

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I

**Zelltod humaner Erythrozyten durch
Mitotan und Miltefosin**

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

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

vorgelegt von

Jacobi, Janin Melanie Katharina

2017

Dekan: Professor Dr. I.B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 12.10.2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Mitotan	7
1.1.1 Mitotan: Entwicklung und Indikationen.....	7
1.1.2 Mitotan: pharmakologische Wirkung und Abbau.....	9
1.1.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) von Mitotan	12
1.2 Miltefosin	14
1.2.1 Die Entwicklung des Medikaments Miltefosin	14
1.2.2 Klinische Indikationen.....	15
1.2.3 Biochemie und Pharmakokinetik von Miltefosin	16
1.2.4 Nebenwirkungen der Miltefosin-Behandlung	20
1.3 Die Apoptose	21
1.3.1 Bedeutung der Apoptose.....	21
1.3.2 Apoptose: Überblick und beteiligte Moleküle	23
1.3.3 Apoptose: Verlauf und Regulation der Signalkaskaden	24
1.4 Erythrozyten	30
1.4.1 Überblick: Bildung, Morphologie, Physiologie und Seneszenz.....	30
1.5 Die Eryptose	33
1.5.1 Die klinische Relevanz der Eryptose	33
1.5.2 Die Eryptose – Ein Überblick.....	37
1.5.3 Die Eryptose über intrazellulären Kalziumanstieg (Ca ²⁺)	38
1.5.4 Eryptose durch Ceramidformation mit Phosphatidylserin (PS)-Exposition ...	41
1.5.5 Caspasenaktivierung mit Phosphatidylserin (PS)-Exposition	44
1.6 Thematik und Ziele der Arbeit	45
2 Material und Methoden	46
2.1 Material	46
2.1.1 Erythrozyten	46
2.1.2 Verwendete Substanzen	46
2.1.3 Verwendete Lösungen.....	49
2.2 Methoden	51
2.2.1 Versuchsdurchführung	51
2.2.2 FACS Analyse – Durchflusszytometrie	52
2.2.3 Bestimmung des intrazellulären Kalziumgehalts mit Fluo-3/AM.....	55
2.2.4 Annexin V-Bindung und Messung der Zellgröße (FSC)	56
2.2.5 Hämolysemessung.....	57
2.3 Statistik	58

3	Ergebnisse.....	59
3.1	Mitotan induzierte Eryptose.....	59
3.1.1	Der Einfluss von Mitotan auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration	59
3.1.2	Wirkung von Mitotan auf die Phosphatidylserin (PS)-Exposition und Annexin V-Bindung	61
3.1.3	Der Einfluss des extrazellulären Kalziums (Ca ²⁺).....	62
3.1.4	Weitere Mechanismen von Mitotan und Inhibitoren des erythrozytären Zelltods.....	64
3.1.5	Zellvolumen und Ionomycin	66
3.1.6	Hämolyse	68
3.2	Miltefosin induzierte Eryptose.....	70
3.2.1	Die Wirkung von Miltefosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration	71
3.2.2	Forward Scatter (FSC)	72
3.2.3	Annexin V und Hämolyse	74
3.2.4	Annexin V und Forward Scatter (FSC).....	76
3.2.5	Extrazelluläres Kalzium (Ca ²⁺).....	77
3.2.6	Extrazelluläres Kalium (K ⁺)	79
4	Diskussion	81
4.1	Methodendiskussion.....	81
4.2	Der Einfluss von Mitotan auf den Erythrozytenzelltod	82
4.3	Miltefosin und die Eryptose.....	87
5	Zusammenfassung.....	94
6	Literaturverzeichnis	96
7	Erklärung zum Eigenanteil	110
8	Veröffentlichungen.....	112
9	Abbildungsverzeichnis	113
10	Tabellarischer Anhang.....	114
11	Danksagung.....	115
12	Lebenslauf	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABT 491	ABT 491 Hydrochlorid, 4-Ethynyl-N,N-dimethyl-3-[3-fluoro-4-[(2-methyl-1H-imidazo-[4,5-c]pyridin-1-yl)methyl]benzoyl]-1H-indole-1-carboxamide hydrochloride
ACC	Adrenokortikales Karzinom
AE1	Anionenaustauscher-1 /Bande 3
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase
Apaf-1	engl. „apoptotic protease activating factor 1“
ASM	engl. „acid sphingomyelinase“
ATP / dATP	Adenosintriphosphat / Desoxyadenosintriphosphat
Bcl-XL	engl. „B-cell lymphoma-extra large“
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid (110,99 g/mol)
Caspase	Cystein-Aspartat spezifische Protease
CARD	engl. „caspase-recruitment domain“
CD4	engl. „cluster of differentiation 4“
CD47	engl. „cluster of differentiation 47“
CD95	engl. „cluster of differentiation 95“
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
COX	Cyclooxygenase
CYP11A1	Cholesterin-Monooxygenase 11A1
CYP11B1/2	Steroid-11β-Hydroxylase
CYP17A1	Steroid-17α-Hydroxylase
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DISC	engl. „death-inducing signal complex“
DIABLO	engl. „direct IAP-binding mitochondrial protein“
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DR	engl. „death receptor“ Todesrezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminothylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EDA-R	Ektodysplasie-Rezeptor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	engl. „fas-associated death domain“
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	engl. „FADD-like IL-1β-converting enzyme“
FLIP / c-FLIP	FLICE-inhibierendes Protein/cellular FLICE-inhibiting protein
Fluo-3 / AM	Fluo-3 / Acetoxymethyl-Ester
FSC	Forward Scatter
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (238,31g/mol)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HtrA2	engl. „high-temperature-requirement protein“ A2(entspricht „Omi“)
IAP	engl. „inhibitor of apoptosis protein“
IKK	engl. „inhibitor of kappa B (IκB) kinase“

K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid (74,55 g/mol)
KCNN4	engl. „potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4“, Gardos- oder Ca ²⁺ -abhängiger K ⁺ -Kanal
MAC	engl. „mitochondrial apoptosis-induced channel“
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MAP-K	engl. „mitogen-activated protein“ -Kinase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat (246,48 g/mol)
MOMP	engl. „mitochondrial outer membrane permeabilization“
mPTP	engl. „mitochondrial permeability transition pores“
mRNA	engl. „messenger Ribonucleic acid“
mTNF α	membrangebundener Tumornekrosefaktor α
NaCl	Natriumchlorid (58,44 g/mol)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium/Kalium-Adenosintriphosphat Ionenpumpe
NaOH	Natriumhydroxid (40 g/mol)
N-AC	N-Acetylcystein
NF- κ B	engl. „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“
NGF-R	engl. „nerve growth factor receptor“
Omi	mitochondriale Serin-Protease (entspricht „HtrA2“)
PAF	engl. „platelet activating factor“ / Plättchenaktivierender Faktor p21-aktivierte Kinase
PAK2	Prostaglandin E ₂
PGE ₂	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3-Kinase	Phospholipase A ₂
PLA ₂	Phosphatidylserin
PS	
RIP-1	engl. „receptor-interacting protein kinase 1“
RNA	engl. „messenger Ribonucleic acid“
SSC	Sideward Scatter
Smac	engl. „second mitochondria-derived activator of caspase“
sTNF α	soluble (gelöster) Tumornekrosefaktor α
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRADD	engl. „TNF-receptor-associated death domain“
TRAF2	engl. „TNF receptor-associated factor 2“
TRAIL	engl. „TNF-related apoptosis-inducing ligand“
TRAIL-R	engl. „TNF-related apoptosis-inducing ligand - receptor“
TRPC6	engl. „transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6“ Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UAW	
VDAC	engl. „voltage dependent anion channel“
zVAD-FMK	N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethylketone

1 EINLEITUNG

Solange es unseren Körper durchfließt, leben wir.

Blut und Leben werden als synonyme Begriffe verwendet. Mit Hilfe der Transfusion von Blut wird gefährdetes Leben erhalten. Blut gilt als Symbol für Leben und Tod [1].

Die Theorie der Humoralpathologie entstand vor über 2000 Jahren.

Seit etwa 400 v. Chr. umfasste eine medizinische Schriftensammlung, das Corpus Hippocraticum die wohl bekanntesten Texte über Körpersäfte und Krankheitskonzepte. Aelius Galenus griff im 2. Jahrhundert n. Chr. die Theorie der Humoralpathologie auf und prägte durch Ergänzungen den Begriff der Viersäftelehre.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit werden aktuelle Forschungsergebnisse der roten Blutkörperchen präsentiert. Die Wirkung von zwei klinisch eingesetzten Medikamenten auf humane Erythrozyten, sowie deren programmierter Zelltod sind Hauptthemen dieser Dissertation.

Blut ist eine zirkulierende Flüssigkeit mit einem Zellanteil von etwa 45%, welche essentielle Nährstoffe sowie Proteine, Elektrolyte und Hormone im gesamten Körper verteilt und die Organsysteme versorgt. Zu den zellulären Bestandteilen des Blutes gehören mit dem größten Anteil die roten Blutkörperchen – die Erythrozyten. Die weißen Blutkörperchen – die Leukozyten sind an der Erregerabwehr des Immunsystems beteiligt. Die Blutplättchen – die Thrombozyten sind ebenfalls elementare Bestandteile des Blutes.

Das Blut hat viele Funktionen im Bereich der Gerinnung, bei dem Transport von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Hormonen, sowie dem Gasaustausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Es ist an der Homöostase beteiligt, welche die Temperaturregulation, den osmotischen Druck und ein Puffersystem umfasst. Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Sie beinhalten den roten Blutfarbstoff Hämoglobin, welches

den Sauerstoff, aber auch Kohlendioxid bindet und sind außerdem über die Erhaltung des Puffersystems am Säure-Basen-Haushalt beteiligt.

Der Begriff Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod von kernhaltigen Zellen, welcher über Signalkaskaden gesteuert wird. Apoptose ist ein permanent ablaufender Prozess im menschlichen Körper, welcher von Beginn der Embryonalphase bis ins hohe Lebensalter existiert. Der programmierte Zelltod ermöglicht es dem Körper überalterte, krankhaft mutierte und beschädigte Zellen zu eliminieren und ist demnach ein Prozess zur Funktionserhaltung des Organismus.

Erythrozyten besitzen nach ihrer Ausreifung keinen Zellkern und auch keine Mitochondrien. Dies wären jedoch, wie lange Zeit angenommen, grundlegende Voraussetzungen für die Apoptose. Erst Anfang des 21. Jahrhunderts wurde nachgewiesen, dass Erythrozyten ebenso über einen programmierten Prozess den Zelltod durchlaufen können, trotz Fehlen von Zellkern und Mitochondrien [2, 3]. Der erst seit einigen Jahren geprägte Begriff der Eryptose steht für den programmierten Zelltod der Erythrozyten [4].

Es gibt eine Vielzahl an Substanzen, die den Prozess der Eryptose auslösen [5]. Die meisten werden in der klinischen Behandlung von Patienten eingesetzt, beispielsweise das Antibiotikum Rifampicin [6], das Antimykotikum Amphotericin B [7], die Zytostatika Cisplatin [8], Paclitaxel [9] und Estramustin [10], sowie Lithium [11] und der Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib [12]. Da die Anämie eine häufig vorkommende unerwünschte Nebenwirkung vieler Medikamente ist, beispielsweise von Estramustin [13] und Rifampicin [14], stellt sich die Frage ob weitere Medikamente Auslöser der Eryptose sind, über welche Mechanismen der erythrozytäre Zelltod initiiert wird und ob dieser Prozess inhibierbar wäre. Eine relevante Anzahl von Inhibitoren der Eryptose konnte bis heute identifiziert werden [5], unter anderen das Diuretikum Furosemid [15] und das Antioxidans Resveratrol [16]. Inhibitoren sind vor allem für die klinische Forschung in Bezug auf Anämien bedeutsam. Nicht nur bei der häufig auftretenden Eisenmangelanämie konnte der Mechanismus der Eryptose nachgewiesen werden [17], sondern auch in weit verbreiteten Erkrankungen wie beispielsweise

dem Metabolischen Syndrom [18], dem damit assoziierten Diabetes mellitus [19, 20], sowie bei der Infektionskrankheit Malaria [21, 22].

Diese Dissertationsschrift liefert einleitend einen Überblick der Forschungsergebnisse der Eryptose vergangener Jahre im Vergleich zur Apoptose kernhaltiger Zellen. Das Hauptthema dieser Arbeit ist der Zelltod von Erythrozyten, die dabei stattfindenden Signalkaskaden und die Induktion der Eryptose durch die beiden Medikamente Mitotan und Miltefosin.

1.1 Mitotan

1.1.1 Mitotan: Entwicklung und Indikationen

Das umstrittene Pestizid DDT (Dichlordiphenyltrichlorethane, Clofenotan) entstand durch Entwicklungen in Wissenschaft und Industrie im 19. und 20. Jahrhundert. Schon 1873 wurde die Verbindung entdeckt und in den 1940er Jahren von dem Chemiker P.H. Müller auf dessen biologische Aktivität untersucht [23]. Als Insektizid wurde DDT im 2. Weltkrieg zur Mückenkontrolle in Malariagebieten und später umfangreich in der Landwirtschaft eingesetzt [23, 24].

In den späten 1950er Jahren wurden für medizinische Studien Derivate des Insektizids DDT an Hunden getestet und erstmals eine adrenolytische Aktivität dieser Derivate beschrieben [25]. Das Derivat o,p'-DDD, Mitotan (1,1-dichloro-2-(o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl)ethane oder 2,4'-DDD) wird heute in der medizinischen Patientenbehandlung eingesetzt [26]. Nachgewiesen werden konnte die adrenolytische Aktivität von Mitotan auch im menschlichen Körper von Bergenstal et al. im Jahr 1960 [26, 27].

Mitotan ist das Medikament der Wahl in der als palliativ betrachteten Therapie nicht-resektabler und metastasierter Nebennierenrindenzinome [26]. Das adrenokortikale Karzinom (ACC) ist eine seltene Malignität mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 50% [28].

Bei hormonell inaktiven Tumoren, wird das ACC durch die unspezifische Symptomatik oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, meist nach Metastasierung oder Invasion anliegender Organe [28]. Bei etwa einem Drittel der Patienten liegen hormonaktive ACC's vor, welche sich in einem Cushing-,

Conn-, oder Adrenogenitalen-Syndrom äußern können [29]. Bei diesen Patienten imponieren Symptome durch erhöhte Steroidhormone im Blut, Virilisation oder abdominelle Beschwerden auf Grund der Tumorgröße [30]. Bei einem wachsenden Anteil der Patienten > 15 % wird die Diagnose des ACC's zufällig gestellt [30].

Die operative Resektion (R0) ist momentan die einzig kurative Behandlung für Patienten mit lokalem ACC. Nach dieser vermeintlich radikalen Therapieoption beträgt die Rezidivrate noch immer 50-70%, weshalb eine zeitgleiche systemische Behandlung mit Mitotan empfohlen wird. Mitotan gilt weiterhin als Therapieoption für Patienten mit nicht-resektablem, metastasierendem und rezidivierendem ACC. Es wird auch zunehmend in der adjuvanten Therapie eingesetzt [28]. The adjuvante Mitotantherapie beginnt drei Monate nach der operativen Resektion [31]. Verglichen mit einem späten Therapiebeginn erst nach rezidivierendem Tumorwachstum, konnte gezeigt werden, dass ein früher Beginn der Mitotantherapie nach Tumorausräumung erfolgreicher vor Rezidiven schützte [32] und die mediane tumorfreie Überlebenszeit verlängerte [26]. Mitotan wird routinemäßig in Kombination mit einer Strahlentherapie eingesetzt. *In vitro* Ergebnisse bestätigen, dass Mitotan strahlensensibilisierend wirkt [33].

Es existieren noch viele Kontroversen in Bezug auf Mitotan als adjuvantes Chemotherapeutikum [28]. Momentan werden prospektive randomisierte multizentrische Studien für die adjuvante Mitotantherapie bei niedrigem bis moderatem ACC-Rezidivrisiko durchgeführt (ADIUVO, Efficacy of Adjuvant Mitotane Treatment) [26].

Komplettremissionen sind seltene Ereignisse, jedoch zeigen insgesamt 30% der Patienten einen stabilen Krankheitsverlauf oder partielle Remissionen unter Mitotantherapie [26]. Mitotan wird oral verabreicht unter regelmäßiger Kontrolle des Plasmaspiegels. Der wichtigste prognostische Faktor ist der Plasmaspiegel von Mitotan und seiner Metabolite [34]. Auf Grund toxischer Effekte und Abweichungen der Medikamentenwirksamkeit muss der Plasmaspiegel regelmäßig kontrolliert werden. Der therapeutische Bereich liegt bei einer Plasmakonzentration von 14-20 µg/ml [35]. Begonnen wird die Mitotantherapie mit einer Dosissteigerung von 1,5 g pro Tag auf 6 g proTag innerhalb der

anfänglichen 4-6 Tage [36]. Nach 3 Wochen sollten die Mitotanspiegel im Plasma überprüft und gegebenenfalls Dosisanpassungen vorgenommen werden [36]. Die Maximaldosis beträgt 12 g pro Tag. Etwa die Hälfte der Patienten erreichen den angestrebten therapeutischen Bereich innerhalb von 3 Monaten [36].

In der Veterinärmedizin wird Mitotan in der Therapie des primären und sekundären Cushing-Syndroms eingesetzt. Mitotan vermindert durch seine selektiv zytostatische Wirkung gegenüber der Nebennierenzellen die Cortisolausschüttung [37].

1.1.2 Mitotan: pharmakologische Wirkung und Abbau

Mitotan wirkt adrenolytisch. Die Reduktion der Tumormasse und der adrenalen Hormonsekretion kann unter Mitotanbehandlung bei Vorliegen eines ACC's festgestellt werden [29, 38]. Durch welche molekularen Mechanismen Mitotan seine adrenolytische Aktivität entfaltet, ist momentan noch nicht vollständig geklärt [26].

Die Aktivierung von Mitotan

Mitotan gehört zu einer Gruppe von Medikamenten, welche ihre Wirksamkeit erst nach metabolischer Transformation entfalten und dann als aktive Metabolite vorliegen. Die Metabolite bewirken eine selektive Gewebetoxizität und verursachen oxidative Schäden durch freie Radikalbildung. Dieses trägt zur adrenolytischen Wirkung von Mitotan bei [35, 39, 40].

Mitotan führt zur Zerstörung der Innenzonen der Nebennierenrinde (NNR), und entfaltet seine zytotoxische Wirkung vor allem in der Zona fasciculata und Zona reticularis [38]. Bei Menschen führt die Mitotanbehandlung aufgrund ihrer adrenolytischen Wirkung zu einer Nebennierenrindeninsuffizienz [39].

Wie in *Abbildung 1* dargestellt, wird Mitotan in ein Acetylchlorid transformiert, welches die Zelltoxizität vermittelt. Die Hydroxylierung wird durch ein Cytochrom P₄₅₀ Enzym katalysiert und findet in den Mitochondrien adrenaler Zellen statt, welches die selektiv adrenale Wirkung von Mitotan erklärt. Das entstandene Acetylchlorid bindet kovalent an seine Zielmoleküle. Die Elimination erfolgt renal nach der Umwandlung in ein Essigsäure-Derivat [31, 40].

Tumorzellen besitzen unterschiedliche Fähigkeiten zur Metabolisierung, welches das unterschiedliche Ansprechen auf die Mitotantherapie bei einem ACC erklärt [40].

Durch die metabolische Aktivierung von o,p'-DDD in adrenalen Zellen resultieren die Metabolite o,p'-DDA (1,1-(o,p'-dichlorodiphenyl) acetic acid) und o,p'-DDE (1,1-(o,p'-dichlorodiphenyl)-2,2 dichloroethene). Nach Hydroxylierung von o,p'-DDD steigen vor allem die o,p'-DDA Werte zügig [41, 42].

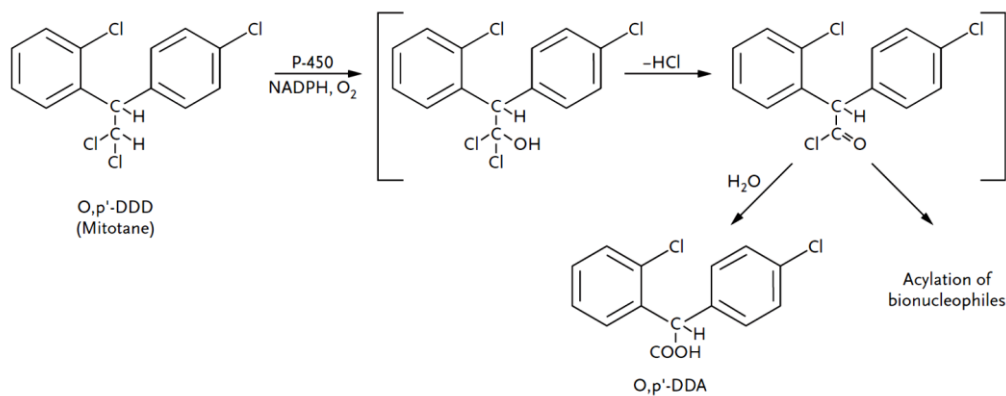


Abbildung 1: Metabolismus von Mitotan in adrenalen Zellen [40]

Transformation in ein Acetylchlorid über Hydroxylierung am β-Kohlenstoff und Dehydrochlorierung. Das Acetylchlorid bindet entweder kovalent an seine Zielmoleküle oder wird in den Metabolit o,p'-DDA (1,1-(o,p'-dichlorodiphenyl) acetic acid) umgewandelt. O,p'-DDA ist ein Essigsäure-Derivat und kann renal ausgeschieden werden [40].

Die Wirkung von Mitotan auf Mitochondrien

Steigende Mitotan-Konzentrationen führen zu intrazellulärer Akkumulation [43]. Mitotan beeinflusst die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette durch die Schädigung des Komplex IV, der Cytochrom-C-Oxidase in menschlichen Nebennierenrindenzellen. In den Mitochondrien adrenaler Zellen binden umgewandelte aktive Metaboliten des o,p'-DDD als direkte Inhibitoren kovalent an mitochondriale Proteine des Komplex IV der Atmungskette [26, 31]. Des Weiteren werden diverse Untereinheiten des Komplex IV indirekt über eine Verminderung der mRNA-Expression und folglich der Proteinsynthese gehemmt [31].

