005b;372:228-235.

Lang PA, Kempe DS, Myssina S, Tanneur V, Birka C, Laufer S, Lang F, Wieder T, Huber SM: PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 2005c;12:415-428.

Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klarl BA, Myssina S, Jendrossek V, Ishii S, Shimizu T, Waidmann M, Hessler G, Huber SM, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 2005d;118:1233-1243.

Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S: Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004;14:277-287.

Legha SS, Tenney DM, Krakoff IR: Phase I study of taxol using a 5-day intermittent schedule. *J Clin Oncol* 1986;4:762-766.

Leinders T, van Kleef RG, Vijverberg HP: Single Ca(2+)-activated K⁺ channels in human erythrocytes: Ca²⁺ dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1112:67-74.

Li X, Gong J, Feldman E, Seiter K, Traganos F, Darzynkiewicz Z: Apoptotic cell death during treatment of leukemias. *Leuk Lymphoma* 1994;13:65-70.

Bibliographie

- Liebmann J, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB: The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;33:331-339.
- Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J: KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:820-831.
- Lincoln S, Blessing JA, Lee RB, Rocereto TF: Activity of paclitaxel as second-line chemotherapy in endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2003;88:277-281.
- Lipton RB, Apfel SC, Dutcher JP, Rosenberg R, Kaplan J, Berger A, Einzig AI, Wiernik P, Schaumburg HH: Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. *Neurology* 1989;39:368-373.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- Long BH, Fairchild CR: Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res* 1994;54:4355-4361.
- Longnecker SM, Donehower RC, Cates AE, Chen TL, Brundrett RB, Grochow LB, Ettinger DS, Colvin M: High-performance liquid chromatographic assay for taxol in human plasma and urine and pharmacokinetics in a phase I trial. *Cancer Treat Rep* 1987;71:53-59.
- Los M, Wesselborg S, Schulze Osthoff K: The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 1999;10:629-639.
- Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485-495.
- Lutz HU: Red cell clearance (a review). *Biomed Biochim Acta* 1987;46:S65-S71.
- Lutz HU: Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2004;50:107-116.
- Lutz HU, Fasler S, Stammli P, Bussolino F, Arese P: Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement in phagocytosis of oxidatively-stressed and in clearance of senescent red cells. *Blood Cells* 1988;14:175-203.
- Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, Rasper D, Roy S, Slack RS, Nicholson DW, MacKenzie AE: The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* 2002;22:2035-2043.
- Mandal D, Baudin Creuza V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, Basu J: Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain

Bibliographie

of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem* 2003;278:52551-52558.

Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J: Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005;280:39460-39467.

Manfredi JJ, Horwitz SB: Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* 1984;25:83-125.

Markman M, Rowinsky E, Hakes T, Reichman B, Jones W, Lewis JLJ, Rubin S, Curtin J, Barakat R, Phillips M: Phase I trial of intraperitoneal taxol: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1485-1491.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A: A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997;7:1003-1006.

Mastropaolo D, Camerman A, Luo Y, Brayer GD, Camerman N: Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6920-6924.

M. M. G. McCarthy D.A. Cytometric analysis of cell phenotype and function. 2001. Cambridge University Press.

McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M: Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;334:1-6.

McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC: Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;111:273-279.

McLaughlin B: The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling. *Apoptosis* 2004;9:111-121.

Mekhail TM, Markman M: Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:755-766.

Messmer UK, Pfeilschifter J: New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 2000;22:878-881.

Montague JW, Bortner CD, Hughes FM, Jr., Cidlowski JA: A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. *Steroids* 1999;64:563-569.

Bibliographie

Moumen R, Ait-Oukhatar N, Bureau F, Fleury C, Bougle D, Arhan P, Neuville D, Viader F: Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:89-93.

Murphy WK, Fossella FV, Winn RJ, Shin DM, Hynes HE, Gross HM, Davilla E, Leimert J, Dhingra H, Raber MN: Phase II study of taxol in patients with untreated advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:384-388.

Myssina S, Lang PA, Kempe DS, Kaiser S, Huber SM, Wieder T, Lang F: Cl-channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca(2+)-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:241-248.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103.

Niemoeller OM, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T, Sobiesiak M, Wieder T, Lang F: Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006a;374:41-49.

Niemoeller OM, Bentzen PJ, Lang E, Lang F: Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. *Eur J Physiol* 2007;

Niemoeller OM, Kiedaisch V, Dreischer P, Wieder T, Lang F: Stimulation of eryptosis by aluminium ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006b;217:168-175.

Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Luduena RF, Downing KH: Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 1995;375:424-427.

Nossal GJ: Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:229-239.

Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ: Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990;144:3602-3610.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.

Onetto N, Canetta R, Winograd B, Catane R, Dougan M, Grechko J, Burroughs J, Rozenzweig M: Overview of Taxol safety. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1993;131-139.

Orihuela D, Meichtry V, Pregi N, Pizarro M: Short-term oral exposure to aluminium decreases glutathione intestinal levels and changes enzyme activities involved in its metabolism. *J Inorg Biochem* 2005;99:1871-1878.

Osinska E, Kanoniuk D, Kusiak A: Aluminum hemotoxicity mechanisms. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska [Med]* 2004;59:411-416.

Bibliographie

Ozols RF, Vermorken JB: Chemotherapy of advanced ovarian cancer: current status and future directions. *Semin Oncol* 1997;24:S2-1.

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818.

Park SJ, Wu CH, Gordon JD, Zhong X, Emami A, Safa AR: Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:51057-51067.

Pellegrino M, Pellegrini M: Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* 1998;436:749-756.

Perez GI, Maravei DV, Trbovich AM, Cidlowski JA, Tilly JL, Hughes FM, Jr.: Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. *Biol Reprod* 2000;63:1358-1369.

Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL: Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277:38503-38516.

Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC: Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000;473:27-32.

Rao S, Horwitz SB, Ringel I: Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:785-788.

Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2941-2953.

Reichman BS, Seidman AD, Crown JP, Heelan R, Yao TJ, Hakes TB, Lebwohl DE, Gilewski TA, Surbone A, Currie V, Reichman BS, Seidman AD, Crown JP, Heelan R, Hakes TB, Lebwohl DE, Gilewski TA, Surbone A, Currie V, Hudis CA: Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1993;698:398-402.

Research Triangle Institute. Progress Report no. 21. 4. 26-6-1967.

Rice L, Alfrey CP: The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:245-250.

Roberts JR, Rowinsky EK, Donehower RC, Robertson J, Allison DC: Demonstration of the cell cycle positions of taxol-induced "asters" and "bundles"

Bibliographie

by sequential measurements of tubulin immunofluorescence, DNA content, and autoradiographic labeling of taxol-sensitive and -resistant cells. *J Histochem Cytochem* 1989;37:1659-1665.

Rodriguez J, Lazebnik Y: Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999;13:3179-3184.

Roshal M, Zhu Y, Planelles V: Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001;6:103-116.

Roth BJ, Yeap BY, Wilding G, Kasimis B, McLeod D, Loehrer PJ: Taxol in advanced, hormone-refractory carcinoma of the prostate. A phase II trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 1993;72:2457-2460.

Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-1252.

Roulston A, Marcellus RC, Branton PE: Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:577-628.

Rowinsky EK, Burke PJ, Karp JE, Tucker RW, Ettinger DS, Donehower RC: Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Res* 1989;49:4640-4647.

Rowinsky EK, Donehower RC, Jones RJ, Tucker RW: Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res* 1988;48:4093-4100.

Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG: Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* 1992;19:646-662.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-6925.

Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner Johnston A, Lefebvre C, Kang X: The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995;80:167-178.

Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, Steinberg MH, Nolan V, Baldwin CT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Zehnbauser BA, Hayden MR, Farrer LA, Roy S, Nicholson DW: Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 2004;429:75-79.

Salvesen GS, Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-446.

Bibliographie

Sarasin A, Stary A: Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev* 1997;21:406-411.

Sarosy G, Kohn E, Stone DA, Rothenberg M, Jacob J, Adamo DO, Ognibene FP, Cunnion RE, Reed E: Phase I study of taxol and granulocyte colony-stimulating factor in patients with refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1165-1170.

Saunders JWJ: Death in embryonic systems. *Science* 1966;154:604-612.

Savill J, Fadok V: Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-788.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277:665-667.

Schiff PB, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1561-1565.

Schiff PB, Horwitz SB: Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 1981;20:3247-3252.

Schulze Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-459.

Schwartz J, Domchek SM, Hwang WT, Fox K: Evaluation of anemia, neutropenia and skin toxicities in standard or dose-dense doxorubicin/cyclophosphamide (AC)-paclitaxel or docetaxel adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2005;16:247-252.

Schwarzer E, Kühn H, Valente E, Arese P: Band 3/COMPLEMENT-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133-146.

Seigneuret M, Devaux PF: ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3751-3755.

H. M. Shapiro. *Practical Flow Cytometry*. 4. Ausgabe . 2003. Wiley-Liss, New York.

Shi Y: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-470.

Shindo M, Imai Y, Sohma Y: A novel type of ATP block on a Ca(2+)-activated K(+) channel from bullfrog erythrocytes. *Biophys J* 2000;79:287-297.

Bibliographie

- Sonnichsen DS, Hurwitz CA, Pratt CB, Shuster JJ, Relling MV: Saturable pharmacokinetics and paclitaxel pharmacodynamics in children with solid tumors. *J Clin Oncol* 1994;12:532-538.
- Spencer CM, Faulds D: Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 1994;48:794-847.
- Spriggs DR, Tondini C: Taxol administered as a 120 hour infusion. *Invest New Drugs* 1992;10:275-278.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Alnemri ES: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949-957.
- Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, Asano T, Kuroki T, Asano T, Hayakawa M: Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest* 2002;109:827-836.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G: Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:571-580.
- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa Munt N, Salvesen GS, Reed JC: A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998;273:7787-7790.
- Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC: Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;6:1796-1803.
- Tatton WG, Chalmers Redman R, Brown D, Tatton N: Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 2003;53:S61-S70.
- Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992;356:768-774.
- Tinel A, Tschopp J: The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 2004;304:843-846.
- Touam M, Martinez F, Lacour B, Bourdon R, Zingraff J, Di Giulio S, Druke T: Aluminium-induced, reversible microcytic anemia in chronic renal failure: clinical and experimental studies. *Clin Nephrol* 1983;19:295-298.

Bibliographie

- Tschopp J, Irmeler M, Thome M: Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998;10:552-558.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097-1099.
- Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL: Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4974-4978.
- Van den Eijnde SM, Boshart L, Reutelingsperger CP, De Zeeuw CI, Vermeij Keers C: Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 1997;4:311-316.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-442.
- Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P: Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:1597-1601.
- Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). 1842. Solothurn.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390:350-351.
- von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT: Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene* 2003;22:2236-2247.
- Wallach D: Apoptosis. Placing death under control. *Nature* 1997;388:123, 125-123, 126.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-2327.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ: tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000;14:2060-2071.

Bibliographie

Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC: Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996;133:1053-1059.

Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dorken B, Daniel PT: Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 2001;97:1378-1387.

Wieder T, Lang PA, Lang KS, Kempe D, Niemoeller OM, Durantou C, Gulbins E, Huber SM, Lang F: Studying mechanisms of eryptosis. *Cytotechnology* 2005;49:117-132.

Wiernik PH, Schwartz EL, Einzig A, Strauman JJ, Lipton RB, Dutcher JP: Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1987;5:1232-1239.