Untersuchungen verschiedener ACC-Zelllinien unter Einwirkung von Mitotan ergaben eine Aktivitätszunahme der Caspase-3 und -7. Mit der Aktivierung dieser

proapoptotischen Effektorcaspasen konnte eine Hemmung der Tumorzellproliferation beobachtet werden [43, 44]. Es wird angenommen, dass die zytotoxische Mitotan-Wirkung gegenüber Tumorzellen hauptsächlich auf die Induktion der Apoptose nach Schädigung der Mitochondrien zurückzuführen ist. Zusätzlich konnte unter therapeutischen Konzentrationen nicht nur die mitochondriale Destruktion sondern auch die verminderte Steroidproduktion und -sekretion gemessen werden [31]. Die mitochondrialen Veränderungen sind durch Schwellung mit nachfolgender Depolarisation der Mitochondrienmembran gekennzeichnet. Das Resultat ist der Untergang des Zellorganells [43]. Nach mitochondrialer Schädigung in ACC-Zellen konnte eine Expressionsminderung des membranständigen VDAC1-Kanals festgestellt werden, welcher eine wichtige Rolle in der mitochondrial vermittelten Apoptose spielt [43]. Die verminderte Expression von VDAC1 hemmt das Tumorzellwachstum *in vitro* [43].

Mitotan und endokrine Störungen

Schon ab der therapeutischen Wirksamkeitsschwelle, einer Plasmakonzentration von 14 µg/ml Mitotan, ist die Sekretion von Cortisol und 17-Hydroxy-(OH)-progesteron um 70% reduziert [31]. Die Wirkung von Mitotan führt zu einer Nebennierenrindeninsuffizienz sowie zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von freiem Cortisol über drei Hauptmechanismen, welche teilweise in ACC-Patienten nachgewiesen werden konnten.

1. Mitotan inhibiert die Genexpressionen einiger Steroidhormonenzyme, der Cytochrom P₄₅₀ (CYP) Enzymfamilie. Betroffen sind die Enzyme CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2 sowie CYP17A1 welche unter anderen an der adrenalen Steroidsynthese beteiligt sind [26, 31, 35, 44, 45].
2. Mitotan ist ein Induktor des Enzyms CYP3A4 und führt zu verstärktem Abbau von Cortisol [46].
3. Mitotan aktiviert das Cortisol-bindende Globulin (CBG) [26].

Unter Mitotan-Einwirkung lag auch die Steroidhormonvorstufe (DHEA-S) im Kulturmedium in verringerter Konzentration vor [44]. Weiterhin inhibiert Mitotan

die Expression des Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1)-Gens, welches als Zytokin an der Regulation der Zellproliferation und Apoptose beteiligt ist [44].

Die Pharmakokinetik von Mitotan

Nach Resorption im Gastrointestinaltrakt beträgt die biologische Verfügbarkeit von Mitotan ca. 40% [26]. Es erfolgt eine erhebliche Anreicherung im Fettgewebe. Nach der täglichen Mitotan-Dosis von 5 bis 15 g pro Tag, reichen die Plasmaspiegel von 0 bis 90 μ g/ml [26]. Essentiell für die Behandlung ist das Erreichen der therapeutischen Plasmakonzentration von 14-20 μ g/ml, welches durch die orale Gabe, eine langsame Absorption und die lipophilen Eigenschaften von Mitotan erschwert sein kann [42]. Auch ACC-Zellen, in welchen die Mitotan-Metabolisierung eingeschränkt ist, können die Wirkung der Therapie beeinträchtigen [27].

Insgesamt ist die Verwaltung der Mitotantherapie mit dem Einhalten der therapeutischen Plasmaspiegel komplex und erfordert Erfahrung [26].

Da Mitotan im Fettgewebe akkumuliert, kann die Plasma-Eliminationshalbwertszeit mehrere Monate betragen (18 bis 159 Tage). Es kann folglich Monate dauern bis eine Abnahme der Plasmaspiegel nach dem Absetzen von Mitotan eintritt [47].

1.1.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) von Mitotan

Die Verabreichung von Mitotan kann zu Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und zur reduzierten Wirksamkeit von Medikamenten führen, die über Cytochrom P₄₅₀ 3A4 (CYP3A4) metabolisiert werden. Wie DDT ist auch das strukturverwandte Mitotan ein potenter Induktor des Enzyms CYP3A4. Es konnte nach gleichzeitiger Gabe von Mitotan und Medikamenten, die über CYP3A4 metabolisiert werden ein verstärkter Abbau dieser Substanzen beobachtet werden [46, 47].

Mitotan vermindert nicht nur die Produktion von Cortisol, es erhöht zusätzlich die metabolische Clearance von Glukokortikoiden, beispielsweise Hydrocortison, welches als Substitution unter Mitotantherapie gegeben wird. Eine

unzureichende Glucokortikoid-Substitution erhöht die Nebenwirkungen von Mitotan [39, 48].

Mitotan besitzt eine kleine therapeutische Breite. Unerwünschte Nebenwirkungen kommen bei über 80% der Patienten vor und sind oft dosis-limitierend [26]. Häufig sind gastrointestinale Nebenwirkungen wie beispielsweise Übelkeit und Diarrhöe [26]. Außerdem treten vielfach neurologische Beschwerden auf, mit einem Spektrum von leichter geistiger Verlangsamung bis zu schwerer Lethargie. Bei oralen Dosisgaben von mehr als 20 g mit Überschreitung der angegebenen therapeutischen Breite von $>20 \mu\text{g/ml}$ kommt es regelmäßig zu neurologischen Beeinträchtigungen, die das zentrale Nervensystem betreffen [26, 35]. Diese sind bei rückläufigen Plasmaspiegeln reversibel. Ein Antidot ist nicht bekannt. Mitotan kann durch seine Lipophilie auch nicht mittels Hämodialyse entfernt werden [26, 35].

Häufig sind abweichende Laborparameter wie Hypertriglyceridämien und Anämien. Leukopenien, Thrombozytopenien und Hypercholesterinämien können auch beobachtet werden [35]. Die durch Mitotan ausgelöste Anämie könnte ein Anzeichen für den verstärkten Zelltod von Erythrozyten sein.

Zusätzlich bewirkt Mitotan einen Anstieg der Serumkonzentration von Cortisol-, Sexualhormon- und Thyroxin-bindenden Globulinen, wodurch sich die freien Cortisol-, Testosteron- und Thyroxin (FT4)-Spiegel verringern [48].

1.2 Miltefosin

1.2.1 Die Entwicklung des Medikaments Miltefosin

In den frühen 1980er Jahren wurden gleichzeitig, jedoch unabhängig voneinander die antineoplastischen Effekte sowie die Wirkung gegen protozoische Parasiten des Medikaments Miltefosin entdeckt [49, 50].

Die Substanz Miltefosin, wurde zufällig zeitgleich durch zwei verschiedene Forschungsgruppen synthetisiert, welche beide Analoga des natürlichen Etherlipids, des sogenannten plättchenaktivierenden Faktors (PAF) testeten [50, 51]. Es wurde entdeckt, dass Miltefosin eine antikarzinogene Wirkung besitzt [52].

Trotz des ausgezeichneten Wirkungsprofils von Miltefosin gegen Trypanosomatida zu welcher auch die Gattung der Leishmanien gehört, wurde der Schwerpunkt der Anwendung auf die topische Behandlung von Hautmetastasen des gestreuten Mammakarzinoms ausgelegt [53]. Diverse Studien unter oraler Gabe von Miltefosin gegen unterschiedliche Tumorarten mussten auf Grund gastrointestinaler Nebenwirkungen abgebrochen werden [54]. Jedoch führten schließlich mehrere erfolgreiche Phase II und III-Studien in Indien zur Zulassung von Miltefosin im Jahr 2002. Die Zulassung betraf die Behandlung aller Arten von Leishmaniose-Infektionen [50, 55]. Momentan ist die klinische Erprobung von Miltefosin als Monotherapie oder als Teil verschiedener Kombinationstherapien noch nicht abgeschlossen und wird in kontrollierten Studien in endemischen Gebieten getestet [50]. Die Behandlung der viszeralen und kutanen Leishmaniose (CL) gestaltet sich als kompliziert, da die Effizienz der Medikamente von dem jeweilig geographisch vorherrschenden Erregertypen abhängt. Die Therapie sollte deshalb individuell in jedem Endemiegebiet erprobt und bewertet werden [50].

1.2.2 Klinische Indikationen

Miltefosin wird in der klinischen Behandlung gegen Pilzbefall, pathogene Bakterien und Parasiten, sowie in der Tumorthherapie eingesetzt. Es ist das einzig oral wirksame Medikament gegen Leishmaniose [50, 56].

Die Leishmaniose ist eine weit verbreitete Infektionskrankheit, welche hauptsächlich in subtropischen und tropischen Klimaregionen vorkommt. Die Protozoen werden von Sandmücken übertragen, von welchen einige Arten im mitteleuropäischen Raum leben [57, 58]. Die meisten Fälle treten jedoch auf dem indischen Subkontinent, in Brasilien und in einigen arabischen Ländern Vorderasiens auf [59].

Es gibt verschiedene Arten der Leishmaniose mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung. Die viszerale Leishmaniose (VL), auch Kala-Azar oder schwarzes Fieber genannt, ist die schwerste Form des Krankheitsbildes, welche unbehandelt letal enden kann [50]. Typisch für die kutane Leishmaniose (CL) sind Hautläsionen, welche auch unter den Namen Orient- oder Aleppo-Beule bekannt sind. Die mukokutane Leishmaniose befällt die Nasen-Rachen-Schleimhaut und imponiert durch destruierende Gewebeläsionen [50].

Weitere Erfolge in der Behandlung mit Miltefosin konnten für Patienten mit Leishmaniose und HIV-Koinfektion erzielt werden [60].

Aktuellen Forschungsergebnissen entsprechend zählt die Hemmung der Mastzellaktivierung zum Wirkungsspektrum von Miltefosin. Die Substanz könnte auch in der Behandlung von mastzellvermittelten Krankheiten wie Urtikaria, Mastozytose und atopischer Dermatitis klinische Bedeutsamkeit erlangen [61].

Miltefosin besitzt ein hohes antikarzinogenes Potential und wurde ursprünglich für den Einsatz als Zytostatikum entwickelt. Es wirkt effektiv bei der topischen Anwendung gegen Hautmetastasen nach metastasiertem Mammakarzinom [62]. Dieses Ergebnis konnte in nachfolgenden Phase-II-Studien belegt werden [63], wie ebenso eine Wirksamkeit der lokalen Behandlung von kutanen Lymphomen [64]. Die Apoptose wird durch den antineoplastischen Effekt von Miltefosin initiiert [56].

1.2.3 Biochemie und Pharmakokinetik von Miltefosin

Das Phosphocholin-Derivat Miltefosin mit chemischem Namen Hexadecylphosphocholin (HePC) gehört zur Familie der Alkylphosphocholine (ALP). ALPs sind Phosphocholinester aliphatischer langkettiger Alkohole mit unterschiedlicher Kettenlänge und unterscheiden sich durch das Fehlen der Glycerineinheit von Alkylglycerinphosphocholinen [60, 65].

Synthetische Alkylphosphocholine (ALP), werden als Untergruppe der strukturverwandten Antitumor-Lipide (ATL) eingeordnet. Zu den ATL werden außer synthetischen ALPs und Antitumor-Etherlipiden noch die natürlichen Etherlipide, wie PAF gezählt [51].

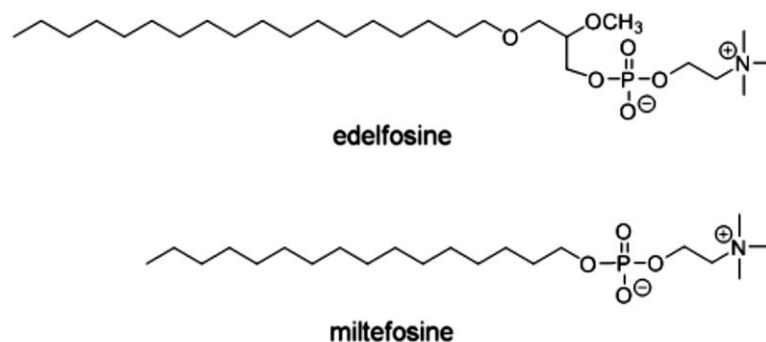


Abbildung 2: Chemische Struktur von Miltefosin [66]

Miltefosin ist eine amphiphile, zwitterionische Verbindung. Es besteht aus einer positiv geladenen quartären Aminogruppe, einer negativ geladenen Phosphorylgruppe, sowie einem apolaren Alkylrests [50]. Miltefosin unterscheidet sich von den anderen Alkylphospholipiden durch das Fehlen der Glycerineinheit [67].

ALPs, wie Miltefosin reagieren an der Zellmembran. Sie zielen selektiv auf proliferierende Zellen, induzieren Wachstumsarrest und Apoptose, und sensibilisieren diese Zellen gegenüber konventioneller Chemo- und Strahlentherapie [67]. Aufgrund ihrer chemischen Struktur mit einer langen apolaren Kohlenwasserstoffkette gelangen sie leicht in die Lipidschicht der Plasmamembran. Miltefosin dringt in die Außenmembran der Zelle und überquert dann die gesamte Plasmamembran durch Aktivierung des ATP-abhängigen Flippasekomplexes oder durch Endozytose cholesterinreicher Membranabschnitte [50]. ALPs sind resistent gegen katabolen Abbau, reichern sich in der Zelle an und stören lipidabhängige Überlebenssignalwege [50].

Miltefosin wirkt gegen Leishmanien und neoplastische Zellen. In Makrophagen, dem Vermehrungsort der Leishmanien, hemmt es parasitäre Enzyme die an der Neubildung von Lipiden der Leishmanienmembran beteiligt sind [50].

In *Abbildung 3* sind die Hauptmechanismen, über die Miltefosin sowohl gegen Leishmanien als auch gegen Tumorzellen wirkt, dargestellt. Sie beinhalten die Hemmung der de novo Biosynthese des Membranlipids Phosphatidylcholin (PC) und die Induktion der Apoptose durch Hemmung des PI3-K/Akt Signalwegs durch Miltefosin [50]. Durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) wird Akt, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, aktiviert. Die PKB vermittelt sonst Überlebens-, Proliferations- und Wachstumssignale [50, 67, 68] und wirkt antiapoptotisch in der Regulation des suizidalen Zelltodes [69].

Zusätzlich inhibiert Miltefosin den MAP-Kinase Signalweg über welchen Phosphorylierungsreaktionen der Zellwachstums- und Regulationsvorgänge gesteuert werden. Gleichzeitig stimuliert Miltefosin die stress-aktivierte Phosphokinase (SAPK) [56, 67].

Aus der Störung des Phospholipidmetabolismus mit Membrandestruktion, der Inhibition von Überlebenssignalen und der Induktion proapoptotischer Signale resultiert eine zelluläre Dysregulation von Wachstumssignalen mit verstärkter Apoptose [50].

In immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinien (HaCaT) *in vitro* konnte die verstärkte Bildung des proapoptotischen Moleküls Ceramid nachgewiesen werden. In Anwesenheit eines Hexadecylphosphocholins, wie Miltefosin, wurde durch die Hemmung der Sphingomyelinsynthese eine Anreicherung von intrazellulärem Ceramid beobachtet [70]. Die antiproliferative Wirkung von Hexadecylphosphocholinen konnte in Experimenten mit verschiedenen Tumorzellen [71] gezeigt werden [70].

Außerdem wird angenommen, dass ALPs durch ihre Analogie zu Phospholipiden mit natürlichen Substraten konkurrieren. Alkylphospholipide greifen in die Regulation der Proteinkinase C ein [72]. Durch die Modulation der Aktivierung von Proteinkinase C kann das Zellwachstum inaktiviert werden [72]. In Experimenten mit den Zelllinien HL60 (Humane promyelozytische Leukämiezellen) und K562 (Humane immortalisierte myeloische

Leukämiezellen) konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Miltefosin eine Reduktion der membrangebundenen und zytosolischen Proteinkinase C Aktivität bewirkt [73]. Miltefosin inhibiert die Proteinkinase C Aktivität in Leishmanien und *Trypanosoma cruzi* [74]. Die Aktivierung von Proteinkinase C führt in Erythrozyten zum suizidalen Zelluntergang [75].

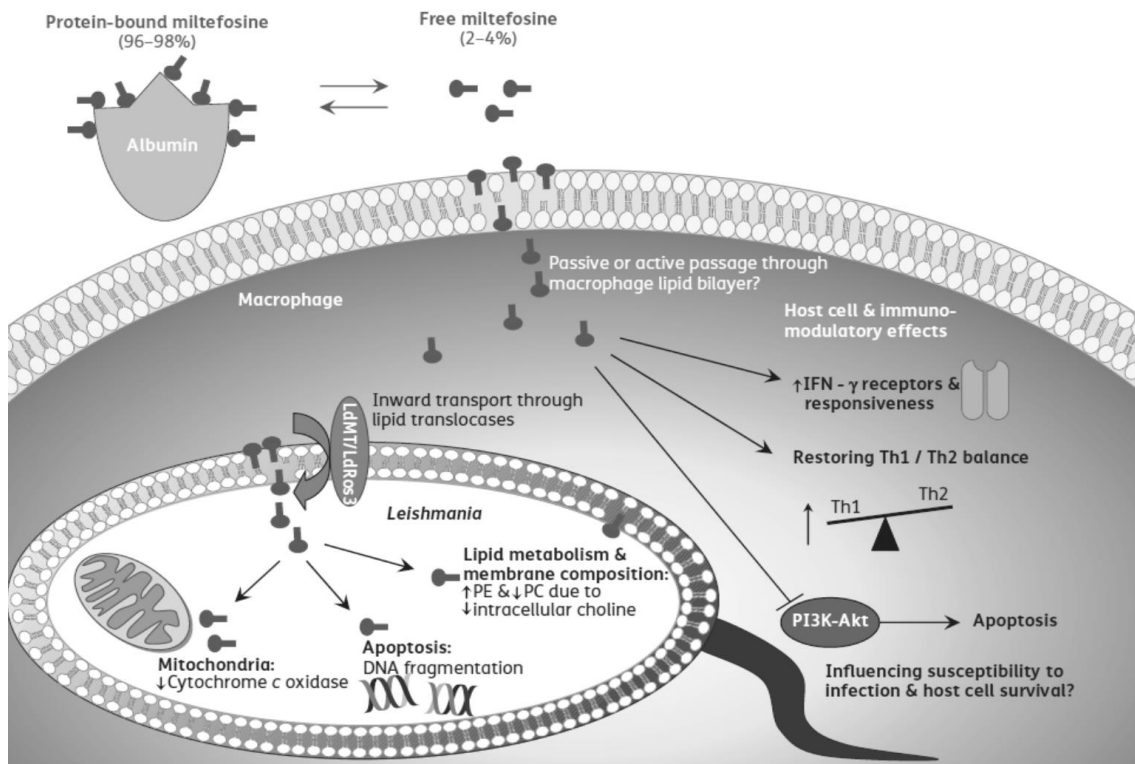


Abbildung 3: Antiparasitäre Mechanismen von Miltefosin [50]

Miltefosin wirkt gegen intrazelluläre Parasiten. Nach Eintritt in die Zelle, hier eine Makrophage, führt Miltefosin zum Untergang von Leishmanien über die Störung des Lipidmetabolismus und Apoptoseinduktion. Miltefosin induziert Apoptose ebenfalls in körpereigenen Zellen über die Hemmung des PI3K-Akt Überlebenssignalwegs. [50]

Zellmembranbestandteile: PC: Phosphatidylcholin PE: Phosphatidylethanolamid

Miltefosin zeichnet sich durch einen langsamen Abbau in vivo und seine lange Halbwertszeit von etwa 150 – 200 Stunden aus [76, 77]. Die, in Studien nachgewiesene, empfohlene Dosis beträgt 2,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag über 28 Tage als Standardtherapie der Leishmaniose, mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber den verschiedenen Leishmanienarten [60]. Während der Einnahme kommt es zu einer starken Akkumulation des Medikaments [50].

Abhängig von der Tagesdosis und dem individuellen Körpergewicht wird die maximale Konzentration im Steady-State in der letzten Behandlungswoche, also erst nach etwa 3 Wochen, erreicht. Bei Einnahme von 150 mg Miltefosin über 28 Tage beträgt der Plasmaspiegel in der letzten Woche im Mittelwert 30,8 µg/ml (n=22) [78].

Nach oraler Gabe erfolgt eine langsame Absorption im Darm. Die absolute Bioverfügbarkeit konnte auf Grund starker akuter Hämolyse nach intravenöser (i.v.) Gabe nicht bestimmt werden [50]. Maximale Wirkspiegel werden zwischen 4 - 48 Stunden nach Einnahme erreicht [60, 79]. Die Plasmaproteinbindung an Albumin und Lipoproteine beträgt etwa 96 % - 98 % [50, 80].

Das pharmakokinetische Modell der Distribution entspricht einem offenen Zwei-Kompartimente-System. Radioaktiv markiertes Miltefosin konnte in hoher Konzentration in der Niere, Darmschleimhaut, Leber und Milz nachgewiesen werden [54, 60]. Die langsame Metabolisierung von Miltefosin verläuft zu einem geringen Teil über Phospholipase C. Der Großteil der Metabolisierung von Miltefosin läuft über Phospholipase D, welches mit Miltefosin interagiert. Es entsteht Cholin, welches für die weitere Acetylcholin- und Lecithin-Synthese genutzt werden kann [50, 54].