Willner J, Schmidt M, Kirschner J, Lang S, Borgmeier A, Huber RM, Flentje M: Sequential chemo- and radiochemotherapy with weekly paclitaxel (Taxol) and 3D-conformal radiotherapy of stage III inoperable non-small cell lung cancer. Results of a dose escalation study. *Lung Cancer* 2001;32:163-171.

Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ: BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14559-14563.

Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Uehara S, Moffatt S, Tada K, Iwabuchi M, Matsunaga Y, Nakayama M, Yutani C, Osamura Y, Hirayama E, Okamura K, Sugamura K, Yajima A: Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J Infect* 1999;39:68-76.

Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K: Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:376-383.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-652.

Zachowski A, Favre E, Cribier S, Herve P, Devaux PF: Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry* 1986;25:2585-2590.

Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O: Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001;193:247-254.

Zhivotovsky B: Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 2003;39:25-40.

Bibliographie

Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ: Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1997;272:18240-18244.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X: An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999;274:11549-11556.

8.2 Literaturverzeichnis chronologisch

- 1 Grever MR, Schepartz SA, Chabner BA: The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin Oncol* 1992;19:622-638.
- 2 M. Bethesda. National Cancer Institute: Taxol Clinical Brochure. (NSC 125973). 1991.
- 3 Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-2327.
- 4 Research Triangle Institute. Progress Report no. 21. 4. 26-6-1967.
- 5 Mastropaolo D, Camerman A, Luo Y, Brayer GD, Camerman N: Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6920-6924.
- 6 Chabner BA. Taxol. In PPO Updates. [Philadelphia, Pa: JB Lippincott Co.], 1-10. 1991. *Cancer Principles & Practice of Oncology*.
- 7 Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277:665-667.
- 8 Schiff PB, Horwitz SB: Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 1981;20:3247-3252.
- 9 Brown T, Havlin K, Weiss G, Cagnola J, Koeller J, Kuhn J, Rizzo J, Craig J, Phillips J, Von Hoff D: A phase I trial of taxol given by a 6-hour intravenous infusion. *J Clin Oncol* 1991;9:1261-1267.
- 10 Donehower RC, Rowinsky EK, Grochow LB, Longnecker SM, Ettinger DS: Phase I trial of taxol in patients with advanced cancer. *Cancer Treat Rep* 1987;71:1171-1177.
- 11 Grem JL, Tutsch KD, Simon KJ, Alberti DB, Willson JK, Tormey DC, Swaminathan S, Trump DL: Phase I study of taxol administered as a short i.v. infusion daily for 5 days. *Cancer Treat Rep* 1987;71:1179-1184.
- 12 Kris MG, O'Connell JP, Gralla RJ, Wertheim MS, Parente RM, Schiff PB, Young CW: Phase I trial of taxol given as a 3-hour infusion every 21 days. *Cancer Treat Rep* 1986;70:605-607.
- 13 Legha SS, Tenney DM, Krakoff IR: Phase I study of taxol using a 5-day intermittent schedule. *J Clin Oncol* 1986;4:762-766.
- 14 Longnecker SM, Donehower RC, Cates AE, Chen TL, Brundrett RB, Grochow LB, Ettinger DS, Colvin M: High-performance liquid chromatographic assay for taxol in human plasma and urine and pharmacokinetics in a phase I trial. *Cancer Treat Rep* 1987;71:53-59.
- 15 Markman M, Rowinsky E, Hakes T, Reichman B, Jones W, Lewis JLJ, Rubin S, Curtin J, Barakat R, Phillips M: Phase I trial of intraperitoneal taxol: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1485-1491.

Bibliographie

- 16 Rowinsky EK, Burke PJ, Karp JE, Tucker RW, Ettinger DS, Donehower RC: Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Res* 1989;49:4640-4647.
- 17 Sarosy G, Kohn E, Stone DA, Rothenberg M, Jacob J, Adamo DO, Ognibene FP, Cunnion RE, Reed E: Phase I study of taxol and granulocyte colony-stimulating factor in patients with refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1165-1170.
- 18 Spriggs DR, Tondini C: Taxol administered as a 120 hour infusion. *Invest New Drugs* 1992;10:275-278.
- 19 Wiernik PH, Schwartz EL, Einzig A, Strauman JJ, Lipton RB, Dutcher JP: Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1987;5:1232-1239.
- 20 Einzig AI, Wiernik PH, Sasloff J, Runowicz CD, Goldberg GL: Phase II study and long-term follow-up of patients treated with taxol for advanced ovarian adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10:1748-1753.
- 21 McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC: Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;111:273-279.
- 22 Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN: Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1797-1805.
- 23 Reichman BS, Seidman AD, Crown JP, Heelan R, Yao TJ, Hakes TB, Lebwohl DE, Gilewski TA, Surbone A, Currie V, Reichman BS, Seidman AD, Crown JP, Heelan R, Hakes TB, Lebwohl DE, Gilewski TA, Surbone A, Currie V, Hudis CA: Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1993;698:398-402.
- 24 Johnson DH, Chang AY, Ettinger DS: Taxol (paclitaxel) in the treatment of lung cancer: the Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Ann Oncol* 1994;5:S45-S50.
- 25 Murphy WK, Fossella FV, Winn RJ, Shin DM, Hynes HE, Gross HM, Davilla E, Leimert J, Dhingra H, Raber MN: Phase II study of taxol in patients with untreated advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:384-388.
- 26 Einzig AI, Gorowski E, Sasloff J, Wiernik PH: Phase II trial of taxol in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 1991;9:133-136.
- 27 Einzig AI, Hochster H, Wiernik PH, Trump DL, Dutcher JP, Garowski E, Sasloff J, Smith TJ: A phase II study of taxol in patients with malignant melanoma. *Invest New Drugs* 1991;9:59-64.
- 28 Roth BJ, Yeap BY, Wilding G, Kasimis B, McLeod D, Loehrer PJ: Taxol in advanced, hormone-refractory carcinoma of the prostate. A phase II trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 1993;72:2457-2460.
- 29 Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG: Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* 1992;19:646-662.

Bibliographie

- 30 McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M: Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;334:1-6.
- 31 Kaye SB, Piccart M, Aapro M, Francis P, Kavanagh J: Phase II trials of docetaxel (Taxotere) in advanced ovarian cancer--an updated overview. *Eur J Cancer* 1997;33:2167-2170.
- 32 Ozols RF, Vermorken JB: Chemotherapy of advanced ovarian cancer: current status and future directions. *Semin Oncol* 1997;24:S2-1.
- 33 du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall Lundqvist E, Bookman M, Bowtell D, Brady M, Casado A, Cervantes A, Eisenhauer E, Friedlaender M, Fujiwara K, Grenman S, Guastalla JP, Harper P, Hogberg T, Kaye S, Kitchener H, Kristensen G, Mannel R, Meier W, Miller B, Neijt JP, Oza A, Ozols R, Parmar M, Pecorelli S, Pfisterer J, Poveda A, Provencher D, Pujade Lauraine E, Randall M, Rochon J, Rustin G, Sagae S, Stehman F, Stuart G, Trimble E, Vasey P, Vergote I, Verheijen R, Wagner U, Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC, Ozols RF: 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004)
Focus on epithelial ovarian cancer
Update on Gynecologic Oncology Group (GOG) trials in ovarian cancer. *Ann Oncol* 2005;16:viii7-viii12.
- 34 Mekhail TM, Markman M: Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:755-766.
- 35 Estevez LG, Sanchez Rovira P, Domine M, Leon A, Calvo I, Jaen A, Casado V, Rubio G, Daz M, Miro C, Lobo F, Estevez LG, Gradishar WJ: Biweekly docetaxel and gemcitabine as neoadjuvant chemotherapy in stage II and III breast cancer patients: preliminary results of a phase II and pharmacogenomic study
Evidence-based use of neoadjuvant taxane in operable and inoperable breast cancer. *Semin Oncol* 2004;31:31-36.
- 36 Ghersi D, Wilcken N, Simes RJ, Ghersi D, Wilcken N, Simes J, Donoghue E: A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer
Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:293-301.
- 37 Francis PA, Kris MG, Rigas JR, Grant SC, Miller VA: Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): active chemotherapeutic agents in lung cancer. *Lung Cancer* 1995;12:S163-S172.
- 38 Willner J, Schmidt M, Kirschner J, Lang S, Borgmeier A, Huber RM, Flentje M: Sequential chemo- and radiochemotherapy with weekly paclitaxel (Taxol) and 3D-conformal radiotherapy of stage III inoperable non-small cell lung cancer. Results of a dose escalation study. *Lung Cancer* 2001;32:163-171.

Bibliographie

- 39 Lincoln S, Blessing JA, Lee RB, Rocereto TF: Activity of paclitaxel as second-line chemotherapy in endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2003;88:277-281.
- 40 De Souza MV: (+)-discodermolide: a marine natural product against cancer. *ScientificWorldJournal* 2004;4:415-436.
- 41 Schiff PB, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1561-1565.
- 42 Dustin P. *Microtubules*. 2. Auflage. 1984. Springer-Verlag, Berlin, New York.
- 43 Amos LA, Lowe J: How Taxol stabilises microtubule structure. *Chem Biol* 1999;6:R65-R69.
- 44 Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Luduena RF, Downing KH: Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 1995;375:424-427.
- 45 Rao S, Horwitz SB, Ringel I: Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:785-788.
- 46 Manfredi JJ, Horwitz SB: Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* 1984;25:83-125.
- 47 Dye RB, Fink SP, Williams RCJ: Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem* 1993;268:6847-6850.
- 48 Rowinsky EK, Donehower RC, Jones RJ, Tucker RW: Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res* 1988;48:4093-4100.
- 49 Roberts JR, Rowinsky EK, Donehower RC, Robertson J, Allison DC: Demonstration of the cell cycle positions of taxol-induced "asters" and "bundles" by sequential measurements of tubulin immunofluorescence, DNA content, and autoradiographic labeling of taxol-sensitive and -resistant cells. *J Histochem Cytochem* 1989;37:1659-1665.
- 50 Liebmann J, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB: The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;33:331-339.
- 51 Long BH, Fairchild CR: Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res* 1994;54:4355-4361.
- 52 Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME, Huang Y: Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1993;7:563-568.
- 53 Li X, Gong J, Feldman E, Seiter K, Traganos F, Darzynkiewicz Z: Apoptotic cell death during treatment of leukemias. *Leuk Lymphoma* 1994;13:65-70.
- 54 von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT: Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene* 2003;22:2236-2247.
- 55 Onetto N, Canetta R, Winograd B, Catane R, Dougan M, Grechko J, Burroughs J, Rozenzweig M: Overview of Taxol safety. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1993;131-139.