Auch die lange Lipidkette von Miltefosin kann zellulär weiterverwertet werden [54]. Es gibt keinen Nachweis für den Abbau von Miltefosin über das Enzymsystem Cytochrom P₄₅₀. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt etwa 7 Tage. Im Zwei-Kompartimente-Modell manifestiert sich eine terminale Halbwertszeit von etwa 31 Tagen. [81]

Der langsame Abbau und die Wiederverwertung der Bestandteile von Miltefosin, nach enzymatischer Zerlegung durch Phospholipasen, erklärt den äußerst geringen Wert von <0,2 %, der von der Gesamtmenge an Miltefosin über den Urin ausgeschieden wird [50].

1.2.4 Nebenwirkungen der Miltefosin-Behandlung

Nach oraler Behandlung mit Miltefosin konnten gastrointestinale Störungen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall als häufige Nebenwirkungen festgestellt werden [51, 54].

Wegen der dosis-limitierenden gastrointestinalen Toxizität und folglich unzureichender Wirksamkeit wurde die weitere klinische Entwicklung von Miltefosin für die orale Behandlung bestimmter Tumorarten eingestellt [67, 72].

Weiterhin konnte bei Überdosierung eine Erhöhung der Transaminasen, sowie des Serumkreatinins festgestellt werden. Diese Nebenwirkungen waren jedoch mild und nach Dosisreduktion reversibel [54, 60]. Selten kommt es zum Steven-Johnson-Syndrom [82], einer medikamenten-assoziierten überschießenden Immunreaktion mit schmerzhaften Hautablösungen, Ulzerationen und Fieber, welche bis zum Tod führen kann.

Bei Krebspatienten stieg unter der Therapie mit Miltefosin der Blutwert der neutrophilen Leukozyten und der Thrombozyten. Dies ist für Patienten mit viszeraler Leishmaniose von Vorteil, da diese häufig unter einer Panzytopenie leiden [60].

Miltefosin kann auf Grund seiner ausgeprägten hämolytischen Aktivität nicht i.v. appliziert werden. Deshalb wird nach strukturähnlichen Alternativsubstanzen gesucht [72]. Die Daten dieser Doktorarbeit konnten nicht nur die hämolytische Aktivität, sondern auch den programmierten Zelltod von Erythrozyten nach Einwirkung von Miltefosin *in vitro* nachweisen [56].

Da ein embryotoxisches und teratogenes Risiko in Tierversuchen beschrieben wurde, sollte eine kontrazeptive Behandlung nach Miltefosin-Therapie für mindestens 5 Monate weitergeführt werden [60, 83].

1.3 Die Apoptose

1.3.1 Bedeutung der Apoptose

Der Körper eines erwachsenen Menschen setzt sich aus etwa 10^{14} Zellen zusammen. Fast 1 Millionen Zellen werden pro Sekunde durch den programmierten Suizid - die Apoptose - eliminiert [84]. Das Absterben unbrauchbarer, überalterter und schädlicher Körperzellen wird durch die tägliche Proliferation einiger Milliarden Zellen kompensiert. Der Zusammenhang zwischen programmiertem Zelltod und Zellproliferation ist die Voraussetzung für den Entwurf und Erhalt von Organfunktionen im Körper [85, 86].

Der physiologische Prozess des Zellsterbens ist ein bedeutender Regulationsmechanismus von Anbeginn der Embryogenese [87] bis ins hohe Alter und somit unentbehrlich für das Leben mehrzelliger Organismen [84]. In der Ontogenese diverser Organe ist die Apoptose an der Gestaltung beteiligt, es werden Zellen produziert und später wieder entfernt, dadurch wird funktionsfähiges Gewebe erschaffen [88, 89]. Ein Beispiel hierfür ist die Entfernung durch programmierten Zelltod der Zellen des Müllergangs bei Männern und die Beseitigung des Wolff-Gangs bei Frauen [89]. Ebenso sind an der Bildung und Regulation des neuronalen Netzwerks apoptotische Prozesse beteiligt [90] oder an der Entfernung des Interdigitalgewebes, welche zur Trennung der einzelnen Finger führt [87]. In den betroffenen Gebieten beseitigen Makrophagen die Zellreste nach verstärktem Zelluntergang [87].

Auch im Zusammenhang mit der Keimzellreifung ist die Apoptose von großer Bedeutung. Der Prozess des programmierten Zelltods konnte in bestimmten Stadien der Spermatogenese nachgewiesen werden. Die Auswirkung durch die Weitergabe fehlerhaften Erbguts wäre hierbei besonders gravierend. Im Ejakulat unfruchtbarer Männer konnte eine ungewöhnlich hohe Apoptoserate festgestellt werden [91].

Der programmierte Zelltod ist außerdem von großer Bedeutung bei der Ausbildung des Immunsystems. Autoreaktive B- und T-Zellen werden noch im unreifen Zustand mittels Apoptose eliminiert [92-94]. Auch für die körpereigene Virusabwehr wird der Mechanismus der Apoptose genutzt. Das altruistische Zellsterben hemmt in den betroffenen Zellen die virale Replikation [84]. Nicht nur

infizierte Zellen, sondern auch durch chemische und physikalische Mutagene, z.B. Strahlung, beschädigte Zellen werden mit Hilfe der Apoptose entfernt.

Apoptose ist an der körpereigenen Qualitätskontrolle und diversen Reparaturmechanismen beteiligt, welche genetische Entwicklungsfehler kompensieren. Eine zelluläre Fehlprogrammierung, kann zu einem Funktionsverlust führen. Folgt das Ausbleiben trophischer Überlebenssignale kommt es zur konsequenten Aktivierung der Autozerstörungsmechanismen [89].

Viele Krankheiten stehen im Zusammenhang mit Fehlregulationen der Apoptose, beispielsweise die hämatopoetischen Krankheitsbilder des Myelodysplastischen Syndroms [95] und der Aplastischen Anämie [96].

Eine reduzierte Apoptose findet sich bei Autoimmunerkrankungen, sowie Rheumatischen Krankheiten, z.B. dem Lupus erythematoses [97]. Ist die Elimination proliferierender Zellen über mehrere Zellgenerationen beeinträchtigt, können bösartige Neoplasien entstehen [98]. Der Tumorsuppressor p53, welcher bei DNA-Defekten Apoptose auslöst und Bax, ein pro-apoptotisches Molekül mit der Funktion die mitochondriale Membranintegrität zu stören, sind beide häufig in malignen Neoplasien mutiert. Anti-apoptotische Proteine wie beispielsweise Bcl-2 können in einigen Lymphomen verändert vorliegen [97]. Kenntnisse über die Wirkungsweisen von Bcl-2 und anderen an der Apoptose beteiligten Molekülen, sind bei der Entwicklung von Medikamenten hilfreich [99]. Neue Therapieoptionen der Apoptoseregulation sind von außerordentlicher Bedeutung [100].

1.3.2 Apoptose: Überblick und beteiligte Moleküle

Nach den morphologischen Erkenntnissen des Zelltods lag das Interesse der Forschung in den letzten Jahrzehnten auf den molekularen Signalwegen der Apoptose. Sie lässt sich in verschiedene Abschnitte gliedern (nach [99, 101]).

1. Initiationsphase
 - a) Extrinsischer Weg
 - b) Intrinsischer Weg
 - c) stressinduzierter ER-Weg (ER = Endoplasmatisches Retikulum)
2. Effektor- oder Exekutionsphase
3. zellulärer Abbau

Die Apoptose ist ein streng regulierter Vorgang, bei dem durch extrazelluläre Stimuli intrazelluläre Signalkaskaden initiiert werden. Jeder Apoptoseweg benötigt funktionierende Caspasen, jedoch werden diese jeweils auf unterschiedliche Weise aktiviert. Der intrinsische Initiationsweg beinhaltet als wichtige Regulationsbestandteile die Proteine der Bcl-2 Familie [99]. Die für die Apoptose relevanten Bcl-2 Proteine sind in der Mitochondrienmembran lokalisiert und sind an der Regulation der Cytochrom C Freisetzung beteiligt, welche eine entscheidende Rolle im Verlauf des intrinsischen Weges einnimmt. Der extrinsische Signalweg wird über eine Ligand-Rezeptor-Interaktion eingeleitet. Sie gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und werden auch Todesrezeptoren (Fas, TNF-R1) genannt.

1.3.2.1 Die Caspasen

Caspasen sind an diversen Mechanismen des menschlichen Körpers beteiligt. Ihr Name setzt sich aus der Funktion zusammen - **C**ystein-**A**spartat **s**pezifische **P**rotease: Sie gehören zur Familie der Cysteinproteasen und schneiden Proteine hinter der Aminosäure Aspartat [102]. Caspasen sind beispielsweise an Entzündungsreaktionen [103] sowie an der Zellreifung von Erythrozyten [104] beteiligt.

Caspasen stehen als inaktivierte Proenzyme (Zymogene) zur Verfügung, bis sie aktiviert werden [105]. Die Aktivierung der Procaspasen zu Caspasen erfolgt durch limitierte Proteolyse [106].

Die relevanten Caspasen der Apoptose lassen sich in Initiator- und Effektorcaspasen einteilen. Initiatorcaspasen aktivieren die Effektorcaspasen, diese lösen die benötigte Signalkaskade der Apoptose aus. Die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 bauen nach ihrer Aktivierung intrazelluläre Polypeptide, Strukturelemente des Zytoplasmas und des Zellkerns ab. Sie zerlegen zelluläre und nukleäre Proteine wie z.B. PARP (poly-ADP-Ribose-Polymerase) oder auch Bcl-2 [107-109].

Tabelle 1: Übersicht der Caspasen mit Aufteilung in Unterfamilien und Funktion [109]

Unterfamilie	Funktion	Caspasen (CASP)
I	Apoptose: Initiation	2, 8, 9, 10
II	Apoptose: Exekution	3, 6, 7
III	Inflammationssignal	1, 4, 5, 11-14

Initiatorcaspasen können über zwei Signalwege aktiviert werden (nach [109]):

- 1) über den Todesligand-Rezeptor vermittelten Weg – den extrinsischen Weg,
- 2) über den stressinduzierten mitochondrialen Weg – den intrinsischen Signalweg

1.3.3 Apoptose: Verlauf und Regulation der Signalkaskaden

1.3.3.1 Der extrinsische Apoptoseweg

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Liganden ausgelöst. Sie binden an verschiedene transmembranständige Proteine, sogenannte Todesrezeptoren (death receptors: DR) der Superfamilie der Tumornekrosefaktor Rezeptoren (TNFR) [110].

Welche intrazelluläre Signalkaskade abläuft, wird durch den Ligandentyp bestimmt [111]. Einige Rezeptoren können je nach Ligand nicht nur Signale für

den Zelluntergang empfangen, sondern zusätzlich Überlebenssignale verarbeiten.

Ein Beispiel für diese Doppelfunktion ist der TNFR1. Bindet der Ligand mTNF α an TNFR1 folgt typischer Weise der Zelluntergang. Wird TNFR1 durch den Liganden sTNF α aktiviert, folgen inflammatorische Signale für den IKK/NF- κ B Überlebensweg [112].

Die Todesliganden FasL und TRAIL sind an Entzündungsreaktionen beteiligt und sitzen als Transmembranproteine an der Zelloberfläche von Immunzellen. Sie werden durch proinflammatorische Substanzen stimuliert [113].

Tabelle 2: Einteilung der TNF-Rezeptoren mit zugehörigen Liganden nach Funktion [114]

<i>Todesrezeptoren (DR)</i> - direkte Apoptoseinduktion	<i>Todesrezeptoren (DR)</i> - indirekte Apoptoseinduktion (Überlebenssignalweitergabe)
DR2: FasR/CD95/Apo1, - Ligand: FasL/CD95L/Apo1L	DR1: TNFR1/p55, - Ligand: TNF α
DR4: TRAIL-R1/Apo2, - Ligand: TRAIL/Apo2L DR5: TRAIL-R2/Apo2, - Ligand: TRAIL/Apo2L	DR3: Apo3, - Ligand: Apo3L DR6 EDA-R

Direkte Apoptoseinduktion

Die Ligandenbindungen an die reinen Todesrezeptoren der FasR, DR4 und DR5 initiieren Signalkaskaden, die zum Untergang der Zelle über einen „death-inducing signal complex“ (DISC) führen [115]

Nach spezifischer Ligandenbindung von beispielsweise FasL an den FasR, wird der extrinsische Apoptoseweg durch Trimerisierung der Rezeptoren eingeleitet, während nun Adaptermoleküle binden können. Intrazellulär wird DISC formiert, welcher sich aus dem Adapterprotein „fas-associated death domain“ (FADD) mit integrierter Todesdomäne und angelagerter Initiatorcaspasen-8 und -10

zusammensetzt, des Weiteren kann das apoptose-regulierende Protein c-FLIP (FLICE-inhibierendes Protein) binden [114, 115].

Indirekte Apoptoseinduktion

Der TNFR1 Weg, welcher wie oben beschrieben Überlebenssignale vermitteln kann, aktiviert die apoptotische Signalkaskade indirekt, da hierbei nicht nur ein Todeskomplex, sondern ein zweiter, zytoplasmatischer Signalkomplex benötigt wird. Der initial membrangebundene Komplex 1 wird von der Bindung des Liganden TNF α aktiviert und besteht aus dem Rezeptor TNFR1, einem Adapterprotein „TNF-receptor-associated death domain“ (TRADD) und den Kinasen RIP-K1 und TRAF2, sowie schnell vermittelnden Signalstoffen, die den Überlebensweg NF- κ B aktivieren können [116].

Dieser Komplex 1 kann sich vom Rezeptor lösen und sich ins Zytosol verlagern, wobei der zytoplasmatische Komplex 2 durch Anlagerung von FADD, Procaspase-8, -10 und c-FLIP geformt wird [116].

Die aktivierte Procaspase-8 leitet im Weiteren die Exekutionsphase ein.

Ist jedoch die schützende Signalkaskade von NF- κ B durch Komplex 1 aktiviert, wird die Caspase 8 durch das inhibierende Protein c-FLIP des Komplex 2 gehemmt und die Zelle überlebt [116].

Die TNFR1 vermittelte Signaltransduktion beinhaltet somit einen Kontrollschritt, wobei der Zelltod über Komplex 2 nur dann eintritt, wenn das initiale Signal fehlschlägt über Komplex 1 den NF- κ B Weg zu aktivieren [116]. Der NF- κ B Weg kann durch bestimmte antibiotische Proteinbiosyntheseinhibitoren, DNA-Schäden sowie durch zelluläre apoptotische Inhibitionsproteine gehemmt werden [117].

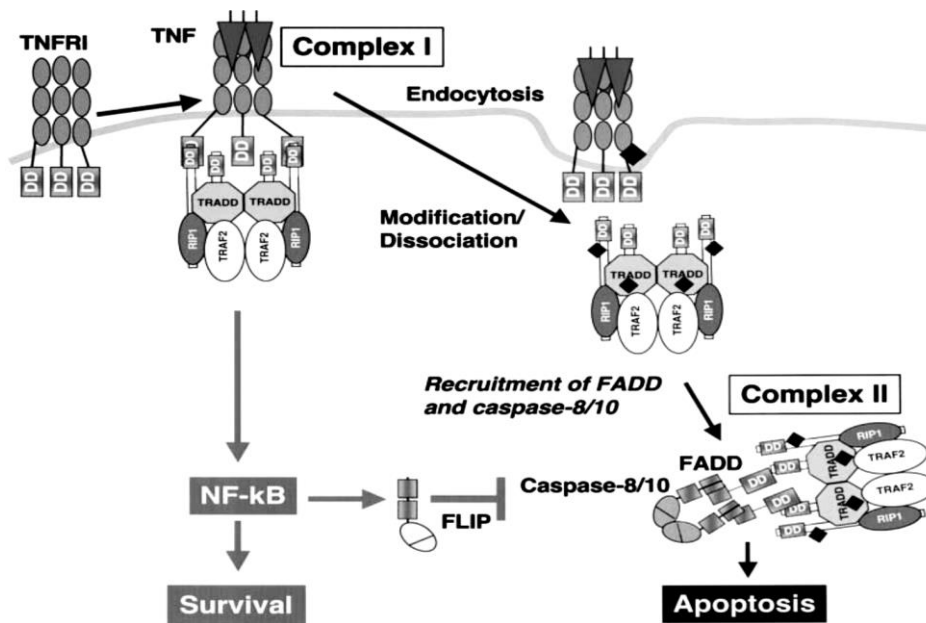


Abbildung 4: Modell der TNFR1-vermittelten Apoptose [116]

Nach Ligandenbindung von TNF an TNFR1 kommt es zur Bildung des Komplex 1 (TRADD, RIP1, TRAF2). Der Komplex 1 transloziert ins Zytosol und bindet mit den freien Todesdomänen (DD) an FADD. Caspase-8/-10 werden rekrutiert. Ist die Bildung des zytosolischen Komplex 2 abgeschlossen, kommt es zur Apoptose. Ist jedoch der NF-κB aktiviert kann cFLIP (cellular FLIP) die Apoptose inhibieren und die Zelle überlebt [116].

Caspase-8

Konzentration und Aktivität der Caspase-8 sind für die nachfolgende apoptotische Signalkaskade von Bedeutung, unabhängig davon welcher Todesrezeptor aktiviert wurde, gibt es zwei unterschiedliche Signalwege.

Ist die Caspase-8 ausreichend aktiviert, werden die Effektor-Procaspasen-3, -6 und -7 mitochondrien-unabhängig mittels limitierter Proteolyse aktiviert. Ist jedoch die Caspase-8 Aktivität gering müssen über den mitochondrialen Weg ausreichend aktive Effectorcaspasen rekrutiert werden. Hierbei wird die Funktion des proapoptischen Proteins Bid, welches zur Bcl-2-Familie gehört, genutzt. Bid triggert die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran und die Aktivierung der Effectorcaspasen des intrazellulären Apoptosewegs [111, 118, 119].

Die niedrige Aktivität der Caspase-8 bedingt weiterhin über die saure Sphingomyelinase (ASM) die Bildung von Ceramid angereicherten Plattformen

in der Zellmembran [120] [121]. Zusätzlich können verschiedene Stressestimuli über Todesrezeptoren, wie CD95 und TNFR zur Aktivierung der ASM führen [69, 122]. Die Ceramid angereicherten Membrandomänen dienen als Signalplattformen, welche als Rezeptormoleküle apoptotische Reize übermitteln und an sämtlichen zellulären Signalwegen beteiligt sind [122, 123]. Sie aktivieren verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle, wie Phospholipase A2 [124] und inhibieren zusätzlich über Kinasenaktivierung Ca^{2+} -Ionenkanäle [121, 123]. Einige der Todesrezeptoren können zelluläres Überleben und ebenso Apoptosesignale vermitteln [111].

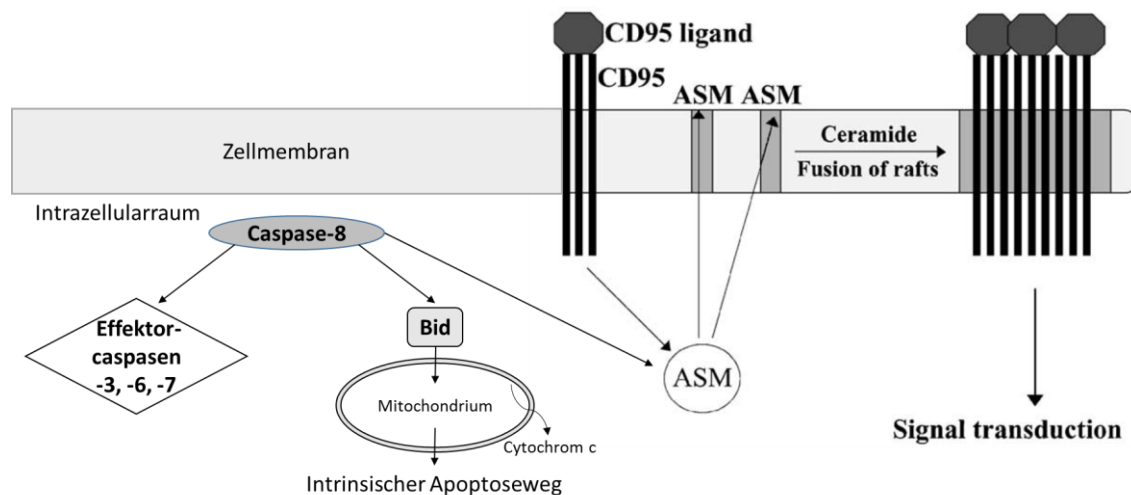


Abbildung 5: Auswirkungen der Caspase-8 und Ceramidformation, modifiziert nach [124]

Eine hohe Caspase-8 Aktivität führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen -3, -6 und -7. Dieses führt direkt zur Apoptose. Des Weiteren wird über das proapoptische Protein Bid die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran getriggert und der intrinsische Apoptoseweg aktiviert. Außerdem kann über die Caspase-8, wie auch über den CD95 Todesrezeptor das Enzym saure Sphingomyelinase (ASM) aktiviert werden. ASM transloziert an die Zelloberfläche und triggert die Bildung von Ceramidplattformen (Ceramide Fusion of rafts), welche wiederum an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind. [124]

1.3.3.2 Intrinsischer Weg

Der über Bcl-2 regulierte intrinsische Apoptoseweg wird nicht über die DR-Aktivierung initiiert, sondern direkt durch unterschiedliche zellschädigende Reize getriggert, beispielsweise durch Hitze, Ischämie [125], UV- und γ -Strahlung, durch Zytostatika, Mangel an Wachstumsfaktoren und Sauerstoff [126-128] sowie durch oxidativen Stress und extreme osmotische Verhältnisse [129].

Für den Zelltod über den intrinsischen Weg sind die Mitochondrien einer Zelle zentrale Knotenpunkte der Molekülregulation und –freisetzung. Nach Einbau der proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bax/Bak in die Mitochondrienmembran folgt nicht nur die Depolarisation, sondern auch die Freisetzung von Cytochrom C [69]. Das interaktive Netzwerk diverser Proteine der Bcl-2 Familie bestimmt das Schicksal der Zelle, reguliert die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) und kontrolliert den Zelluntergang [130]. Die MOMP gilt als „point of no return“ im Todesprozess einer Zelle [131].

Es wurden bislang drei verschiedene Kanäle identifiziert, die an der erhöhten Membranpermeabilität der Apoptose beteiligt sind. Durch die Oligomerbildung von Bax und Bak kann Cytochrom C über die gebildeten Kanäle mPTP, MAC, und VDAC freigesetzt werden [132]. Das antiapoptotische Protein Bcl-x hemmt beispielsweise den spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC), wohingegen die proapoptotischen Moleküle Bax und Bak die Öffnung ermöglichen, um Cytochrom C ins Zytosol freizusetzen [133, 134]. Durch die erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran können außer Cytochrom C noch etwa 40 weitere Apoptoseproteine über die Bax/Bak aktivierten Membrankanäle freigesetzt werden, beispielsweise die Procaspasen-2, -3, -9, sowie Smac/DIABLO und Omi/HtrA2, welche die Caspaseinhibitoren/IAPs binden. Ebenso erfolgt die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors/AIP und der von Caspase-3 aktivierten Endonuklease G, welche die Kondensation des Chromatins und den DNA-Abbau vermitteln [120, 135-140].

Cytochrom C und Procaspase-9 sind unerlässlich für die Bildung des Apoptosoms im Zytosol. Ein Bestandteil des Apoptosoms ist das Protein Apaf-1, welches in einer inaktiven Konformation vorliegt und drei Funktionsbereiche aufweist. Nach Bindung von Cytochrom C an seine Apaf-1 Domäne und nur in Anwesenheit von (d)ATP kommt es zur Oligomerisation, welches die Voraussetzung der Bindung von Procaspase-9 an seine Domäne CARD ist [141, 142]. Das Apoptosom spaltet Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9 [143]. Die aktivierte Caspase-9 bleibt apoptosom-gebunden [142] und schneidet von dort aus mittels limitierter Proteolyse die Effektorcaspasen-3 und -7 [144]. Diese

wiederum beeinflussen die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors/AIP [145]. Die Caspase-3 aktiviert weiterhin Initiations- und Exekutionscaspasen.

Die Effektorcaspasen, sowie eine Vielzahl an weiteren Substanzen sind unerlässlich für den programmierten Zelltod und um seine typischen Merkmale wie das „Membranblebbing“, die Umlagerung des Phosphatidylserins an die Außenmembran, die Kondensation des Zellkerns und die DNA-Fragmentierung zu bewirken [130, 146].

1.4 Erythrozyten

1.4.1 Überblick: Bildung, Morphologie, Physiologie und Seneszenz

Rote Blutkörperchen (RBC; engl. „red blood cells“), die Erythrozyten, sind durch ihre Funktion, einzigartige Struktur und ubiquitäre Verbreitung im menschlichen Körper lebenswichtige Zellen.

Der Hämatokrit beschreibt den prozentualen Anteil zellulärer Bestandteile am gesamten Blutvolumen. Bei gesunden Menschen beträgt er abhängig vom Geschlecht etwa 40% - 45% [147]. Er wird hauptsächlich durch die im Blut vorhandene Menge an Erythrozyten bestimmt [69], da diese die größte Zellpopulation mit rund 5 Millionen/ μ l darstellen [148].

Der Begriff Erythropoese beschreibt den Reifungsprozess im Knochenmark über Vorläuferzellen. Das aus der Niere freigesetzte Hormon Erythropoietin (Epo) ist der wesentliche Wachstumsstimulator für die Erythrozyten in frühen Stadien. Befindet sich der Körper in einem hypoxischen Zustand, wird es vermehrt gebildet. Bindet Epo an den Epo-Rezeptor der erythrozytären Vorstufen, werden multiple intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche die Differenzierung der Zellen bewirken [149]. Epo ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung der erythroiden Vorläuferzellen, sondern verhindert auch ihren Zelltod, über signalinduzierte Genexpression und durch die Synthese des antiapoptotischen Proteins Bcl-x in ihrer terminalen Differenzierungsphase [150]. Während der Differenzierung kommt es zur Verringerung der Zellgröße, zur Kondensation von Chromatin, der Autophagie von Zellorganellen und schließlich zur Enukleation der Erythroblasten [149, 151, 152].

Sobald die Erythroblasten ihren Kern verloren haben, werden sie zu Retikulozyten, welche noch RNA und Organellreste enthalten und so ins Blut gelangen. Der finale Erythrozyt enthält weder einen Kern, noch RNA oder Organellfragmente.

Erythrozyten sind diskusförmige Objekte mit zentraler Vertiefung, welche einen Durchmesser von 7,5 μm aufweisen. Sie sind nur etwa 2 μm dick und extrem verformbar. Erythrozyten besitzen optimale Bedingungen für die enge Passage der kleinen Kapillaren von etwa 4 - 5 μm im Durchmesser [153, 154].

Ihre ungewöhnlichen Membraneigenschaften sind einem System zu verdanken bei dem die Plasmamembran, eine Doppellipidschicht aus Cholesterin und Phospholipiden, durch Transmembranproteine an ein elastisches Netzwerk aus Spektrin- α und $-\beta$ Filamenten gebunden ist [155]. Für die Bildung der elastischen Membran sind zwei makromolekulare Transmembrankomplexe erforderlich, der Ankyrinkomplex und der 4.1R-Komplex. Die mechanische Stabilität wird durch die Verbindung intrazellulärer Spektrinfilamente untereinander sowie mit Transmembrankomplexen gewährleistet [155]. Insgesamt sind mehr als 50 Transmembranproteine mit unterschiedlichen Funktionen bekannt. Eine große Gruppe definiert die Blutgruppenantigene. Aquaporine, Glukosetransporter (GLUT1), reine Anionen-Transporter (Bande-3 Proteine), sowie etliche Cotransporter, ATPasen und Gardos-Kanäle transportieren Wasser, Signalmoleküle oder Ionen durch die Erythrozytenmembran [155].

Zu den Hauptaufgaben der roten Blutkörperchen gehören der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Transport, wie auch die pH-Pufferung [69].

Erythrozyten versorgen das Gewebe mit Sauerstoff (O_2) und sind hierbei kontinuierlich mechanischem Stress ausgeliefert. Während ihrer gesamten Lebensdauer von rund 120 Tagen [149] muss ihre Struktur und ihre Funktion, die O_2 -Verteilung, erhalten bleiben. Sie erreichen diese Fähigkeiten durch die bereits erwähnte hohe Elastizität der Membran, das Verhältnis von kleinem Volumen zu großer Zelloberfläche und der zytoplasmatischen Konsistenz abhängig vom Hämoglobingehalt [155].

Erythrozyten können in der Trockenmasse bis zu 97% aus Hämoglobin bestehen [156]. Die mittlere Hb-Menge (MCH: mean corpuscular hemoglobin) liegt pro Erythrozyt bei etwa 33 pg. Die Referenzwerte für Hämoglobin im Blut von Erwachsenen betragen für Frauen 12–16 g/dL und für Männer 14–18 g/dL [156]. Da Erythrozyten keine Zellorganellen besitzen, können sie nur über den zytosolischen Stoffwechselweg, der anaeroben Glykolyse Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gewinnen. Der einzige Energielieferant Glukose wird zu etwa 90% über die anaerobe Glykolyse verstoffwechselt [157, 158]. ATP wird unter anderem für die Glutathion-Synthese [157] und für die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase benötigt [69].

Zusätzlich benötigen Erythrozyten das Tripeptid Glutathion (GSH). Es wirkt als Antioxidans, ist entscheidend für den Zellschutzmechanismus und verhindert so beispielsweise den oxidativen Abbau von Hämoglobin. Dazu wird das Reduktionsmittel NADPH⁺ über den Pentosephosphatweg gewonnen. NADPH⁺ wirkt mit dem Enzym Glutathionreduktase, um Glutathion-Disulfid (GSSG) nach Oxidation in die reduzierte Form (GSH) zurückzuführen [157]. GSH ist an der Regeneration von Methämoglobin (Fe³⁺) zu Hämoglobin (Fe²⁺) beteiligt und schützt die Erythrozyten gegen zellschädigende Sauerstoffradikale durch die Reduktion von Peroxiden [157].

Nach 120 Tagen haben rote Blutkörperchen das Ende ihrer Lebenszeit erreicht. Seneszenz beschreibt den Vorgang der Zellalterung mit anschließender Entfernung der alten Erythrozyten [159].

Gealterte Erythrozyten können durch diverse Mechanismen aus dem Blut entfernt werden. Durch nur kleinste Veränderung der Oberflächenstruktur bleiben sie leichter am Endothel hängen und werden im retikuloendothelialen System von Milz-, Leber- und Knochenmarks-Makrophagen erkannt und eliminiert [160].

Die reduzierte Membranelastizität, sowie anhaftende Antikörper an seneszenten Erythrozyten führen zum Versagen aus dem retikulären Netzwerk der roten Milzpulpa zu entkommen [161]. Sie bleiben in den kleinen Schlitzen des Fasernetzwerks hängen und können phagozytiert werden [161]. Die eingeschränkte Verformbarkeit roter Blutkörperchen ist nicht nur während des

Alterungsprozesses zu finden, sondern kann auch in Krankheiten wie beispielsweise der hereditären Sphärozytose [162] und der Sichelzellanämie [163] beobachtet werden [161].

Im Zustand der Seneszenz findet eine Störung in der Verankerung des Zytoskeletts an der Zellmembran statt [159]. Dieses liegt an der Konformationsänderung von membranständigen Bande-3 Proteinen durch oxidiertes Hämoglobin. Diese veränderten Membranproteine bilden Andockstellen für Antikörper [161]. Es folgen Bindungen von autologen Immunglobulinen G (IgG). Die Zellen können hierdurch von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden [164]. Des Weiteren werden gealterte Erythrozyten und die im Prozess der Seneszenz sich abschnürenden Vesikel durch die Exposition von Phosphatidylserin (PS) erkannt und entfernt. Die PS-Translokation ist bereits für die Eryptose nachgewiesen worden [164, 165].

1.5 Die Eryptose

1.5.1 Die klinische Relevanz der Eryptose

Apoptose, Nekrose, Seneszenz, Hämolyse, Eryptose – all diese Begriffe beschreiben Vorgänge des Untergangs einer Zelle. Jedoch unterscheiden sich die Signalwege über welche dieses Ziel erreicht wird. Die Auswirkungen auf den menschlichen Körper können grundlegend verschieden sein.

Kernhaltige Zellen mit Mitochondrien sind Voraussetzung für den intrinsischen Apoptoseweg. Die Erythrozyten besitzen keine Mitochondrien und folglich keine Möglichkeit einen Todeskomplex wie das Apoptosom zu generieren [166].

Das Membranpotential eines Erythrozyten liegt bei -10 mV. Die Chloriddiffusion geschieht überwiegend passiv, während die Na^+/K^+ -ATPase die intrazelluläre Natriumkonzentration gering und eine hohe Kaliumkonzentration in den Zellen aufrecht erhält [167]. Zellschäden, beispielsweise defekte, membranständige Na^+/K^+ -ATPasen mit erhöhter Membranpermeabilität für Ionen sind Kennzeichen der intravasalen Hämolyse. Die erhöhte Natriumleitfähigkeit führt zu einer Depolarisation der Zelle mit Chlorideinstrom. Dem erhöhten osmotischen Gradienten entsprechend folgt der Wassereinstrom und letztlich die Zellschwellung [168]. Die Zerstörung der Zellmembran geht mit dem freien

Austritt von intrazellulären Substanzen wie beispielsweise Hämoglobin einher, wodurch die Nierentubuli geschädigt werden können [168]. Würde der Abbau geschädigter oder gealterter Erythrozyten nur über die Hämolyse verlaufen, würden täglich etwa 10 g Hämoglobin freigesetzt werden mit der Folge eines Nierenversagens [169]. Die Eryptose dient als Präventionsmechanismus vor der hämolytischen Auflösung zur systematisch Entfernung von Erythrozyten [168]. Bei der Eryptose kommt es nicht zu einer Zellschwellung, sondern durch Kalziumeinstrom mit nachfolgendem Verlust von Kalium zu einer Hyperpolarisation der Membran, welches einen Chlorid- und Flüssigkeitsausstrom nach sich zieht [167]. Es kommt zur Zellschrumpfung [167]. Erst vor etwa 15 Jahren wurde aus bekannten Zellmechanismen [170] die Theorie des gesteuerten Zelltods der Erythrozyten entwickelt [2]. Entsprechend dieses Vorganges, wurde der Begriff der Eryptose vor einem Jahrzehnt geprägt [4].

Seitdem hat die Eryptose an Relevanz gewonnen und wird mit diversen klinischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Das Auftreten der Eryptose ist beispielsweise für die Volkskrankheit Diabetes mellitus [19, 20] bekannt, sowie für eine Vielzahl von Anämien wie der weit verbreiteten Eisenmangelanämie [17], der hämolytischen Anämie [171], der Sichelzellanämie sowie der Thalassämie [172, 173]. Fieber und Hyperthermie gehen oft mit einer Anämie einher [174]. Es wird angenommen, dass die Anämie durch vermehrten Abbau hyperthermisch-geschädigter Erythrozyten begünstigt wird. Hyperthermie stimuliert Eryptose [174].

Auch bei einer Malariainfektion kommt es durch oxidativen Stress zu einer Abnahme von funktionsfähigem GSH und ATP in den Erythrozyten, Aktivierung verschiedener Ionenkanäle in der Zellmembran und Einleitung der Eryptose [21, 22, 175]. Kalziumeinstrom mit folgender Vesikelbildung führt zu Umlagerungen von Membranphospholipiden und aktiviert die Cystein-Endopeptidase Calpain, welche am Abbau des Zytoskeletts beteiligt ist [21].

Die Eryptose ist außerdem in den lebensbedrohlichen Zuständen der Sepsis [176] sowie beim Hämolytisch urämischem Syndrom (HUS) erhöht, welches

durch Thrombozytopenie, hämolytische Anämie und akutes Nierenversagen gekennzeichnet ist [177].

Das Metabolische Syndrom [18], die Niereninsuffizienz [178, 179] sowie der Morbus Wilson [180] sind weitere Erkrankungen bei denen ein gesteigerter programmierter Erythrozytentod nachgewiesen wurde. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass die Eryptose unter Einwirkung von Kohlenmonoxid ebenfalls stimuliert wird [181]. Es können jedoch nicht nur klinische Krankheitsbilder mit der Eryptose in Verbindung gebracht werden. Nach Experimenten mit Klotho Knockout-Mäusen konnte bewiesen werden, dass Erythrozyten im Zustand der Dehydratation sensibler gegenüber Stressoren reagieren und hierbei Eryptose ausgelöst wird [182]. Dasselbe konnte für Mäuse belegt werden, die einen Phosphatmangel aufweisen [183].

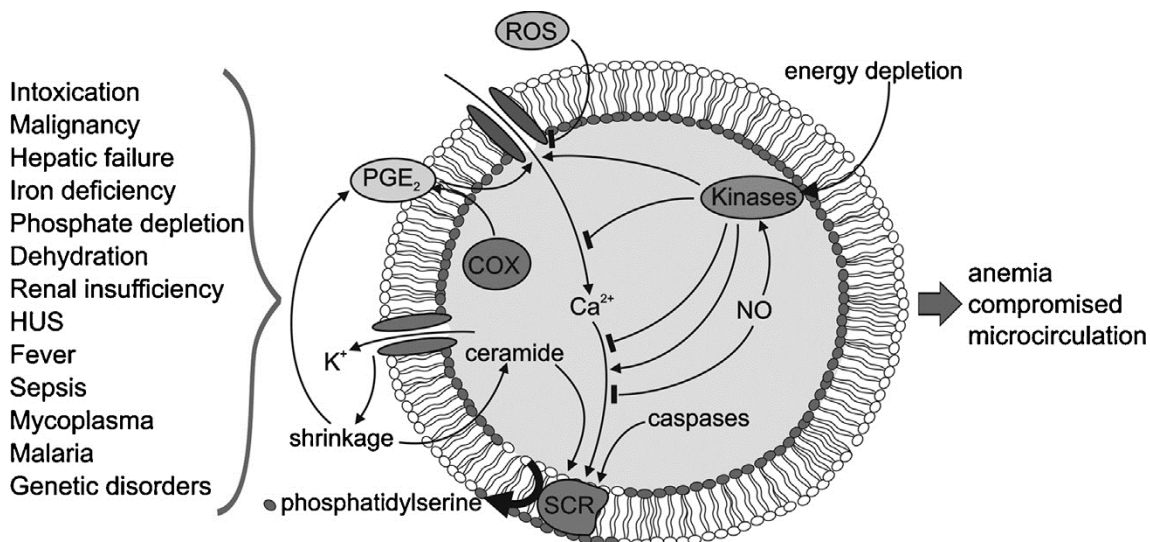


Abbildung 6: Erkrankungen und Eryptose [184]

In den aufgeführten Erkrankungen konnte der Prozess der Eryptose nachgewiesen werden. Wirken externe Stressoren auf die Erythrozyten, fördert dieses den Kalziumeinstrom (Ca^{2+}). Es kommt zum Kaliumausstrom (K^+) und Chloridverlust (Cl^-), welches durch nachfolgendes Wasser eine Zellschrumpfung bewirkt. Die Zellschrumpfung wiederum stimuliert die Bildung von PGE_2 . Auch die Formation von Ceramid wird durch die Schrumpfung gefördert. Durch Energiemangel erfolgt eine Aktivierung von Kinases, welche regulatorisch in den Vorgang der Eryptose eingreifen. NO inhibiert die Eryptose über Kinaseaktivierung. Einige Kinases, wie auch Ceramid und der hohe intrazelluläre Kalziumgehalt führen zur Aktivierung des Enzyms Scramblase und folglich zur Exposition von Phosphatidylserin [184].

COX: Cyclooxygenase, PGE_2 : Prostaglandin E2, NO: Stickstoffmonoxid, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, SCR: Scramblase

Der Zelltod der roten Blutkörperchen wird durch oxidativen Stress, hyperosmotischen Schock, Energieverlust durch Glukoseentzug und einer Vielzahl von Medikamenten ausgelöst [21, 75, 185]. Beispielsweise kann die Mutation von dem Tumorsuppressorgen, welches für das Adenomatöse Polyposis Coli (APC)-Protein kodiert, ebenfalls zu erhöhten Eryptoseraten führen [186]. Über die genauen Mechanismen ist jedoch erst wenig bekannt. Eine Vielzahl an Zytostatika lösen nicht nur die Apoptose der Tumorzellen aus, sondern auch den erythrozytären Zelltod. Die Existenz von über 120 Eryptose auslösenden Substanzen konnte gemäß neuesten Forschungserkenntnissen nachgewiesen werden [5]. Hierzu gehören beispielsweise die Zytostatika Cisplatin [8], Paclitaxel [9] und Estramustin [10].

Ein weiterer zentraler Aspekt der Eryptoseforschung ist die Entdeckung von Inhibitoren des Zelltods. Die Vermeidung der Eryptose könnte zukünftig eine Therapieoption im Rahmen bestimmter Komplikationen oder Anämien darstellen. Das Antioxidans N-Acetylcystein beispielsweise schützt besonders gealterte Erythrozyten vor oxidativem Stress und verlängert ihre Überlebenszeit [187]. Vitamin E und Glutathion schützen Erythrozyten vor oxidativem Stress [5]. Außerdem inhibiert Epo über Hemmung membranständiger Kationenkanäle die durch Aluminium induzierte Eryptose [188].

Um weitere Substanzen zur Inhibition der Eryptose entdecken zu können, müssen die Mechanismen der Eryptose noch besser verstanden werden.

Im Folgenden werden die bereits bekannten grundlegenden Signalwege der Eryptose beschrieben.

1.5.2 Die Eryptose – Ein Überblick

Der suizidale Erythrozytentod ist durch Zellschrumpfung, Membranumlagerung mit Aufhebung der Zellmembranasymmetrie und Phosphatidylserin (PS)-Exposition gekennzeichnet. Letzteres führt zu verstärkter Gefäßwandhaftung und hilft bei der Elimination aus dem Blutstrom mittels Makrophagen [189].

Die Erythrozyten sind einer Vielzahl an Stressoren im menschlichen Körper ausgesetzt, beispielsweise dem oxidativen Stress während der Lungenkapillarpassage sowie der mechanischen Belastung in den engen Kapillaren [169].

Oxidativer Stress [185], hyperosmotischer Schock mit Zellschrumpfung [3], Energiedepletion bei vermindertem ATP-Gehalt durch Glukoseentzug [75], Hyperthermie [174], sowie Entfernung von extrazellulärem Chlorid (Cl^-) [190] und Einwirkung von Medikamenten auf Erythrozyten führen zur Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen in der Zellmembran [5].

Gegenstand aktueller Forschung sind zwei Hauptmechanismen der Eryptose. Die Eryptose kann sowohl über den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration vermittelt werden, als auch über die Formation von Ceramid, welche einen Ca^{2+} -unabhängigen Eryptose weg darstellt [191].

Sind Erythrozyten bestimmten Stressfaktoren ausgesetzt, werden die Enzyme Phospholipase A_2 (PLA_2), die Cyclooxygenase (COX) und die Prostaglandin E (PGE)-Synthase aktiviert [190]. Diese Enzyme generieren Prostaglandin E_2 (PGE_2) aus Phospholipiden der Zellmembran [190]. PGE_2 aktiviert bei hyperosmotischem Schock oder Chloriddepletion die Kationenkanäle und löst den Kalziumeinstrom aus [4]. Die Formation von PGE_2 kann durch den PLA_2 -Inhibitor Quinacrine vermindert werden [190].

Die PLA_2 Aktivierung führt zusätzlich über den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) und die Aktivierung von Sphingomyelinasen zur Bildung von Ceramid [192, 193].