Bibliographie

- 56 Lipton RB, Apfel SC, Dutcher JP, Rosenberg R, Kaplan J, Berger A, Einzig AI, Wiernik P, Schaumburg HH: Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. *Neurology* 1989;39:368-373.
- 57 Eisenhauer EA, Bokkel Huinink WW, Swenerton KD, Gianni L, Myles J, van der Burg ME, Kerr I, Vermorken JB, Buser K, Colombo N: European-Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion. *J Clin Oncol* 1994;12:2654-2666.
- 58 Esposito M, Venturini M, Vannozzi MO, Tolino G, Lunardi G, Garrone O, Angiolini C, Viale M, Bergaglio M, Del Mastro L, Rosso R: Comparative effects of paclitaxel and docetaxel on the metabolism and pharmacokinetics of epirubicin in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1999;17:1132.
- 59 Schwartz J, Domchek SM, Hwang WT, Fox K: Evaluation of anemia, neutropenia and skin toxicities in standard or dose-dense doxorubicin/cyclophosphamide (AC)-paclitaxel or docetaxel adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2005;16:247-252.
- 60 Sonnichsen DS, Hurwitz CA, Pratt CB, Shuster JJ, Relling MV: Saturable pharmacokinetics and paclitaxel pharmacodynamics in children with solid tumors. *J Clin Oncol* 1994;12:532-538.
- 61 Gianni L, Kearns CM, Giani A, Capri G, Vigano L, Lacatelli A, Bonadonna G, Egorin MJ: Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in humans. *J Clin Oncol* 1995;13:180-190.
- 62 Spencer CM, Faulds D: Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 1994;48:794-847.
- 63 Emmett M: A comparison of clinically useful phosphorus binders for patients with chronic kidney failure. *Kidney Int Suppl* 2004;S25-S32.
- 64 Cannata-Andia JB, Fernandez-Martin JL: The clinical impact of aluminium overload in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17 Suppl 2:9-12.
- 65 Touam M, Martinez F, Lacour B, Bourdon R, Zingraff J, Di Giulio S, Druke T: Aluminium-induced, reversible microcytic anemia in chronic renal failure: clinical and experimental studies. *Clin Nephrol* 1983;19:295-298.
- 66 Osinska E, Kanoniuk D, Kusiak A: Aluminum hemotoxicity mechanisms. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 2004;59:411-416.
- 67 Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F: Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:195-202.
- 68 Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). 1842. Solothurn.
- 69 Glücksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. [26], 59-86. 1951. *Biol.Rev.Cambridge Phil. Soc.*
- 70 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- 71 Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817-829.

Bibliographie

- 72 Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO: The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:377-385.
- 73 Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2941-2953.
- 74 Chanoine C, Hardy S: *Xenopus* muscle development: from primary to secondary myogenesis. *Dev Dyn* 2003;226:12-23.
- 75 Coucouvanis EC, Martin GR, Nadeau JH: Genetic approaches for studying programmed cell death during development of the laboratory mouse. *Methods Cell Biol* 1995;46:387-440.
- 76 Saunders JWJ: Death in embryonic systems. *Science* 1966;154:604-612.
- 77 Goodnow CC: Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2264-2271.
- 78 Nossal GJ: Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:229-239.
- 79 Arroyo A, Modriansky M, Serinkan FB, Bello RI, Matsura T, Jiang J, Tyurin VA, Tyurina YY, Fadeel B, Kagan VE: NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. *J Biol Chem* 2002;277:49965-49975.
- 80 Herr I, Debatin KM: Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98:2603-2614.
- 81 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW: Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153-164.
- 82 Kaufmann SH, Earnshaw WC: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256:42-49.
- 83 Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485-495.
- 84 Sarasin A, Stary A: Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev* 1997;21:406-411.
- 85 Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Roumier T, Piacentini M, Kroemer G: Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:19-28.
- 86 Gougeon ML: Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 2003;3:392-404.
- 87 Roshal M, Zhu Y, Planelles V: Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001;6:103-116.
- 88 Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
- 89 Dawson TM, Dawson VL: Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003;302:819-822.
- 90 Tatton WG, Chalmers Redman R, Brown D, Tatton N: Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 2003;53:S61-S70.
- 91 Cotman CW, Anderson AJ: A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 1995;10:19-45.
- 92 Eckert A, Marques CA, Keil U, Schussel K, Muller WE: Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:604-609.

Bibliographie

- 93 Roulston A, Marcellus RC, Branton PE: Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:577-628.
- 94 Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390:350-351.
- 95 Green DR: Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-698.
- 96 Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JI, Orrenius S, Samali A: Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:504-511.
- 97 Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL: Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000;275:23065-23073.
- 98 Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL: Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277:38503-38516.
- 99 Savill J, Fadok V: Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-788.
- 100 Van den Eijnde SM, Boshart L, Reutelingsperger CP, De Zeeuw CI, Vermeij Keers C: Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 1997;4:311-316.
- 101 Daleke DL: Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003;44:233-242.
- 102 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
- 103 Fadok VA, Bratton DL, Henson PM: Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001;108:957-962.
- 104 Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S: Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004;14:277-287.
- 105 Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM: A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405:85-90.
- 106 Schulze Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-459.
- 107 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103.
- 108 Abraham MC, Shaham S: Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004;14:184-193.
- 109 Kroemer G, Martin SJ: Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005;11:725-730.

Bibliographie

- 110 Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097-1099.
- 111 Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992;356:768-774.
- 112 Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-652.
- 113 Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
- 114 Garrido C, Kroemer G: Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:639-646.
- 115 Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, Steinberg MH, Nolan V, Baldwin CT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Zehnbauser BA, Hayden MR, Farrer LA, Roy S, Nicholson DW: Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 2004;429:75-79.
- 116 Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ: Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002;419:395-399.
- 117 Daugas E, Cande C, Kroemer G: Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 2001;8:1131-1133.
- 118 McLaughlin B: The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling. *Apoptosis* 2004;9:111-121.
- 119 Salvesen GS, Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-446.
- 120 Shi Y: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-470.
- 121 Afford S, Randhawa S: Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53:55-63.
- 122 Fischer U, Janicke RU, Schulze Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003;10:76-100.
- 123 Los M, Wesselborg S, Schulze Osthoff K: The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 1999;10:629-639.
- 124 Zhivotovsky B: Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 2003;39:25-40.
- 125 Jiang X, Wang X: Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004;73:87-106.
- 126 Tinel A, Tschopp J: The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 2004;304:843-846.