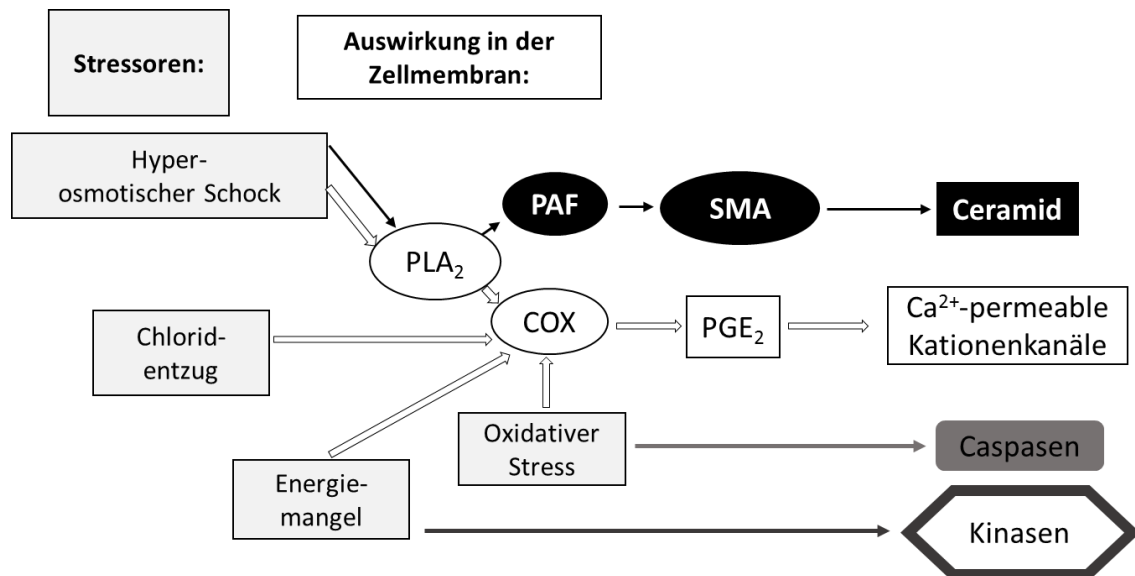


Abbildung 7: Überblick der Zellmechanismen beim Prozess der Eryptose

Sind Erythrozyten Stressoren ausgesetzt werden membranständige Phospholipide durch Enzyme und Mediatoren gespalten. Es kommt unter PGE₂-Beteiligung zu einem Kalziueinstrom. Ca²⁺-unabhängig findet die Ceramid-Formation und Caspasenaktivierung statt. Glucosedepletion mit einhergehendem Energiemangel aktiviert einen Signalweg über regulatorische Kinasen.

COX: Cyclooxygenase, PAF: Plättchenaktivierender Faktor, PGE₂: Prostaglandin E₂, PLA₂: Phospholipase A₂, SMA: Sphingomyelinase

1.5.3 Die Eryptose über intrazellulären Kalziumanstieg (Ca²⁺)

Die nicht-selektiven Ca²⁺-permeablen Kationenkanäle der Erythrozytenmembran werden über PGE₂ durch osmotischen Schock, Chloriddepletion oder oxidativen Stress aktiviert [3, 194]. Auf molekularer Ebene beinhalten die Kationenkanäle „transient receptor potential channel 6“ TRPC6-Proteine [195], die für Na⁺- und Ca²⁺-Ionen durchlässig sind [5].

Während Erythrozyten den genannten Stressoren ausgesetzt sind, kommt es beim Prozess der Eryptose zur Bildung von PGE₂, der Aktivierung nicht-selektiver Ca²⁺-permeabler Kationenkanäle und einem Kalziueinstrom. Das Resultat ist eine intrazellulär erhöhte Kalziumkonzentration [191].

Dieser folgen unterschiedliche Mechanismen:

Zellvolumenminderung

Ein stressinduzierendes extrazelluläres Milieu bewirkt über PLA₂ und COX die Bildung von PGE₂, welches an der Stimulation von membranständigen Ca²⁺-Kanälen und folglich dem intrazellulären Kalziumanstieg beteiligt ist [5, 190].

Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle, auch Gardos-Kanäle (KCNN4, hSK4) genannt, werden durch die hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert [196, 197].

Es folgt ein Ausstrom von K⁺-Ionen sowie die Hyperpolarisation der Zellmembran [5, 191].

Durch den erhöhten elektrophysiologischen Gradienten diffundieren daraufhin auch Cl⁻-Ionen über die Zellmembran aus den Erythrozyten [5, 191].

Nach dem Verlust von KCl führt osmotisch bedingter Wasserausstrom zur Zellvolumenminderung [5, 191].

Zellmembranumlagerung mit Phosphatidylserin (PS)-Exposition

Die Translokase, ein ATP-abhängiges Aminophospholipid-Enzym erhält die physiologische Asymmetrie der Membranphospholipide bei normalem intrazellulärem Kalziumgehalt aufrecht. Die Translokase reguliert unter anderem, dass PS an der Innenseite der Doppelmembran bleibt [198].

Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zur Hemmung der Translokase [199] und zur Aktivierung des Enzyms Scramblase.

Die Scramblase bedingt die Aufhebung der physiologischen Asymmetrie der Membranphospholipide mit PS-Umlagerung auf die äußere Seite der Zellmembran [155, 200].

Wird des Weiteren die Translokase beispielsweise durch Caspase-3 inhibiert, kann es auch zur PS-Exposition kommen [201].

Durch Umlagerung des Phospholipids PS von der Innenmembran auf die Außenseite der Lipiddoppelschicht, können Erythrozyten von Makrophagen erkannt und eliminiert werden [202]. Diese PS-Translokation innerhalb der Doppelmembran ist ein typisches Apoptosemerkmal aller Zellen [203].

Des Weiteren zeigen aktuelle Forschungsarbeiten, dass das Skelettprotein Spektrin mit PS interagiert und zur Verbesserung der mechanischen Membranstabilität beiträgt [155]. Wird PS nach außen umgelagert leidet auch die Widerstandsfähigkeit der Erythrozytenmembran.

Die PLA₂-Inhibitoren Quinacrine und Palmitoyl-Trifluoromethyl-Ketone (PACOCF₃) sowie die COX-Inhibitoren Acetylsalicylsäure (ASS) und Diclophenac können bei Chloriddepletion die Stimulation der Ca²⁺-Kanäle hemmen und nachfolgend die PS-Exposition vermindern [168, 190].

Der Abbau des Zytoskelettes und der Membran

Calpain gehört zur Familie der zytosolischen Cystein Proteasen, die als inaktives Proenzym vorliegen und Ca²⁺-abhängig ihre proteolytisch-enzymatische Aktivität entfalten [166, 204]. Erythrozyten besitzen die Isoform Calpain-1 (μ -Calpain), die durch das Protein Calpastatin inhibiert wird [205]. Für die Entfaltung der enzymatischen Aktivität von Calpain wird intrazelluläres Kalzium (Ca²⁺) benötigt [204]. Die Endopeptidase Calpain-1 reguliert die Aktivität von membranständigen Ca²⁺-abhängigen Gardos-Kanälen und den K⁺-Cl⁻-Kotransportern (KCC1), wodurch sie einen Einfluss auf die Veränderung des Erythrozytenvolumens hat [205]. Des Weiteren ist sie am Abbau von Transportern und Enzymen, wie zum Beispiel der membrangebundenen Ca²⁺-ATPase beteiligt [206].

Bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen werden unter anderen die Zellmembranproteine Ankyrin, Bande-3 und 4.1R von Calpainen gespalten [205]. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Calpain-1 die Verformbarkeit der Erythrozyten vermindert, jedoch keinen Effekt auf die Lebenszeit *in vivo* zu haben scheint [205]. Calpain-1 ist am Abbau des Zytoskelettes und dem Verlust der Feinstruktur der Erythrozytenmembran beteiligt, welches mit Vesikelbildung an der Membranoberfläche (Membranblebbing) einhergeht [192, 205]. Calpain-Inhibitoren sind der Protease-Inhibitor Leupeptin und der irreversible Peptidasehemmer E-64 [207].

Kinasenaktivierung

Energieentzug durch Glukosedepletion führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von Januskinase 3 (JAK3) sowie der Proteinkinase C (PKC) in Erythrozyten. Beide wirken proeryptotisch und führen zu Membranumlagerung mit PS-Exposition und Zellschrumpfung [75, 208]. Ebenso wie die eryptotische Caseinkinase 1 α stimuliert auch die Aktivierung von PKC den Kalziumeinstrom

[5, 209]. Es konnte die Existenz von diversen Unterformen der PKC in Erythrozyten nachgewiesen werden, welche Skelettproteine wie zum Beispiel Bande 4.1 und Adducin phosphorylieren [168, 207].

Eine weitere eryptose-stimulierende Kinase welche vor allem bei hyperosmotischem Schock durch Phosphorylierung aktiviert wird, ist die MAP-Kinase p38 [210].

Einige Kinasen sind an der regulatorischen Inhibition der Eryptose beteiligt. Die Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase, (AMP-Kinase, AMPK) hemmt beispielsweise die Scramblase und den Kalziumeinstrom. Auch die Aktivierung der cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängigen Proteinkinase (cGKI) über Stickstoffmonoxid (NO) führt durch Kalziumkanalinhibition zur Hemmung der Eryptose [159].

Vesikelbildung der Zellmembran

Durch Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts mit nachfolgender Produktion eines Glycinderivats (1,2-Diacylglycerol) kommt es in der Membran zur Mikrovesikulation [211].

1.5.4 Eryptose durch Ceramidformation mit Phosphatidylserin (PS)-Exposition

Ceramid gehört zu den Sphingolipiden. Die Struktur entspricht einem Sphingosinmolekül und einer Fettsäure, welche über eine Amidbindung gekoppelt sind [192]. Bei der Eryptose sind hauptsächlich die sauren und neutralen Sphingomyelinasen für die Formation von Ceramid verantwortlich [192].

Unter osmotischem Stress und Zellschrumpfung der Erythrozyten kommt es anfänglich durch die Enzymaktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) über mehrere Zwischenschritte schließlich zur Ceramidbildung. Ceramid wirkt über die Aktivierung der Scramblase und führt zur membranösen PS-Exposition [212]. Es sensibilisiert die Scramblase für zytosolisches Kalzium, ohne dass eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration vorliegen muss [213].

Der PLA₂-Inhibitor Quinacrine führt zu einer Verminderung der PS-Exposition an der Membranaußenseite von Erythrozyten [212].

Während hyperosmotischer Zellschrumpfung triggert PLA₂ die Formation von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) aus Zellmembranlipiden. PAF sensibilisiert die Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanäle (Gardos-Kanäle) der Zellmembran für zytosolisches Kalzium, welches die Zellschrumpfung verstärkt [214, 215]. Der Phospholipid-Mediator PAF ist an der Regulation von Inflammation, Thrombose und der Atherogenese beteiligt [212]. PAF aktiviert außerdem das Enzym Sphingomyelinase (SMase), welches Sphingomyelin in das proapoptotische Sphingolipid Ceramid und Phosphorylcholin spaltet [192, 213, 216]. Die Sphingomyelinase-Inhibitoren 3,4-Dichloroisocoumarin und Urea führen bei osmotischem Stress zu einer Verminderung der Ceramidformation und PS-Exposition [212, 213]. Zusätzlich exprimieren Erythrozyten PAF-Rezeptoren die mit extrazellulärem PAF interagieren [212]. Sie sind ebenso an der Formation von Ceramid beteiligt [212]. Sowohl in genveränderten Knockout-Mäusen, bei welchen die PAF-Rezeptoren fehlen als auch nach Einwirkung des PAF-Rezeptor-Antagonisten ABT491 konnte im osmotischem Schock weder Ceramidformation noch die für die Eryptose spezifische PS-Umlagerung beobachtet werden [159, 191, 212].

Bei der Eryptose durch hypersmotischen Schock kommt es auch zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche ebenso zur Scramblase-Aktivierung und PS-Exposition führt [213]. Dennoch wurde in einem Ca²⁺-freien Milieu und durch Hemmung der Ca²⁺-permeablen Kationenkanäle mittels Ethylisopropylamiloride (ETPA) und / oder Amiloride eine Scramblase-Aktivität mit folglich PS-Exposition nachgewiesen [3, 212, 213]. In Abwesenheit von Kalzium (Ca²⁺) ist die Wirkung von Ceramid auf die PS-Exposition in etwas verringertem Maße vorhanden [213].

Da es trotz Inhibition der Ca²⁺-Kanäle zu einer Membranumlagerung mit PS-Umlagerung kommt, gilt der Weg über die Ceramidformation als Ca²⁺-unabhängiger Eryptosemechanismus [3, 195]

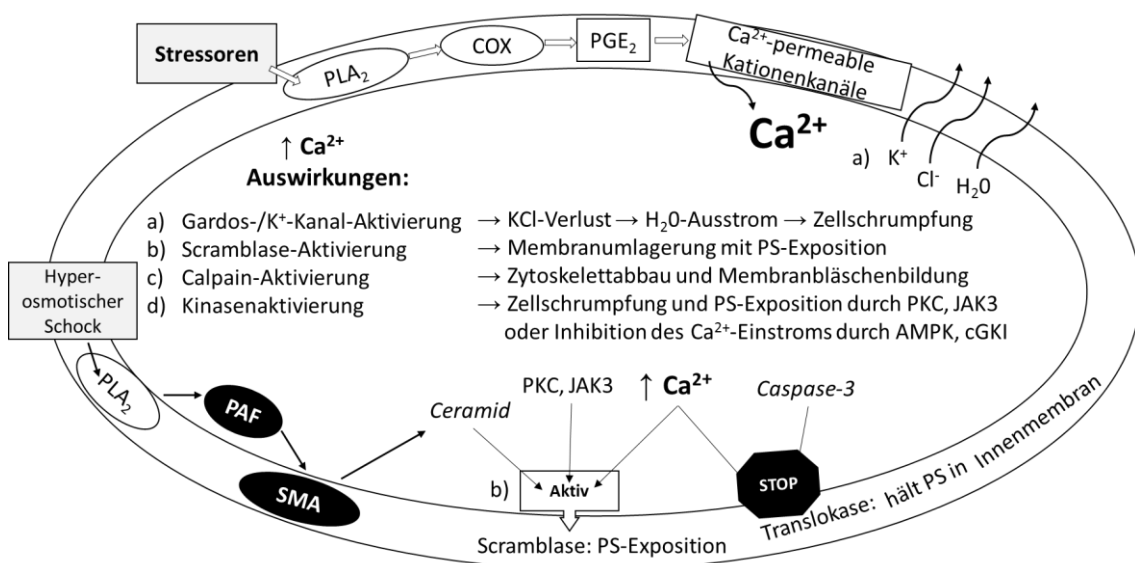


Abbildung 8: Detaillierte Darstellung der molekularen Veränderungen im Verlauf der Eryptose

Nach Reaktion der Zellmembran auf externe Stressoren folgt der Kalziueinstrom, welcher diverse biochemische Reaktionen auf molekularer Ebene a)-e) bewirkt. Befinden sich Erythrozyten in einem hyperosmotischen Milieu kann es zur Ceramidbildung kommen. Das Enzym Scramblase bewirkt die Membranumlagerungen und PS-Exposition. Ein hoher intrazellulärer Kalziumgehalt und Caspase-3 inhibieren die Translokase.

AMPK: Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase, cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase, COX: Cyclooxygenase, JAK3: Januskinase 3, PAF: Plättchenaktivierender Faktor, PGE₂: Prostaglandin E₂, PKC: Proteinkinase C, PLA₂: Phospholipase A₂, PS: Phosphatidylserin, SMA: Sphingomyelinase

In Erythrozyten kann die Formation von Ceramid bei verschiedenen Krankheiten beobachtet werden, wie beispielsweise dem Morbus Wilson [180], dem Hämolytisch Urämischen Syndrom [177], bei Fieber [174] und Sepsis [176] sowie bei einer terminalen Niereninsuffizienz [179, 192]. In den unterschiedlichen Erkrankungen kann der eryptotische Prozess isoliert durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration oder über die Bildung von Ceramid stattfinden, jedoch kann auch eine Kombination aus beiden Mechanismen zur Eryptose führen [216].

In Erythrozyten kann Ceramid über verschiedene Signalwege generiert werden, wobei weitere Experimente nötig sind, um den detaillierten Mechanismus der Ceramidformation zu verstehen [216].

1.5.5 Caspasenaktivierung mit Phosphatidylserin (PS)-Exposition

Nachdem schon vor über einer Dekade die Caspasen-3 und -8 in Erythrozyten nachgewiesen wurden [166], zeigen aktuelle Forschungsergebnisse den Einfluss von Caspase-3 auf den erythrozytären Zelltod im Zusammenhang mit der Volkskrankheit Diabetes mellitus Typ 2 [217]. Eine verstärkte Caspase-3 Aktivität konnte in Erythrozyten von Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden [217]. In diesen Patienten wirken unterschiedliche Stressfaktoren auf die Erythrozyten wie beispielsweise ein extrazellulär hyperglykämisches Milieu und starker oxidativer Stress [217, 218]. Des Weiteren ist die Lebensdauer der Erythrozyten in Diabetes mellitus Typ 2 Patienten verkürzt [217]. Frühere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass Caspasen durch oxidativen Stress aktiviert werden [219]. Abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), konnte unter oxidativem Stress eine Translokation von Fas-Rezeptoren beobachtet werden [201]. Nach Bindung von einem Fas-Liganden wird ein Fas-assoziiertes Komplex gebildet und Caspase-3 und -8 aktiviert [201]. Caspase-3 hemmt das Enzym Translokase und stimuliert die PS-Exposition über die der Erythrozyt als Phagozytosematerial erkannt wird [220]. Nach Caspasenaktivierung wird der Anionentransporter AE1/Bande 3 moduliert [221]. Aktivierte Caspasen sind ebenfalls an der Eryptoseinduktion durch Leukotriene [222] und α -Liponsäure beteiligt [223] [5].

Erythrozyten enthalten erhebliche Mengen an Caspase-3 und -8 aber keine weiteren Komponenten des mitochondrialen Apoptosoms [166]. Erstaunlicherweise konnte nachgewiesen werden, dass Caspase-3 und -8 *in vitro* zwar funktionell aktiv sind, sich aber durch eine Vielzahl proapoptotischer Stimuli nicht aktivieren lassen, wie zum Beispiel ionisierende Strahlung und Kalzium-ionophore [166]. Es gibt auch keinen Nachweis dafür, dass Caspasen von der hohen Kalziumkonzentration aktiviert werden oder für den Anstieg von intrazellulärem Kalzium (Ca^{2+}) mit nachfolgender Membranumlagerung notwendig sind [2, 166]. Aktivierte Caspasen sind keine Voraussetzung für das Membranscrambling, sie sind jedoch an diesem Vorgang der Eryptose beteiligt [5].

1.6 Thematik und Ziele der Arbeit

Anämien werden durch viele Medikamente, sowie durch diverse Krankheiten selbst ausgelöst [191]. Häufig findet sich bei Substanzen mit eryptotischer oder hämolytischer Wirkung eine Anämie im Nebenwirkungsprofil [8, 9]. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Einfluss ausgewählter Substanzen auf den programmierten Erythrozytenzelltod, der Eryptose. Werden Erythrozyten von Substanzen geschädigt, kann häufig der Vorgang der Eryptose nachgewiesen werden. Bei übermäßiger Eryptose besteht die Möglichkeit eine Anämie zu entwickeln [168].

Die Fragestellung dieser Arbeit lag auf der Ermittlung von Stimulanzen des gesteuerten Erythrozytenzelltods und umfasst deren Wirkung *in vitro*. Dabei sollten die grundlegenden Mechanismen der Zellveränderung während der Eryptose nachgewiesen werden. Im Durchflusszytometer wurden als Basisparameter der Eryptose gemessen. Diese umfassen das Zellvolumen, den intrazellulären Kalziumgehalt sowie die Phosphatidylserin-Exposition an der Membranaußenseite der Erythrozyten. Das Nebenwirkungsprofil von Mitotan umfasst als Blutbildveränderung mitunter Anämien [35]. Miltefosin darf auf Grund seiner hämolytischen Aktivität nicht intravenös (i.v.) verabreicht werden [72]. Bei der Auswahl dieser beiden antineoplastischen Substanzen waren nicht nur die Nebenwirkungsprofile von Bedeutung. Die adrenolytisch zytotoxische Wirkung von Mitotan auf kernhaltige Körperzellen im Allgemeinen war ein Auswahlkriterium [31, 35, 38], sowie die apoptotische Wirkung von Miltefosin [56]. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten gelang der Nachweis über Mechanismen der Eryptose durch beide Zytostatika bereits bei therapeutischen Plasmaspiegeln. Mitotan und Miltefosin sind Auslöser der Apoptose kernhaltiger Zellen und Stimulanzen der Eryptose.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Erythrozyten

Leukozytengefilterte Erythrozytenzellkonzentrate wurden von der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Bei Eigenanfertigung wurden sie aus frisch gewonnenem Heparin-Vollblut mittels Trennung von Plasma und Erythrozyten durch Zentrifugation (Rotata 460R, Hettich Zentrifugen) bei 2000 rpm und 23°C für 10 Minuten angefertigt. Die Erythrozyten wurden durch zweimaliges Waschen in plasmatischer Ringerlösung isoliert und bis zur experimentellen Verwendung bei +4°C gelagert.

Die Erythrozyten wurden *in vitro* bei einem Hämatokrit von 0,4 % in Ringerlösung für 24 Stunden bei 37°C und einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Das gelöste Mitotan oder Miltefosin wurde je nach Experiment in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Die Mitotan-Experimente wurden jeweils parallel zu einer Kontrolle, mit dem Lösungsmittel Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) durchgeführt.

Die Experimente und der Gewinn der Erythrozyten wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und genehmigt (184/2003 V).

2.1.2 Verwendete Substanzen

2.1.2.1 Mitotan

Das in den Experimenten verwendete Mitotan (Handelsname: Lysodren®, Synonym: 2,4'-DDD, 1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane, 1-Dichloro-2-(o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl)ethane) wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland, Produktnr. 35485) bezogen. Das Zytostatikum Mitotan (250mg) wurde in DMSO (5 ml) (Calbiochem Cat#317275, Lot#D00101624) gelöst, entsprechend einer Konzentration von 50 mg/ml. Von dieser Ausgangslösung wurden weitere Verdünnungen erstellt, um die gewünschten Endkonzentrationen zu erhalten. DMSO wurde den Kontrollen in der jeweilig maximal verwendeten Menge hinzugefügt und parallel inkubiert.

2.1.2.2 Miltefosin

Miltefosin (Synonym: Hexadecylphosphocholine, HePC, Handelsnamen: Milteforan®, Impavido®, Miltex®) ist ein alkyliertes Phosphocholin-Derivat, welches in der Behandlung verschiedener Parasitenarten, Tumorerkrankungen, sowie gegen pathogene Bakterien und Pilze eingesetzt wird [50].

Das helle Pulver löst sich sowohl in wässrigen und organischen Lösungsmitteln. Das eingesetzte Miltefosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, Produktnr. M5571) wurde in Ringer ≥ 2.5 mg/mL gelöst.

In den Experimenten betrug das Konzentrationsspektrum 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 5 $\mu\text{g/ml}$. Die maximale Plasmakonzentration *in vivo* beträgt 70 $\mu\text{g/ml}$ [50].

2.1.2.3 Fluo-3/AM

Der Fluo-3/AM (Acetoxymethyl-) Ester dient dem Nachweis des intrazellulären Kalziumgehalts. Sobald sich Fluo-3/AM in der Zelle befindet, wird es von Esterasen gespalten. Es liegt nun als Fluo-3 vor, interagiert mit dem intrazellulären Kalzium (Ca^{2+}), mit folglich erhöhter Fluoreszenzaktivität und verbleibt im Zytosol.

Fluo-3/AM wurde von der Firma Biotium Inc. (3159 Corporate Place, Hayward, USA, Produktnr. 50014) bezogen. Es wurde in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.2.4 Annexin V-FITC .

Als ein Marker-Protein für Zellen im apoptotischen Zustand bindet Annexin V an Phosphatidylserin. Da es mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert vorliegt, lassen sich mittels FACS-Analyse Annexin V gebundene Zellen detektieren.

Das bei den Experimenten verwendete Annexin V stammt von der Firma ImmunoTools GmbH (Deutschland, Produktnr. 31490013).

2.1.2.5 Ionomycin

Das Kalziumionophor Ionomycin erhöht die Membranpermeabilität für Kalziumionen. Ionomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. I3909) wurde in DMSO gelöst. Für die Experimente wurde die Konzentration von 1 μM verwendet.

2.1.2.6 N-Acetylcystein

N-Acetylcystein von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland, Produktnr. A7250) ist eine antioxidative Verbindung und inhibiert Bay 11-7082 und Parthenolide induzierte Eryptose [187, 224]. Es wurde in Ringerlösung gelöst und in einer Konzentration von 1 mM in den Versuchen eingesetzt. Es wurde eine Kontrollreihe nur mit N-Acetylcystein mit der Versuchsreihe N-Acetylcystein plus Mitotan mitgeführt.

2.1.2.7 Clotrimazol

Der Kaliumkanalinhibitor Clotrimazol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, Produktnr. C6019) ist ein Inhibitor Blei-induzierter Eryptose [225]. Die Konzentration in den durchgeführten Experimenten betrug 5 μ M gelöst in DMSO. Es wurde eine Kontrollreihe nur mit Clotrimazol mit der Versuchsreihe Clotrimazol plus Mitotan mitgeführt.

2.1.2.8 zVAD

Der Pancaspase-Inhibitor zVAD-FMK (Z-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketone) von der Firma Enzo (Lörrach, Deutschland Produktnr. ALX-260-020) wurde in DMSO (10 mg/ml) gelöst. Erythrozyten wurden mit 10 μ M zVAD-FMK für 24 Stunden bei 37° inkubiert. Es wurde eine Kontrollreihe mit zVAD neben der Versuchsreihe zVAD plus Mitotan mitgeführt.

2.1.2.9 Sunitinib

Sunitinib (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, Produktnr. PZ0012) wurde als Postitivkontrolle für die Wirkung von zVAD mitgeführt. ZVAD verringert die von dem Multityrosinkinase-Inhibitor Sunitinib induzierte Eryptose [12]. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Sunitinib wurde in einer Konzentration von 20 μ M verwendet, zVAD entsprechend der Experimentalreihe in einer Konzentration von 10 μ M hinzugegeben.

2.1.3 Verwendete Lösungen

2.1.3.1 Ringerlösung

Die Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase der Erythrozyten, sowie die Energieversorgung mit Glukose waren Voraussetzungen für die durchzuführenden Experimente. Diese Bedingungen, welche einen stressfreien Zustand für Erythrozyten darstellen sollten, konnten mit einer Ringerlösung geschaffen werden. Die Ringerlösung diente als Referenzlösung aller Experimente.

Die Gesamtosmolarität der Lösung betrug 290 mosmol/l. Der pH-Wert wurde mittels N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES) und Natriumhydroxid (NaOH) auf einen physiologischen pH Wert von 7,4 eingestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösung

Substanz	Menge für ca. 500ml [g]	Konzentration [mM]
<i>NaCl</i>	<i>3,65</i>	<i>125,00</i>
<i>KCl</i>	<i>0,18</i>	<i>5,00</i>
<i>MgSO₄</i>	<i>0,15</i>	<i>1,20</i>
<i>HEPES</i>	<i>3,84</i>	<i>32,20</i>
<i>Glukose</i>	<i>0,45</i>	<i>5,00</i>
<i>CaCl₂</i>	<i>0,05</i>	<i>1,00</i>
<i>NaOH</i>	<i>0,27</i>	<i>13,50</i>
<i>H₂O</i>	<i>491,40 ml</i>	

2.1.3.2 Ca²⁺-freie Lösung

Die Ca²⁺-freie Lösung diente zur Aufschlüsselung des Mechanismus der Mitotan-induzierten Eryptose. Die Wirkung von Mitotan auf den Kalziumeinstrom und die stattfindende Eryptose wurde in Ca²⁺-freier Lösung und Ringerlösung gemessen. Mittels Annexin V-Bindung wurde die Exposition von Phosphatidylserin bestimmt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Ca^{2+} -depletierten Lösung

Substanz	Menge für ca. 500ml [g]	Konzentration [mM]
NaCl	3,65	125,00
KCl	0,18	5,00
MgSO ₄	0,15	1,20
HEPES	3,84	32,20
Glukose	0,45	5,00
CaCl ₂	-	-
NaOH	0,27	13,50
H ₂ O	491,20 ml	

2.1.3.3 Annexin-Waschpuffer

Zur Vorbereitung der Ansätze für die FACS-Messung wurden die Erythrozyten mit dem Annexin-Puffer (Tab. 5) nach der Inkubation gewaschen, verdünnt und mit dem fluoreszierenden Farbstoff Annexin V-FITC (Firma ImmunoTools GmbH, Deutschland) inkubiert. Der pH-Wert des Annexin-Puffers wurde auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des verwendeten Annexin-Waschpuffers

Substanz	Menge für ca. 500ml [g]	Konzentration [mM]
NaCl	3,65	125,00
HEPES	1,19	10,00
CaCl ₂	0,28	5,00
NaOH	0,08	4,20
H ₂ O	495 ml	

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsdurchführung

Die Experimente wurden an keimfreien Werkbanken unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die experimentellen Konzentrationen wurden den *in vivo* gemessenen Plasmakonzentrationen bei Einnahme der Medikamente in etwa angeglichen. Mitotan wurde in DMSO gelöst und zur jeweiligen Kontrolle in gleichen Mengen zugegeben.

Die Ausgangslösungen der Medikamente wurden in den jeweils errechneten Konzentrationen in Ringerlösung mehrerer Zentrifugenröhrchen gegeben. Daraufhin erfolgte das Pipettieren von jeweils 1 ml Ringerlösung inklusive der Testsubstanzen in eine vorhergesehene Anzahl Eppendorf-Gefäße. 4 µl Erythrozytenzellkonzentrat wurden zu jedem Ansatz hinzugegeben. Der Hämatokrit betrug jeweils 0,4 %. Die Erythrozytenzellproben von mindestens $n = 4$ bis $n = 6$ unterschiedlichen Spendern mit verschiedenen Blutgruppen wurden in jeweils einem Experiment getestet. Bevor die Proben für jeweils 24 oder 48 Stunden bei 37°C in den Inkubator gestellt wurden, wurde der Inhalt jedes Eppendorf-Gefäßes mit Hilfe des Vortexmischers vermenget. Nach der Inkubation erfolgte wieder ein Durchmischen der Proben mit dem Vortexmischer, um eine vollständig homogen vermengete Lösung zu erhalten. Um die Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen anfärben zu können, wurden jeweils 50 µl Lösung aus einem Ansatz in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um Proben für beide Farbstoffe, Annexin V-FITC und Fluo-3/AM, zu erhalten. Die Mikrotiterplatte diente zur Zentrifugation der Proben bei 23°C, 1600 (rpm) Umdrehungen pro Minute, für insgesamt 3 Minuten. Der Überstand wurde verworfen.

Das weiter beschriebene Verfahren gilt für die Färbung mit Annexin V-FITC (für Fluo-3/AM siehe 2.2.3)

Der Fluoreszenzfarbstoff Annexin V-FITC und der Annexin-Waschpuffer (AWP) wurden im Verdünnungsverhältnis 1:200 angesetzt. Die Erythrozyten wurden mit jeweils 150 µl beladen. Eine weitere Inkubation von 20 Minuten in Dunkelheit bei 37°C erfolgte vor der Analyse im Durchflusszytometer.

2.2.2 FACS Analyse – Durchflusszytometrie

In den späten 1960er Jahren wurde der erste Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) in Betrieb genommen. Nun konnten aus Blutproben angefärbte Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden [226].

Fluorescence Activated Cell Sorting beschreibt das Prinzip der fluoreszenzgesteuerten Durchflusszytometrie mit der Zellen im Flüssigkeitsstrom quantitativ analysiert und aufbereitet werden können. In den durchgeführten Experimenten lag der Fokus auf fluoreszenzmarkierten Erythrozyten und ihren Eigenschaften während des programmierten Zelltodes.

In der Durchflusskammer trifft der Laserstrahl auf die Zellen, die in einer Suspension nacheinander durch die Messkammer gesogen werden [227].

Die zu untersuchenden Zellen müssen für die Bestrahlung mit dem Laser in der Messkammer zentriert und einzeln vorliegen. Es wird das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung genutzt [227].

Das strömungstechnische System des Durchflusszytometers besteht aus zwei Einheiten: Einem Mantel- oder Hüllflüssigkeitssystem (sheath fluid) und der Probenflüssigkeit [227]. Die zellhaltige Probenflüssigkeit wird in den Hüllflüssigkeitsstrom gesogen, gelangt durch Druckdifferenzen in die Messkammer und die Zellen werden durch Beschleunigung einer laminaren Strömung hintereinander aufgereiht [227]. Die Gesetzmäßigkeit der laminaren Strömung besagt, dass zwei ineinander injizierte Flüssigkeiten in Bewegung ihre relative Position behalten und sich nicht vermischen [228].

Die Durchflussrate (Zellen/Sekunde) hängt von Druck und Querschnitt der Messküvette ab. Die Flussgeschwindigkeit liegt bei 6 Meter/Sekunde. Es wurden jeweils 50.000 Zellen pro Messung erfasst.

Durch die Bestrahlung der einzelnen Zellen entsteht Streulicht und Fluoreszenzlicht, bei entsprechender Fluoreszenzmarkierung der Zellen.

Das optische System des Durchflusszytometers besteht aus Streulicht- und Fluoreszenzlichtdetektoren [227]. Das Streulicht (engl. Scatter) wird in zwei unterschiedlichen Ebenen gemessen. Der Forward Scatter (FSC) Detektor liegt in derselben Achse der Richtung des Laserstrahls zur Bestimmung der Zellgröße

[228]. Der Side Scatter (SSC/orthogonal) welcher hauptsächlich von Granularität und Zellstruktur beeinflusst wird detektiert das Streulicht, welches im 90° Winkel zur Zelle gemessen wird [228].

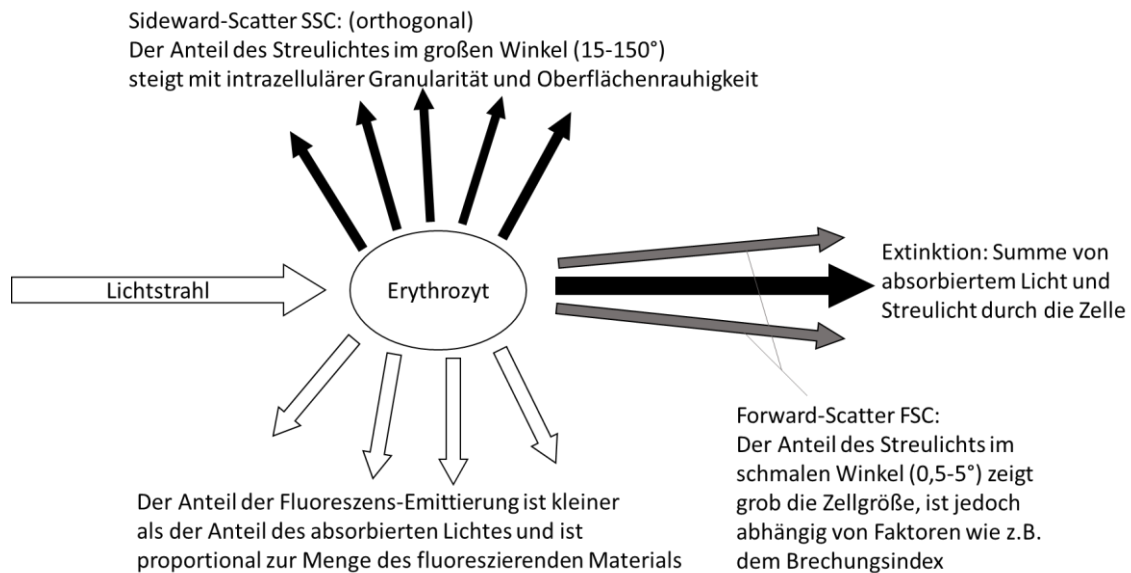


Abbildung 9: FACS Interaktion von Licht und Zelle [228]

Die bestimmbar Parameter sind die relative Größe durch den FSC, die relative Granularität/Zellstruktur durch den SSC und die relative Fluoreszenzintensivität durch die Fluoreszenzkanäle: FL1-4 [228].

Fluorochrome werden vom 488nm Argon-Laser angeregt, welche daraufhin Licht in einer höheren Wellenlänge aussenden, diese werden von den Fluoreszenzdetektoren FL1-4 erfasst [228]. Das Fluoreszenzlicht wird wie der SSC im 90° Winkel gestreut und durch dichroitische Spiegel (engl. dichroics / beamsplitters), welche nur eine bestimmte Wellenlänge durchlassen, teils filtriert und teils reflektiert [228].

Es erfolgt eine Verteilung auf die unterschiedlichen Fluoreszenzdetektoren/-kanäle (FL). Die Fluoreszenzdetektoren sind Photomultiplier Tubes (PMTs), welche jeweils mit einem Bandpassfilter versehen sind [228]. Der Bandpassfilter sorgt dafür, dass nur Licht eines entsprechenden Wellenlängenbereichs passiert. PMTs werden für orthogonale Lichtstreuung (SSC) und Fluoreszenzsignale genutzt [228].

Die erfassten Wellenlängen sind wie folgt auf ihr Maximum eingestellt:

Die FSC- und SSC Detektoren erreicht das kurzwellige Licht bei 488/10nm (blau)

FL-1: 530/30nm (grün)

FL-2: 585/42nm (gelb)

FL-3: >670nm (rot)

FL-4: 661/16nm (orange)

[228]

Sobald eine Zelle in den Strahl des Lasers eintritt und die Licht- oder Fluoreszenzstreuung beginnt, wird ein Spannungsimpuls generiert. Die Erzeugung des elektrischen Stroms ist proportional zu Lichtsignal oder Photon, welche auf die PMTs treffen [227, 228].

PMTs sind die zentrale Einheit der Umwandlung von Lichtsignalen in Spannungssignale. Die Signale können durch Spannungszugabe der PMTs verstärkt werden, sodass der elektrische Spannungsimpuls einem digitalen Wert über den Analog-zu-Digital Converter (ADC) zugeordnet werden kann. Anschließend erfolgt die Auswertung über den Computer [227, 228].

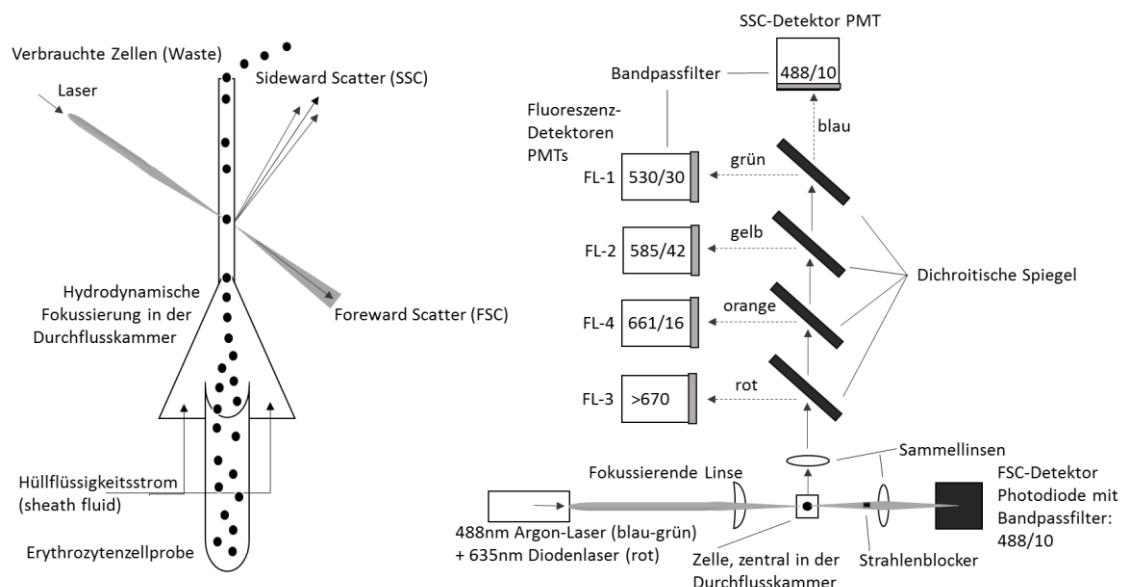


Abbildung 10: Allgemeingültiges optisches System eines Durchflusszytometers, nach [227, 228]

Mit der verwendeten Software Cell Quest Pro wurden die Messergebnisse graphisch dargestellt. Nach der Analyse wurden die Daten mit dem Programm Excel statistisch ausgewertet.

Die Geräteangaben und Messungen im BD FACS-Calibur™ erfolgten nach dem Handbuch von Becton Dickinson and Company, 2007.

Ein Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht in einem für ihn bestimmten Wellenlängenbereich. Im Fluoreszenzfarbstoff werden Elektronen angeregt und durch Absorption von Photonen eines Laserstrahls auf ein höheres Energieniveau gebracht, um nach kurzer Zeit wieder auf ihr Ursprungsniveau abzusinken [228]. Dieses geschieht unter Emission der überschüssigen Energie in Form von Photonen [228].

Die Stärke des erfassten Fluoreszenzsignals, durch Photodetektoren in elektrischen Strom gewandelt, ist proportional zur Anzahl der fluorochromgebundenen Zellen und der hiervon ausgehenden Lichtintensität [229].

Es existieren unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, welche je nach Farbstoff auf bestimmte Zelleigenschaften spezialisiert sind. Grundsätzlich werden die Zellen mit Antikörpern oder Proteinen markiert, an welchen die Fluorochrome gebunden sind. Je nach Ausstattung des Gerätes und Wellenlänge des spezifischen Lasers kann nur eine variable Anzahl an Fluochromen sichtbar gemacht werden.

Das Gerät des Physiologischen Instituts Tübingen stammt von der Firma Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland (BD FACS-Calibur™ Flow Cytometer REF 342975).

Die Lichtquelle des genutzten Gerätes ist ein 488nm Argon-Ionen-Laser (blau-grüner Spektralbereich). Zusätzlich gibt es einen 635nm- Diodenlaser, welcher für Farben im roten Spektralbereich geeignet ist. Dieses ermöglicht eine simultane Analyse von maximal vier Farben.

2.2.3 Bestimmung des intrazellulären Kalziumgehalts mit Fluo-3/AM

Das intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+}) wurde mit Hilfe des Fluo-3/AM (Acetoxymethyl) Esters gemessen. Der membranpermeable Fluo-3/AM-Ester dringt in die Zellen ein und wird dort durch unspezifische Esterasen zu freiem Fluo-3 hydrolysiert um

dann mit den intrazellulären Kalziumionen zu interagieren. Das Fluo-3 besitzt die Fähigkeit durch die Bindung von Kalzium mit bis zur vierzigfachen Intensität verglichen zum Ausgangszustand zu fluoreszieren. Da es nun nicht mehr membranpermeabel ist, ist sichergestellt, dass nur intrazelluläres Kalzium in der Durchflusszytometrie dargestellt wird.

Es wurde jeweils 1 ml Ringerlösung inklusive der Testsubstanzen und 4 µl Erythrozytenzellkonzentrat in die Eppendorf-Gefäße pipettiert. Diese Ansätze wurden für 24 oder 48 Stunden bei 37°C inkubiert und nach der Inkubation jeweils 50 µl aus einem Ansatz in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert.

In der 96-Mikrotiterplatte wurden die Ansätze zentrifugiert (23°C, 1600 rpm, 3 min) und der Farbstoff Fluo-3/AM zum Annexin-Waschpuffer (AWP) mit 5 mM CaCl₂ hinzugegeben.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in Dunkelheit bei 37 °C für 30 min. Im Durchflusszytometer wurde die Verbindung mit dem 488nm Argon-Ionen-Laser angeregt und die Ca²⁺-abhängige Fluoreszenzintensivität durch Emission bei 530 nm im FL1-Kanal gemessen.

2.2.4 Annexin V-Bindung und Messung der Zellgröße (FSC)

In der Durchflusszytometrie wird fluochromgebundenes Annexin V für die Detektion der Phosphatidylserin-Exposition genutzt.