Bibliographie

- 127 Krammer PH: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-795.
- 128 Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-756.
- 129 Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- 130 Desagher S, Osen Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC: Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999;144:891-901.
- 131 Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999;274:1156-1163.
- 132 Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219.
- 133 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195.
- 134 Tschopp J, Irmeler M, Thome M: Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998;10:552-558.
- 135 Wallach D: Apoptosis. Placing death under control. *Nature* 1997;388:123, 125-123, 126.
- 136 Degli Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813-820.
- 137 Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A: A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997;7:1003-1006.
- 138 Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818.
- 139 Kluck RM, Bossy Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
- 140 Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dorken B, Daniel PT: Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 2001;97:1378-1387.
- 141 Rodriguez J, Lazebnik Y: Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999;13:3179-3184.
- 142 Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Alnemri ES: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949-957.

Bibliographie

- 143 Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.
- 144 Zou H, Li Y, Liu X, Wang X: An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999;274:11549-11556.
- 145 Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, Wang RY, Schober WD, Milella M, Sung HG, Reed JC, Andreeff M: Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood* 2003;102:4179-4186.
- 146 Chipuk JE, Green DR: Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:268-275.
- 147 Jaattela M, Tschopp J: Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2003;4:416-423.
- 148 Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S: Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 2005;24:980-991.
- 149 Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G: Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:571-580.
- 150 Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ: BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14559-14563.
- 151 Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S: Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:1197-1206.
- 152 Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC: Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001;8:1143-1156.
- 153 Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-304.
- 154 Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, Rasper D, Roy S, Slack RS, Nicholson DW, MacKenzie AE: The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* 2002;22:2035-2043.
- 155 Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-6925.
- 156 Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa Munt N, Salvesen GS, Reed JC: A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998;273:7787-7790.

Bibliographie

- 157 Clem RJ: Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 2001;8:137-143.
- 158 Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner Johnston A, Lefebvre C, Kang X: The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995;80:167-178.
- 159 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-921.
- 160 Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB: A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;15:2685-2694.
- 161 Kasof GM, Gomes BC: Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001;276:3238-3246.
- 162 Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J: KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:820-831.
- 163 Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-1252.
- 164 Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL: Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4974-4978.
- 165 Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, Ohki M, Inazawa J: Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:6629-6634.
- 166 Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC: Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;6:1796-1803.
- 167 Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;41:899-906.
- 168 Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ: Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990;144:3602-3610.
- 169 Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-442.
- 170 Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ: Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12401-12406.

Bibliographie

- 171 Ke N, Godzik A, Reed JC: Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 2001;276:12481-12484.
- 172 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
- 173 Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC: Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000;20:929-935.
- 174 Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ: tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000;14:2060-2071.
- 175 Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC: Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996;133:1053-1059.
- 176 Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Uehara S, Moffatt S, Tada K, Iwabuchi M, Matsunaga Y, Nakayama M, Yutani C, Osamura Y, Hirayama E, Okamura K, Sugamura K, Yajima A: Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J Infect* 1999;39:68-76.
- 177 De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C: Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999;401:489-493.
- 178 Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O: Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001;193:247-254.
- 179 Lang F, Lang KS, Wieder T, Myssina S, Birka C, Lang PA, Kaiser S, Kempe D, Duranton C, Huber SM: Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflugers Arch* 2003;447:121-125.
- 180 Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F, Wieder T: Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2004;11:231-243.
- 181 Duranton C, Huber SM, Lang F: Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 2002;539:847-855.
- 182 Mandal D, Baudin Creuza V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, Basu J: Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem* 2003;278:52551-52558.
- 183 Huber SM, Gamper N, Lang F: Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 2001;441:551-558.
- 184 Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F, Duranton C: Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl-. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F1046-F1053.
- 185 Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Wieder T: Enhanced erythrocyte apoptosis in

Bibliographie

- sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:365-372.
- 186 Eisele K, Lang PA, Kempe DS, Klarl BA, Niemoller O, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;210:116-122.
- 187 Kempe DS, Lang PA, Eisele K, Klarl BA, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C396-C402.
- 188 Niemoeller OM, Kiedaisch V, Dreischer P, Wieder T, Lang F: Stimulation of eryptosis by aluminium ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;217:168-175.
- 189 Akel A, Hermle T, Niemoeller OM, Kempe DS, Lang PA, Attanasio P, Podolski M, Wieder T, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol* 2006;532:11-17.
- 190 Niemoeller OM, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T, Sobiesiak M, Wieder T, Lang F: Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006;374:41-49.
- 191 Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, Niemoeller OM, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F, Duranton C: Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005;372:228-235.
- 192 Niemoeller OM, Bentzen PJ, Lang E, Lang F: Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. *Pflugers Arch* 2007;
- 193 Del Carlo B, Pellegrini M, Pellegrino M: Calmodulin antagonists do not inhibit IK(Ca) channels of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2002;1558:133-141.
- 194 Dunn PM: The action of blocking agents applied to the inner face of Ca(2+)-activated K⁺ channels from human erythrocytes. *J Membr Biol* 1998;165:133-143.
- 195 GARDOS G: The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1958;30:653-654.
- 196 Grygorczyk R, Schwarz W: Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* 1983;4:499-510.
- 197 Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A: The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7366-7371.
- 198 Lang KS, Myssina S, Tanneur V, Wieder T, Huber SM, Lang F, Duranton C: Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;367:391-396.
- 199 Leinders T, van Kleef RG, Vijverberg HP: Single Ca(2+)-activated K⁺ channels in human erythrocytes: Ca²⁺ dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1112:67-74.
- 200 Pellegrino M, Pellegrini M: Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* 1998;436:749-756.