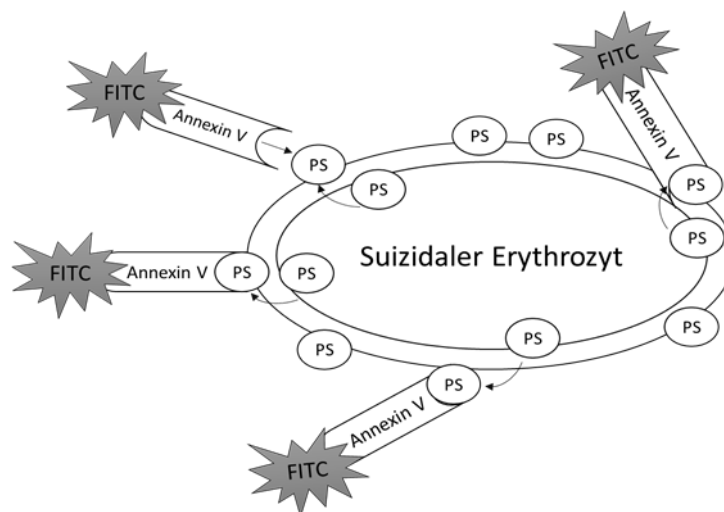


Abbildung 11: Bindung von FITC gekoppeltem Annexin V an Phosphatidylserin (PS)

Phosphatidylserin (PS) ist bei nicht apoptotischen Zellen in der inneren Membranseite der Lipiddoppelschicht lokalisiert. Mit Beginn der Apoptose kommt

es zu einer veränderten Anordnung der Membranphospholipide [230]. Phosphatidylserin wird auf der äußeren Membranseite exprimiert und dient als Bindungsstelle für Annexin V [202, 231]. Makrophagen können mit Hilfe von PS-Exposition suizidale Zellen erkennen und diese phagozytieren. Wenn Erythrozyten den Prozess der Eryptose beginnen, exponieren auch sie PS an der Außenseite der Membran [4].

Das Protein Annexin V bindet Ca^{2+} -abhängig und mit hoher Affinität an Phosphatidylserin [231, 232].

Das Anregungsmaximum des an Annexin V gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) liegt nahe der 488 nm-Wellenlänge des Argon-Lasers. Eine Anregung mit dieser Wellenlänge führt zu einer starken FITC-Emission, welche bei 530/30 nm im FL-1 Kanal gemessen wird. Die Zellgröße wird mittels Forward Scatter (FSC) bestimmt [231].

2.2.5 Hämolysemessung

Nach Inkubation erfolgte die Zentrifugation der Ansätze bei Raumtemperatur. Vorsichtig wurden die Proben entnommen und der Überstand abpipettiert. Die Hämolyse wurde mit Hilfe des Hämoglobingehalts (Hb) im Überstand bestimmt. Für die Vergleichskontrolle wurde eine Verdünnungsreihe als Standardkurve erstellt.

Die Absorption der Erythrozyten, welche in destilliertem Wasser mit Hilfe des Vortexmischers lysiert wurden, wurde als 100 % Hämolyse definiert.

Für 0 % Hämolyse wurde reines destilliertes Wasser verwendet. Es wurde eine prozentuale Hämolyse-Standardkurve erstellt. Für die Verdünnungsreihe wurden insgesamt je 100 μl pipettiert, zum Vergleich wurden vom Überstand der Proben ebenfalls 100 μl mit den verschiedenen Medikamentenkonzentrationen verwendet.

Die Messung im ELISA-Plattenlesegerät (der Firma BioTec) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt.

Die Hämolyse in Prozent und Absorption wurden miteinander verglichen. Im Folgenden konnte der prozentuale Anteil der Hämolyse im Überstand der unterschiedlichen Ansätze errechnet werden.

2.3 Statistik

Arithmetische Mittel und Standardfehler wurden für die Datenpräsentation errechnet. Für die statistische Analyse des Vergleichs zweier Versuchsreihen wurde der gepaarte und ungepaarte t-Test genutzt. Beim Vergleich mehrerer experimenteller Reihen wurde die Analyse mit dem ANOVA-Test durchgeführt. p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

„n“ beschreibt die Anzahl der unterschiedlichen Zellproben der Erythrozytenkonzentrate. Bei jedem Experiment wurde eine entsprechende Kontrolle mitgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Mitotan induzierte Eryptose

Die experimentellen Ergebnisse zeigen den eryptotischen Effekt des Zytostatikums Mitotan auf humane Erythrozyten *in vitro*. Die Versuchskonzentrationen von 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml Mitotan wurden bezüglich den klinisch verwendeten Mitotankonzentrationen gewählt, welche im therapeutischen Grenzbereich von 14 – 20 µg/ml liegen [233].

Es konnte ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abbildung 12/13) und eine Exposition von Phosphatidylserin (PS) (Abbildung 14/15) nach Inkubation über die Dauer von 24 Stunden gemessen werden.

Zusätzlich wurden zur Untersuchung weiterer Mechanismen des Zelltods die eryptoseinhibierenden Substanzen N-Acetylcystein, Clotrimazol und zVAD (Abbildung 17), sowie der eryptoseinduzierende Kalziumionophor, Ionomycin (Abbildung 20) genutzt.

3.1.1 Der Einfluss von Mitotan auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Mitotan bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in Erythrozyten. Abbildung 12 zeigt den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei einer 24-stündigen Exposition gegenüber Mitotan. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler der Erythrozytenzellproben mit Mitotan in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml, der DMSO-Kontrolle und der Ringer-Kontrolle für n = 5. Statistische Signifikanz erreicht der Anstieg der Fluo-3 Fluoreszenz ab einer Mitotankonzentration von 10 µg/ml ($p < 0,001$) [234].

Für die Darstellung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler der Fluo-3 Fluoreszenz in relativen Einheiten ermittelt. Diese liegen für die Ringerkontrolle ohne Mitotan bei $19,2 \pm 0,2$, mit 1 µg/ml Mitotan bei $19,0 \pm 0,4$, mit 5 µg/ml Mitotan bei $26,6 \pm 1,8$, mit 10 µg/ml Mitotan bei $46,7 \pm 1,8$, und mit 15 µg/ml Mitotan betragen sie $61,6 \pm 5,2$.

Die Mittelwerte \pm Standardfehler der Fluo-3 Fluoreszenz in relativen Einheiten betragen in der DMSO-Kontrolle $18,6 \pm 0,3$.

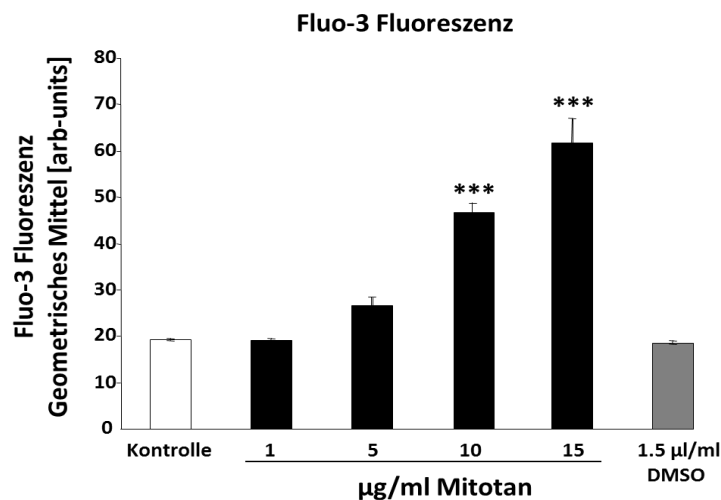


Abbildung 12: Intrazellulärer Kalziumgehalt unter Einwirkung von Mitotan

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 5$) der Fluo-3 Fluoreszenz (arbitrary units) in Erythrozyten, nach 24 Stunden Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, links) und mit Mitotan in den Konzentrationen 1 - 15 $\mu\text{g/ml}$ (schwarze Balken, mittig) und in der DMSO-Kontrolle (1,5 $\mu\text{l/ml}$, graue Balken, rechts). ***($p < 0,001$, ANOVA) zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollwerten (weißer Balken) in Abwesenheit von Mitotan [234].

In dem Histogramm der Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Fluo-3 Fluoreszenzintensität gegenüber der Erythrozytenanzahl nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit Mitotan dargestellt. Der graue Schatten repräsentiert den Anteil der Erythrozyten nach Inkubation ohne Mitotan. Die schwarze Linie im Originalhistogramm zeigt die Intensität der Fluo-3 Fluoreszenz nach Inkubation mit Mitotan, welche in der Mehrzahl der Erythrozyten gesteigert ist.

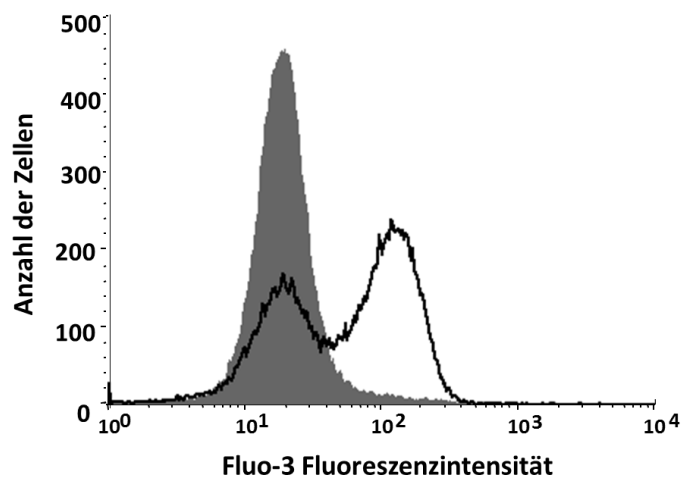


Abbildung 13: Wirkung von Mitotan auf die Kalziumkonzentration in Erythrozyten

Das Histogramm zeigt die Fluo-3 Fluoreszenz in Erythrozyten nach Inkubation über 24 Stunden in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und unter (schwarze Linie) Zugabe von Mitotan in der Konzentration 15 $\mu\text{g/ml}$ [234].

3.1.2 Wirkung von Mitotan auf die Phosphatidylserin (PS)-Exposition und Annexin V-Bindung

Mitotan bewirkt die Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Erythrozytenmembran. In Abbildung 14 ist die Auswirkung von Mitotan auf die Annexin V bindenden Erythrozyten nach Inkubation von 24 Stunden dargestellt [234]. Die verwendeten Konzentrationen von Mitotan betragen 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 15 $\mu\text{g/ml}$. Ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan sind die Werte der Annexin V bindenden Zellen statistisch signifikant ($p < 0,001$), dargestellt in Prozent (%).

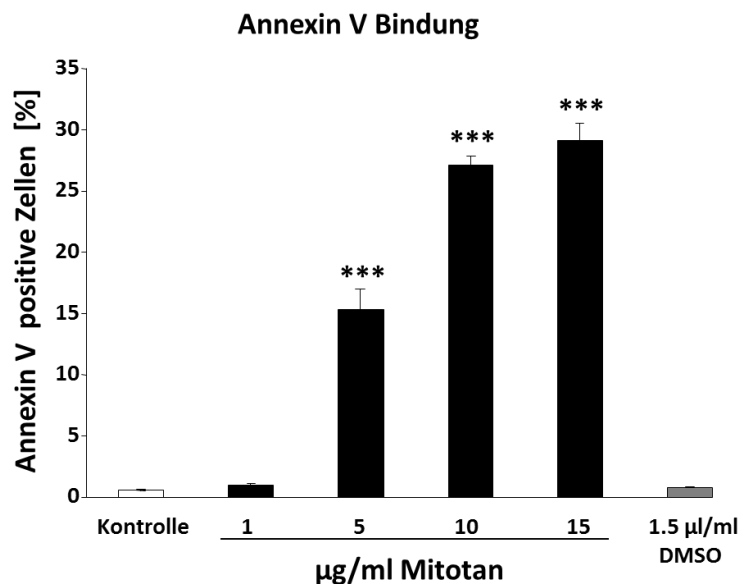


Abbildung 14: PS-Exposition humaner Erythrozyten unter dem Einfluss von Mitotan

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 5$) der Annexin V-Bindung an das PS der Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (weißer Balken, links) und mit Mitotan in den Konzentrationen 1 - 15 $\mu\text{g/ml}$ (schwarze Balken, mittig) und in der DMSO-Kontrolle (1,5 $\mu\text{l/ml}$, graue Balken, rechts). ***($p < 0,001$, ANOVA) zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollwerten (weißer Balken) in Abwesenheit von Mitotan [234].

Abbildung 14 zeigt die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler des prozentualen Anteils der Annexin V bindenden Zellen, $n = 5$. Die Mittelwerte der PS-exponierenden Zellen liegen in der Kontrolle ohne Mitotanzugabe bei $0,5 \pm 0,04$ %, mit einer Mitotankonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ bei $0,9 \pm 0,1$ %, für die Proben mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan bei $15,3 \pm 1,6$ %, für 10 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan bei $27,1 \pm 0,7$ %, und für 15 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan bei $29,1 \pm 1,4$ % und für die DMSO-Kontrolle $0,8 \pm 0,03$ %.

Das Histogramm der Abbildung 15 verdeutlicht die Auswirkungen auf die PS-Bindung nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit Mitotan. Die Ergebnisse konnten mit einer Stichprobenanzahl von $n = 5$ belegt werden. Der graue Schatten zeigt eine niedrigere Annexin V Fluoreszenzintensität von Erythrozyten der Kontrollreihe ohne Mitotan, im Gegensatz zu den mit Mitotan inkubierten Zellen. Die schwarze Linie entspricht den Erythrozyten, welche mit einer Konzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ Mitotan inkubiert wurden. Es ist ersichtlich, dass ein erheblicher Anteil der Erythrozyten eine stärkere Annexin V Fluoreszenzintensität besitzt, welches der PS-Exposition, einem charakteristischen Mechanismus der Eryptose entspricht.

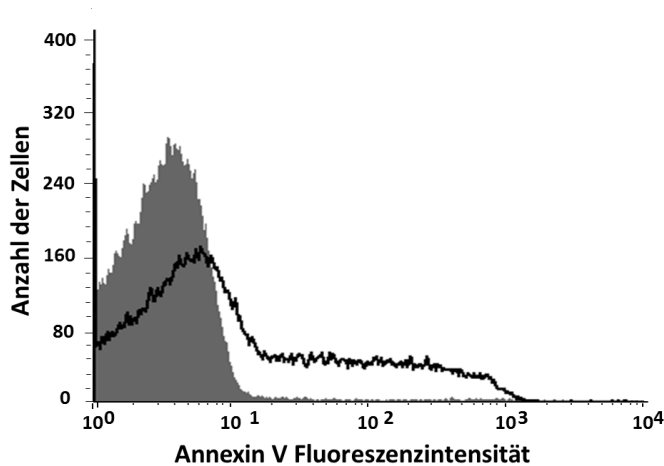


Abbildung 15: Wirkung von Mitotan auf die Phosphatidylserin (PS)-Exposition

Das Histogramm zeigt die Annexin V gebundenen Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und mit Mitotan (schwarze Linie) in der Konzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ [234].

3.1.3 Der Einfluss des extrazellulären Kalziums (Ca^{2+})

Um die erhobenen Daten zu überprüfen und um zu analysieren, ob der eryptotische Effekt von Mitotan teilweise oder komplett Ca^{2+} -abhängig ist, wurden Experimente in Ca^{2+} -freier Lösung durchgeführt. Die Erythrozyten wurden für 24 Stunden mit Mitotan in den Konzentrationen $1 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ und $15 \mu\text{g/ml}$ inkubiert ($n = 5$). Es wurden drei Inkubationslösungen erstellt. Verglichen wurden mit Mitotan inkubierte Erythrozyten in einer Ringerlösung mit 1 mM extrazellulärem Kalzium und einer Ca^{2+} -freien Lösung einmal ohne und einmal unter Zugabe des Ca^{2+} -Chelators EGTA (1 mM). Die Fluo-3 Fluoreszenzwerte stiegen bei einer Mitotankonzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium signifikant von $19,4 \pm 0,7$ auf $29,5 \pm 2,1$ [234].

In Abwesenheit extrazellulären Kalziums konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der intrazellulären Fluo-3 Fluoreszenz der Erythrozyten ohne und mit Mitotaneinwirkung gemessen werden. In Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium lagen die Fluo-3 Werte der unbehandelten Erythrozyten bei $20,0 \pm 0,9$, im Vergleich zu den mit Mitotan ($15 \mu\text{g/ml}$) inkubierten Zellen von $24,3 \pm 0,2$ [234]. Der eryptotische Effekt von Mitotan ist in der Ca^{2+} -freien Lösung abgeschwächt.

Wie Abbildung 16 verdeutlicht ist die Annexin V-Bindung, unabhängig von EGTA, nach Mitotanbehandlung in den Ca^{2+} -freien Lösungen signifikant abgeschwächt [234]. Bei einer Konzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ Mitotan betrug nach 24-stündiger Inkubationszeit der prozentuale Anteil der Annexin V bindenden Erythrozyten in Ca^{2+} -haltiger Lösung $19,46 \pm 1,18 \%$, in Ca^{2+} -freier Lösung ohne EGTA $8,02 \pm 0,47 \%$ und in Ca^{2+} -freier Lösung mit EGTA $11,00 \pm 0,42 \%$.

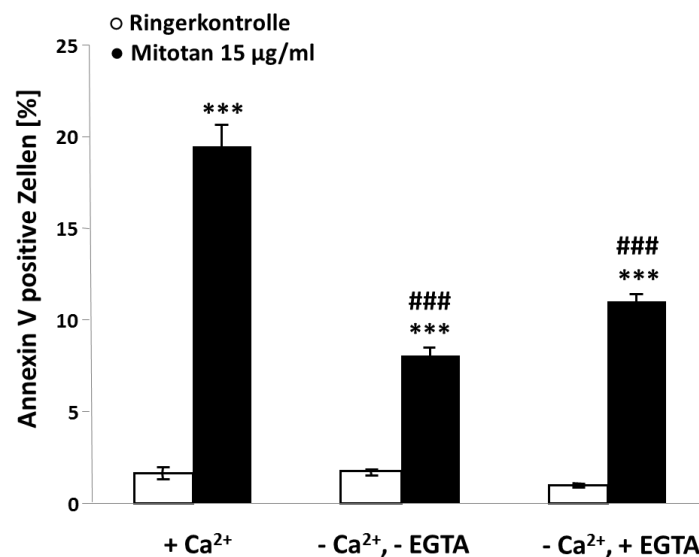


Abbildung 16: Annexin V bindende Erythrozyten unter Kalziumdepletion

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$) der Annexin V-Bindung an Erythrozyten nach 24 Stunden Inkubation in Ringer ohne (weiße Balken) und mit Mitotan (schwarze Balken) in der Konzentration $15 \mu\text{g/ml}$, in Anwesenheit von Kalzium (links) und in Abwesenheit von Kalzium (mitte und rechts) sowie unter Zugabe von 1 mM EGTA (rechts). *($p < 0,05$), ***($p < 0,001$, ANOVA) zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollwerten (weiße Balken) in Abwesenheit von Mitotan. ### ($p < 0,001$) zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber den jeweiligen Werten in Anwesenheit von Kalzium (ANOVA) [234].

Unabhängig von EGTA ist der Anteil der Annexin V bindenden Erythrozyten in Ca^{2+} -depletierter Lösung nach Inkubation mit Mitotan ($15 \mu\text{g/ml}$) verglichen zur Ringerkontrolle signifikant erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch

Mitotan verursachte PS-Exposition teilweise, jedoch nicht komplett von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängt. Daraus lässt sich folgern, dass zusätzlich ein Ca^{2+} -unabhängiger Mechanismus aktiviert wird und zum Erythrozytenzelltod führen kann.

3.1.4 Weitere Mechanismen von Mitotan und Inhibitoren des erythrozytären Zelltods

Um nach weiteren Ursachen in Bezug auf die PS-Exposition nach Behandlung mit Mitotan zu forschen wurden zusätzliche Experimente durchgeführt.

In diesen Versuchen wurden Erythrozyten zu eryptoseinhibierenden Substanzen, dem Antioxidans N-Acetylcystein (N-AC), dem Kaliumkanalinhibitor Clotrimazol und dem Caspaseinhibitor zVAD, gegeben [234]. Um herauszufinden, ob diese Substanzen den Effekt von Mitotan beeinflussen, wurde mit den jeweiligen Inhibitoren eine Kontrollreihe ohne Mitotan sowie eine Versuchsreihe mit Mitotan in der Konzentration von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ untersucht ($n = 5$).

Die Experimente sollten zeigen, ob der eryptotische Effekt von Mitotan, durch das Inhibieren von Bay 11-7082 und Parthenolide durch N-Acetylcystein (N-AC) [187, 224], ebenfalls zu einer Hemmung der Eryptose führt. Der Kaliumkanalblocker Clotrimazol inhibiert die Blei-induzierte Eryptose [225].

Die Abbildung 17 zeigt den prozentualen Anteil der Annexin V bindenden Zellen in den Proben der Mitotankontrolle mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verglichen mit den Ergebnissen unter Zugabe von N-AC (1 mM), Clotrimazol (5 μM) und zVAD (10 μM) nach 24-stündiger Inkubation [234]. Wie in Abbildung 17 dargestellt, ist kein signifikanter Effekt von N-AC und Clotrimazol, auf die durch Mitotan ausgelöste Eryptose, zu verzeichnen.

In den Versuchen zVAD (10 μM) plus Mitotan von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist kein signifikanter Unterschied, jedoch ein deutlicher prozentualer Anstieg der Annexin V bindenden Erythrozyten nachweisbar. Die errechneten Mittelwerte \pm Standardfehler in Prozent nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ergaben in der Ringerkontrolle $1,8 \pm 0,1$ %, in der DMSO-Kontrolle $1,7 \pm 0,1$ %, unter Zugabe von Mitotan $22,2 \pm 0,8$ %, nach alleiniger Behandlung mit zVAD $1,6 \pm 0,1$ % und nach Inkubation von zVAD mit Mitotan $29,0 \pm 2,7$ %.