Bibliographie

- 201 Shindo M, Imai Y, Sohma Y: A novel type of ATP block on a Ca(2+)-activated K(+) channel from bullfrog erythrocytes. *Biophys J* 2000;79:287-297.
- 202 Zachowski A, Favre E, Cribier S, Herve P, Devaux PF: Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry* 1986;25:2585-2590.
- 203 Seigneuret M, Devaux PF: ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3751-3755.
- 204 Comfurius P, Senden JM, Tilly RH, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF: Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* 1990;1026:153-160.
- 205 Comfurius P, Williamson P, Smeets EF, Schlegel RA, Bevers EM, Zwaal RF: Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. *Biochemistry* 1996;35:7631-7634.
- 206 Connor J, Schroit AJ: Determination of lipid asymmetry in human red cells by resonance energy transfer. *Biochemistry* 1987;26:5099-5105.
- 207 Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ: Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1997;272:18240-18244.
- 208 Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF: Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1439:317-330.
- 209 Frago LM, Leon Y, de la Rosa EJ, Gomez Munoz A, Varela Nieto I: Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci* 1998;111:549-556.
- 210 Kolesnick R, Fuks Z: Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 2003;22:5897-5906.
- 211 Kolesnick RN, Kronke M: Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:643-665.
- 212 Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC: Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000;473:27-32.
- 213 Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, Barak S, Eshhar Z, Kosower NS: Calpain (Ca(2+)-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7879-7883.
- 214 Lang PA, Kempe DS, Myssina S, Tanneur V, Birka C, Laufer S, Lang F, Wieder T, Huber SM: PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 2005;12:415-428.
- 215 Chan SL, Mattson MP: Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 1999;58:167-190.
- 216 Gao G, Dou QP: N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent

Bibliographie

- cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 2000;80:53-72.
- 217 Barrett MJ, Goll DE, Thompson VF: Effect of substrate on Ca²⁺(+)-concentration required for activity of the Ca²⁺(+)-dependent proteinases, mu- and m-calpain. *Life Sci* 1991;48:1659-1669.
- 218 Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K: Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:376-383.
- 219 Kitagaki H, Tomioka S, Yoshizawa T, Sorimachi H, Saido TC, Ishiura S, Suzuki K: Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:689-695.
- 220 Wieder T, Lang PA, Lang KS, Kempe D, Niemoeller OM, Durantion C, Gulbins E, Huber SM, Lang F: Studying mechanisms of eryptosis. *Cytotechnology* 2005;49:117-132.
- 221 Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klarl BA, Myssina S, Jendrossek V, Ishii S, Shimizu T, Waidmann M, Hessler G, Huber SM, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 2005;118:1233-1243.
- 222 Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923-4928.
- 223 Homburg CH, de Haas M, dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D: Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995;85:532-540.
- 224 Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-1420.
- 225 Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P: Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:1597-1601.
- 226 Brunsting A, Mullaney PF: Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J* 1974;14:439-453.
- 227 H. M. Shapiro. *Practical Flow Cytometry*. 4. Ausgabe . 2003. Wiley-Liss, New York.
- 228 R. J. P. C. H. A. Darzynkiewicz Z. *Flow Cytometry*. 2nd Edition. 1994. Academic Press: San Diego.
- 229 M. M. G. McCarthy D.A. *Cytometric analysis of cell phenotype and function*. 2001. Cambridge University Press.
- 230 Bieberich E, MacKinnon S, Silva J, Noggle S, Condie BG: Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. *J Cell Biol* 2003;162:469-479.
- 231 Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E: Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 2002;168:298-307.

Bibliographie

- 232 Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D: Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998;78:247-306.
- 233 Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM: Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C1553-C1560.
- 234 Friedrich K, Wieder T, von Haefen C, Radetzki S, Janicke R, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT: Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 2001;20:2749-2760.
- 235 Park SJ, Wu CH, Gordon JD, Zhong X, Emami A, Safa AR: Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:51057-51067.
- 236 Boas FE, Forman L, Beutler E: Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3077-3081.
- 237 Messmer UK, Pfeilschifter J: New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 2000;22:878-881.
- 238 Abubakar MG, Taylor A, Ferns GA: Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. *Int J Exp Pathol* 2003;84:49-54.
- 239 Moumen R, Ait-Oukhatar N, Bureau F, Fleury C, Bougle D, Arhan P, Neuville D, Viader F: Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:89-93.
- 240 Orihuela D, Meichtry V, Pregi N, Pizarro M: Short-term oral exposure to aluminium decreases glutathione intestinal levels and changes enzyme activities involved in its metabolism. *J Inorg Biochem* 2005;99:1871-1878.
- 241 Kempe DS, Lang PA, Durantou C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T, Lang F: Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J* 2006;20:368-370.
- 242 Brand VB, Sandu CD, Durantou C, Tanneur V, Lang KS, Huber SM, Lang F: Dependence of *Plasmodium falciparum* in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:347-356.
- 243 Henson PM, Bratton DL, Fadok VA: The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:627-633.
- 244 Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE: Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:1-18.
- 245 Bosman GJ, Willekens FL, Werre JM: Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005;16:1-8.
- 246 Rice L, Alfrey CP: The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:245-250.
- 247 Schwarzer E, Kühn H, Valente E, Arese P: Band 3/COMPLEMENT-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133-146.

Bibliographie

- 248 Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J: Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005;280:39460-39467.
- 249 Bookchin RM, Ortiz OE, Lew VL: Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res* 1987;240:193-200.
- 250 Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL: Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993;92:520-526.
- 251 Myssina S, Lang PA, Kempe DS, Kaiser S, Huber SM, Wieder T, Lang F: Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca(2+)-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:241-248.
- 252 Anfinogenova YJ, Rodriguez X, Grygorczyk R, Adragna NC, Lauf PK, Hamet P, Orlov SN: Swelling-induced K(+) fluxes in vascular smooth muscle cells are mediated by charybdotoxin-sensitive K(+) channels. *Cell Physiol Biochem* 2001;11:295-310.
- 253 Jensen BS, Strobaek D, Olesen SP, Christophersen P: The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* 2001;2:401-422.
- 254 Bortner CD, Hughes FM, Jr., Cidlowski JA: A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:32436-32442.
- 255 Bortner CD, Cidlowski JA: Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:21953-21962.
- 256 Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA: Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J Biol Chem* 2000;275:19609-19619.
- 257 Hughes FM, Jr., Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA: Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 1997;272:30567-30576.
- 258 Montague JW, Bortner CD, Hughes FM, Jr., Cidlowski JA: A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. *Steroids* 1999;64:563-569.
- 259 Perez GI, Maravei DV, Trbovich AM, Cidlowski JA, Tilly JL, Hughes FM, Jr.: Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. *Biol Reprod* 2000;63:1358-1369.
- 260 Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC: Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:444-450.
- 261 Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, Asano T, Kuroki T, Asano T, Hayakawa M: Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest* 2002;109:827-836.
- 262 Lutz HU, Fasler S, Stammer P, Bussolino F, Arese P: Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement in phagocytosis of oxidatively-

Bibliographie

- stressed and in clearance of senescent red cells. *Blood Cells* 1988;14:175-203.
- 263 Lutz HU: Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2004;50:107-116.
- 264 Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F: Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C244-C253.
- 265 Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, Niemoeller OM, Dreischer P, Eisele K, Klarl BA, Gulbins E, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem* 2006;18:151-164.
- 266 Arese P, Turrini F, Schwarzer E: Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133-146.
- 267 Giger U, Sticher B, Naef R, Burger R, Lutz HU: Naturally occurring human anti-band 3 autoantibodies accelerate clearance of erythrocytes in guinea pigs. *Blood* 1995;85:1920-1928.
- 268 Lutz HU: Red cell clearance (a review). *Biomed Biochim Acta* 1987;46:S65-S71.
- 269 Lang PA, Beringer O, Nicolay JP, Amon O, Kempe DS, Hermle T, Attanasio P, Akel A, Schafer R, Friedrich B, Risler T, Baur M, Olbricht CJ, Zimmerhackl LB, Zipfel PF, Wieder T, Lang F: Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med* 2006;84:378-388.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Olivier Niemöller
Geburtsdatum: 29.04.1977
Geburtsort: Heidelberg
Staatsangehörigkeit: deutsch und französisch

Schulbildung

1994 Mittlere Reife, Realschule Überlingen
1996 Abschluss der Ausbildung zum
Biologisch-technischen Assistenten und
Fachhochschulreife (Note:2,0)
1998 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,2)

Fremdsprachen: Englisch, Französisch

1998 – 1999 Zivildienst im Krankenhaus Überlingen

Hochschulausbildung

04/2000 Studienbeginn im Fach Humanmedizin an der
Eberhard-Karls Universität Tübingen
26.03.2002 Ärztliche Vorprüfung
16.04.2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07.09.2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07.11.2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Abschluss des Studiums (Note:1,16)
Approbation

Praktische Tätigkeiten

Famulaturen:

1. Onkologische Abteilung, Spital Konstanz
2. Innere Abteilung, Elisabeth-Krankenhaus Kassel
3. Klinik für Schmerztherapie, Spital Konstanz
4. Praxis für Neurologie, Dr. Niemöller, Überlingen

Praktisches Jahr:

1. Terial: Klinik für Radioonkologie am Universitätsklinikum Tübingen
2. Terial: Medizinische Universitätsklinik Tübingen in der hämatoonkologischen, sowie der nephrologischen und rheumatologischen Abteilung.
3. Terial am Universitätsklinikum Tübingen in der Allgemeinchirurgie und der Neurochirurgie.

Facharztausbildung

Seit 01/2007

Assistenzarzt in der Universitätsklinik für Radioonkologie in Tübingen.

Publikationen

1. Lang PA, Kempe DS, Akel A, Klarl BA, Eisele K, Podolski M, Hermle T, **Niemoeller OM**, Attanasio P, Huber SM, Wieder T, Lang F, Duranton C: Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2005;372:228-235.
2. Eisele K, Lang PA, Kempe DS, Klarl BA, **Niemoller O**, Wieder T, Huber SM, Duranton C, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. Toxicol Appl Pharmacol 2006;210:116-122.
3. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, **Niemoeller OM**, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F: Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. Am J Physiol Cell Physiol 2006;290:C244-C253.
4. Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, **Niemoeller OM**, Dreischer P, Eisele K, Klarl BA, Gulbins E, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. Cell Physiol Biochem 2006;18:151-164.
5. Akel A, Hermle T, **Niemoeller OM**, Kempe DS, Lang PA, Attanasio P, Podolski M, Wieder T, Lang F: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. Eur J Pharmacol 2006;532:11-17.
6. **Niemoeller OM**, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T, Sobiesiak M, Wieder T, Lang F: Induction of eryptosis by cyclosporine. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2006a;374:41-49.
7. Nicolay JP, Schneider J, **Niemoeller OM**, Artunc F, Portero-Otin M, Haik GJ, Thornalley PJ, Schleicher E, Wieder T, Lang F: Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. Cell Physiol Biochem 2006;18:223-232.
8. Wieder T, Lang PA, Lang KS, Kempe D, **Niemoeller OM**, Duranton C, Gulbins E, Huber SM, Lang F: Studying mechanisms of eryptosis. Cytotechnology 2006;49:117-132.
9. **Niemoeller OM**, Kiedaisch V, Dreischer P, Wieder T, Lang F: Stimulation of eryptosis by aluminium ions. Toxicol Appl Pharmacol 2006b;217:168-175.
10. **Niemoeller OM**, Bentzen PJ, Lang E, Lang F: Adenosine protects against suicidal erythrocyte death. Pflugers Arch 2007;