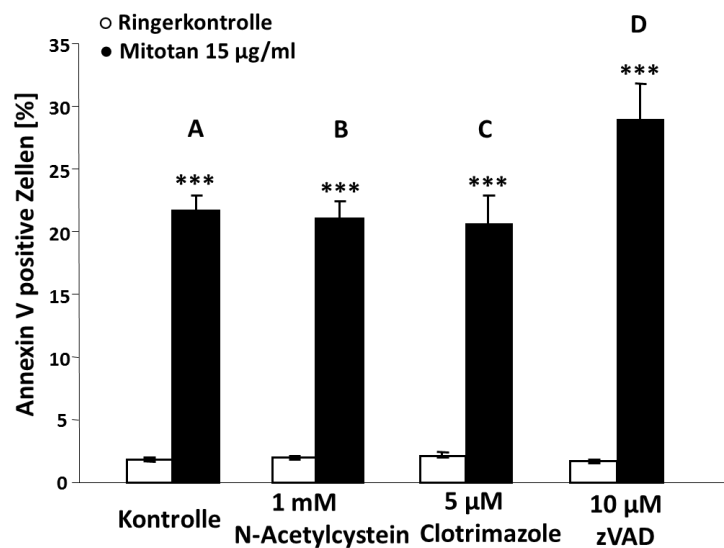


Abbildung 17: Anteil der Annexin V bindenden Erythrozyten unter Einwirkung von Mitotan in Kombination mit N-Acetylcystein, Clotrimazol und zVAD

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$) der Annexin V bindenden Erythrozyten nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (weiße Balken) und mit Mitotan (schwarze Balken) in der Konzentration 15 $\mu\text{g/ml}$. Verglichen wurden die Mittelwerte der Kontrolle ohne weitere Substanz (A) mit den Annexin V positiven Zellen unter Zugabe von 1 mM N-Acetylcystein (B), 5 μM Clotrimazol (C) und 10 μM zVAD (D). ***($p < 0,001$) zeigen einen signifikanten Unterschied bezogen auf die Ergebnisse in Abwesenheit von Mitotan (ANOVA) [234].

Um diese Ergebnisse besser bewerten zu können, wurden weitere Experimente mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD durchgeführt, welche als Kontrolle für dessen inhibierende Wirkung dienen. Erythrozyten wurden für 48 Stunden jeweils ohne und mit zVAD (10 μM) in Ringerlösung, sowie unter Zugabe der eryptose-auslösenden Substanz Sunitinib (20 μM) inkubiert ($n = 6$). Sunitinib ist ein Kinaseinhibitor, welcher in vorherigen Versuchen eine eryptotische Wirkung gezeigt hat [12]. Die Mittelwerte \pm Standardfehler der durch PS-Exposition möglichen Annexin V-Bindung in Prozent betragen nach 48 Stunden in der Ringerkontrolle $1,5 \pm 0,2 \%$, unter Zugabe von Sunitinib $37,5 \pm 3,4 \%$ und in den Proben der zVAD-Kontrolle $1,3 \pm 0,3 \%$, sowie zVAD mit Sunitinib $21,7 \pm 4,3 \%$ [234]. Der Pancaspase-Inhibitor zVAD vermindert die durch Sunitinib ausgelöste Eryptose [234].

3.1.5 Zellvolumen und Ionomycin

Das mittlere Zellvolumen wurde im Forward Scatter (FSC) Kanal detektiert und mit Hilfe der FACS-Analyse ausgewertet.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, sind nach 24-stündiger Behandlung mit Mitotan keine signifikanten Unterschiede des Zellvolumens im FSC-Kanal nachzuweisen. Nach 48 Stunden ab einer Mitotankonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) waren die Messungen des FSC-Signals signifikant, Abbildung 20.

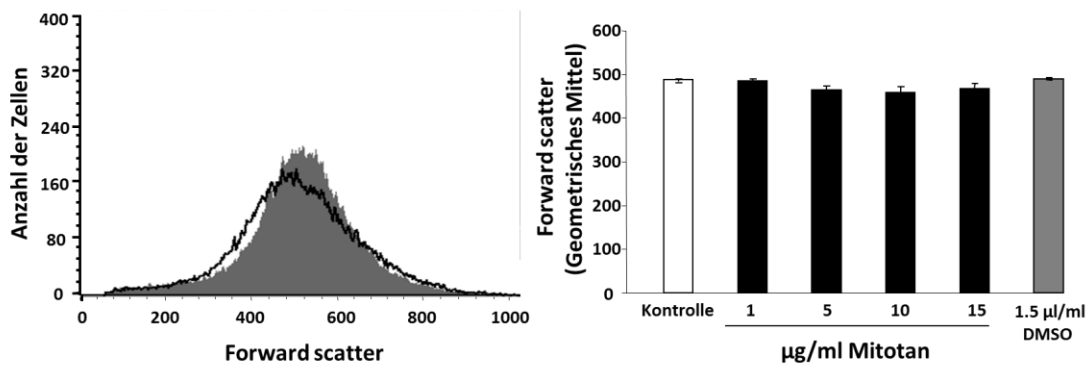


Abbildung 18: Mitotanauswirkung auf das Zellvolumen im FSC nach 24 Stunden

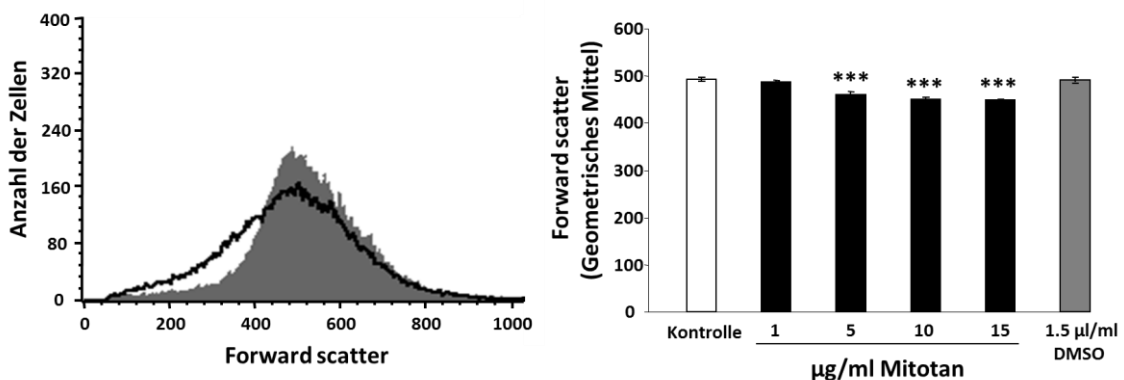


Abbildung 19: Mitotanauswirkung auf das Zellvolumen im FSC nach 48 Stunden

Die repräsentativen Originalhistogramme (links) zeigen Erythrozyten im Forward Scatter nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Abb. 19) und 48 Stunden (Abb. 20) in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und mit Mitotan (schwarze Linie) in einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$. Das Balkendiagramm (rechts) zeigt die Arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler des Forward Scatters der Erythrozyten ($n = 5$) nach 24 Stunden (Abb. 19) und 48 Stunden (Abb. 20) Inkubation in Ringerlösung (weißer Balken), mit Mitotan (schwarze Balken) in den Konzentrationen 1-15 $\mu\text{g/ml}$ und in der DMSO-Kontrolle 1,5 $\mu\text{l/ml}$ (grauer Balken). Nach 24 Stunden (Abb. 19) ist die Tendenz der Volumenminderung erkennbar, ein statistisch signifikanter Unterschied wird nicht erreicht. Statistische Signifikanz ***($p < 0,001$) wird nach 48 Stunden (Abb. 20) bei einer Mitotankonzentration ab 5 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber der Ringerkontrolle erreicht (ANOVA) [234].

Trotz des intrazellulären Anstiegs der Kalziumkonzentration nach 24 Stunden, ist zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Zellvolumenminderung im FSC nachweisbar. Um zu untersuchen ob Mitotan einen inhibierenden Effekt auf die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle und Cl^- -Kanäle hat wurden weitere Experimente mit dem Kalziumionophor Ionomycin durchgeführt [234].

Durch den Kalziumionophor Ionomycin steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration und führt zu einer Zellvolumenminderung mit abfallenden Werten im FSC. Wäre jedoch in Anwesenheit von Ionomycin und Mitotan keine erythrozytäre Volumenminderung nachzuweisen, würde dieses auf eine inhibierende Wirkung der nachgeschalteten Kanäle deuten. Die Zellgröße wurde nach einer Stunde im FSC in der Kontrollreihe ohne Ionomycin und mit Ionomycin, nach Inkubationszeit von 30 Minuten, in der Konzentration von $1 \mu\text{M}$ gemessen, jeweils ohne und mit $15 \mu\text{g/ml}$ Mitotan. In Abwesenheit von Mitotan erhöhte Ionomycin allein die Fluo-3 Fluoreszenz, des intrazellulären Kalziums (Ca^{2+}), von $20,4 \pm 0,2$ auf $75,6 \pm 6,4$ relative Einheiten ($n = 5$). Unter Anwesenheit von Mitotan und Ionomycin stieg der Wert von $25,1 \pm 2,7$ auf $110,3 \pm 6,6$ relative Einheiten ($n = 5$) [234].

In Abbildung 20 ist eine Zellschrumpfung nach Ionomycinbehandlung durch den signifikanten Abfall im FSC erkennbar [234]. Unter Behandlung von Ionomycin und zusätzlicher Anwesenheit von Mitotan konnte keine signifikante Zellvolumenminderung nachgewiesen werden. Getestet wurden $n = 5$ unterschiedliche Zellproben. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des im FSC-Kanal dargestellten Zellvolumens liegen in Abwesenheit von Ionomycin nach einer Stunde Inkubationzeit in der Ringerlösung ohne Mitotan bei $500,33 \pm 1,90$ und unter Einwirkung von Mitotan in einer Konzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ bei $528,87 \pm 7,46$. Bei Anwesenheit von Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) lag der FSC-Wert bei $242,45 \pm 26,11$ und bei zusätzlicher Anwesenheit von Mitotan ($15 \mu\text{g/ml}$) bei $520,02 \pm 11,94$. Diesen Werten entsprechend hemmt Mitotan die charakteristische Volumenminderung im Prozess der Eryptose.

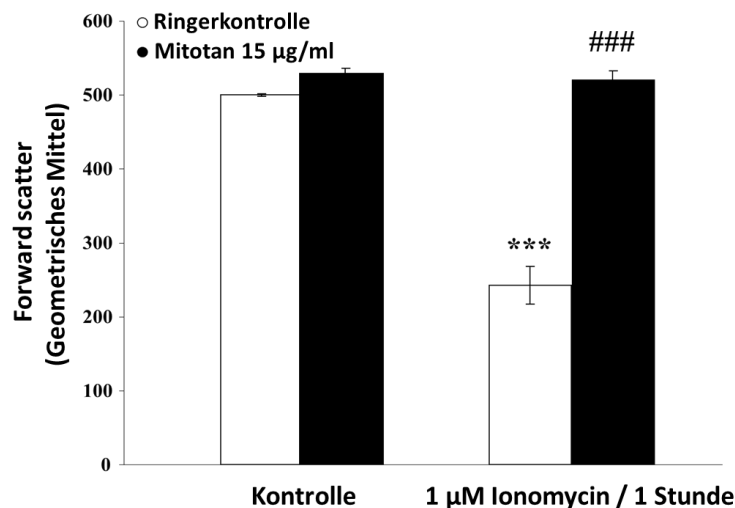


Abbildung 20: Veränderung des FSC unter Einfluss von Ionomycin

Das Balkendiagramm zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler der normierten FSC-Werte der Erythrozytenproben ($n = 5$) nach einstündiger Inkubation in Ringerkontrolle ohne (weiße Balken) und mit Mitotan (schwarze Balken) in der Konzentration $15 \mu\text{g/ml}$, sowie in Abwesenheit (linke Balken) und unter Anwesenheit (rechte Balken) von Ionomycin $1 \mu\text{M}$. ***($p < 0,001$) zeigt einen signifikanten Unterschied der FSC-Werte zwischen Abwesenheit und Anwesenheit von Ionomycin (ANOVA). ###($p < 0,001$) markiert die statistische Signifikanz unter Anwesenheit von Ionomycin ohne Mitotan mit den Werten der Mitotankonzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ [234].

3.1.6 Hämolysse

In weiteren Experimenten erfolgte die Hämolyssemessung durch die Bestimmung des Hämoglobins im Probenüberstand.

Abbildung 21 zeigt den prozentualen Anteil Annexin V bindender Erythrozyten verglichen mit dem Anteil hämolysierter Erythrozyten. Wie dargestellt, ist schon nach 2,5-stündiger Inkubation mit Mitotan in der Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ ein signifikanter Anstieg der Annexin V-Bindung nachweisbar, jedoch ist der Anteil der hämolysierten Zellen äußerst gering. Der prozentuale Anteil der hämolysierten Zellen steigt erst bei einer Mitotankonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ nach 2,5-stündiger Inkubation signifikant [234].

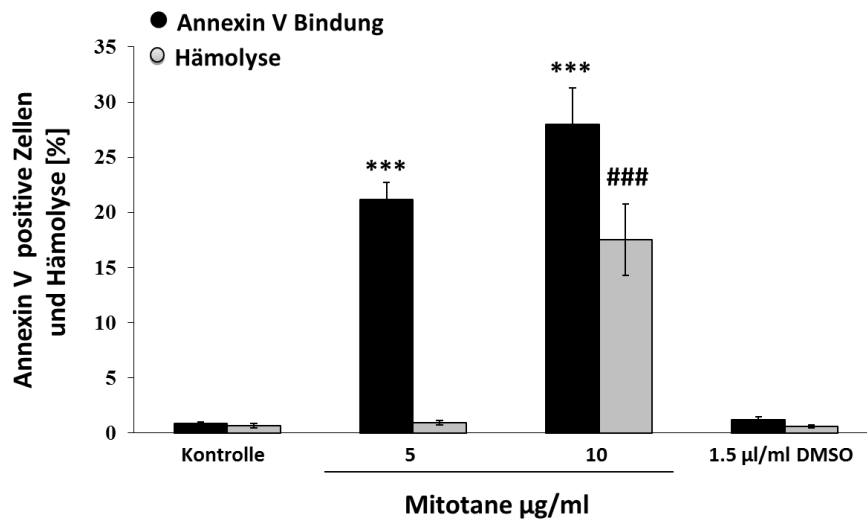


Abbildung 21: Direkter Vergleich der Annexin V-Bindung und Hämolyse in Prozent nach 2,5-stündiger Inkubation mit Mitotan

Im Balkendiagramm sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler der Annexin V bindenden Erythrozyten (schwarze Balken) und hämolysierten Zellbestandteile (graue Balken) dargestellt. Abgebildet sind die Ringerkontrolle ohne Mitotan, mit Mitotan in den Konzentrationen 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$, sowie die DMSO-Kontrolle von 1,5 $\mu\text{l/ml}$. Es wurden $n = 5$ Erythrozytenzellproben getestet, bei einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden. ***($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied der Annexin V-Bindung zur Abwesenheit von Mitotan (ANOVA), ###($p < 0,001$) markiert den Unterschied für den Anteil der hämolysierten Erythrozyten zur Kontrolle [234].

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter Mitotaneinwirkung betrug der Prozentsatz hämolysierter Erythrozyten in den Proben ($n = 5$) ohne Mitotan $0,5 \pm 0,2 \%$, bei 1 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan $0,4 \pm 0,2 \%$, bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan $20 \pm 2,6 \%$, bei 10 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan $56,7 \pm 2,5 \%$ und bei 15 $\mu\text{g/ml}$ Mitotan $62,8 \pm 2,8 \%$ [234]. Ab einer Mitotankonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ ist ein statistisch signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

3.2 Miltefosin induzierte Eryptose

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente *in vitro* mit dem Medikament Miltefosin und dessen Wirkung auf den Zelltod humaner Erythrozyten präsentiert. Die verwendeten Konzentrationen *in vitro* von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml liegen unter der maximalen Plasmakonzentration *in vivo* von 70 µg/ml. Die verwendeten Miltefosinkonzentrationen entsprechen den Konzentrationen *in vivo*, die zur Behandlung bestimmter Leishmanioseerreger genutzt werden [50], jedoch liegen sie unter dem Plasmalevel von 10 µg/ml ab welchem Miltefosin eine apoptotische Wirkung auf Tumorzellen hat [235].

Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abbildung 23/24), die Phosphatidylserin (PS)-Exposition (Abbildung 27/28), sowie die erythrozytäre Volumenminderung (Abbildung 25/26) konnten als charakteristische Merkmale der Eryptose unter Miltefosinexposition nachgewiesen werden.

In weiteren Experimenten wurde jeweils die Volumenänderung der Erythrozyten, sowie die PS-Exposition in Anwesenheit von Kalzium mit den Versuchsergebnissen unter Kalziumdepletion (Abbildung 31), wie auch Experimente unter Anwesenheit von Kalium und Kaliumdepletion (Abbildung 32/33) verglichen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Miltefosin einen eryptotischen Effekt besitzt.

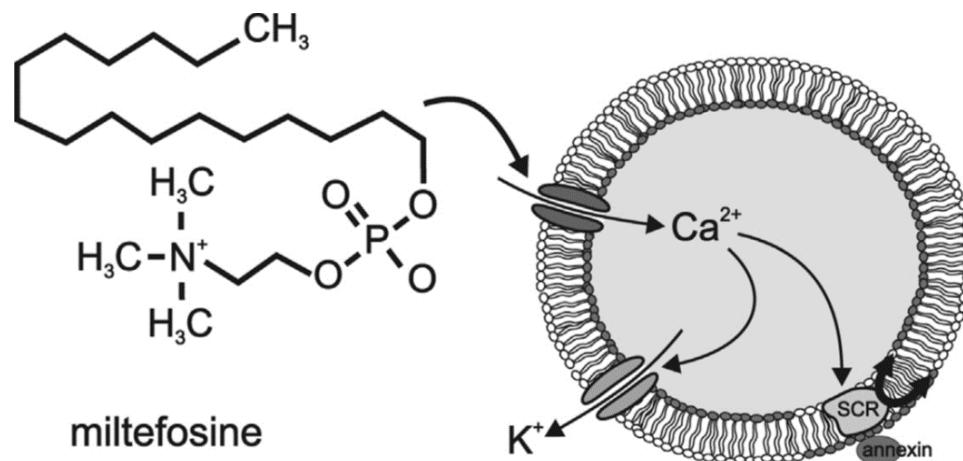


Abbildung 22: Effekt von Miltefosin auf Erythrozyten

Miltefosin bewirkt einen Kalziumeinstrom gefolgt von einem Kaliumausstrom. Im Verlauf kommt es zu einer Zellvolumenminderung und zur Umlagerung von Phosphatidylserin (PS) durch das Enzym Scramblase (SCR) in der Erythrozytenmembran [56].

3.2.1 Die Wirkung von Miltefosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Der intrazelluläre Kalziumgehalt in den Erythrozyten wurde mittels Fluo-3 Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie bestimmt. Erythrozyten wurden in Ringerlösung ohne und mit Miltefosin in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml (0,245 - 12,25 µM) für 48 Stunden inkubiert. Wie in Abbildung 24 dargestellt, besteht nach 48-stündiger Exposition der Erythrozyten gegenüber Miltefosin in einer Konzentration von 1 µg/ml kein signifikanter Unterschied der Fluo-3 Fluoreszenzwerte. Ab einer Konzentration von 2 µg/ml ist ein signifikanter Anstieg der Fluo-3 Fluoreszenz und der intrazellulären Kalziumkonzentration zu verzeichnen ($p < 0,05$) [56].

Abbildung 23 zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler der Erythrozytenproben $n = 6$. Ein deutlich statistisch signifikanter Unterschied der arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler verglichen mit den Ergebnissen der Ringerkontrolle von $21,4 \pm 0,9$ liegt bei einer Miltefosinkonzentration von 5 µg/ml mit den Werten $43,3 \pm 0,3$ ($p < 0,001$).

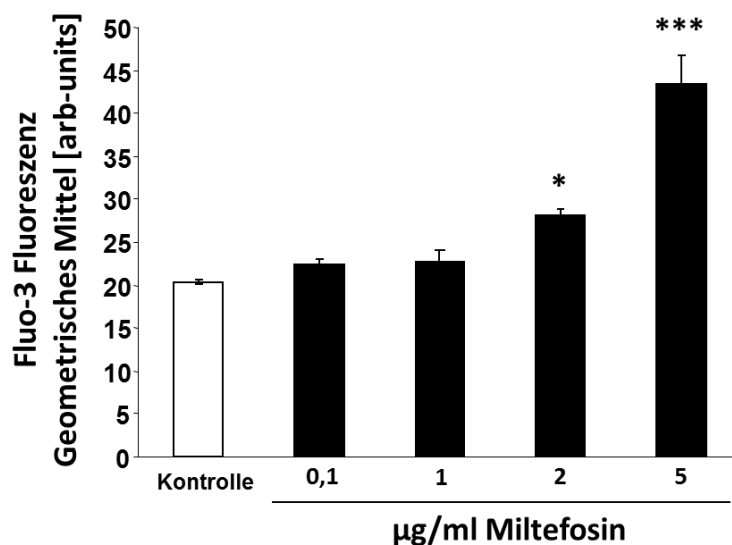


Abbildung 23: Intrazellulärer Kalziumgehalt der Erythrozyten nach Inkubation mit Miltefosin

Das Balkendiagramm zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$) der Fluo-3 Fluoreszenz (arbitrary units) nach 48-stündiger Inkubation in Ringer ohne (weißer Balken) und mit Miltefosin (schwarze Balken) in den Konzentrationen 0,1 - 5 µg/ml. *($p < 0,5$), ***($p < 0,001$) zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollwerten in Abwesenheit von Miltefosin (ANOVA) [56].

Die schwarze Linie des Histogramms in Abbildung 24 zeigt die Verteilung der Erythrozyten mittels Fluo-3 Fluoreszenz unter Anwesenheit von 5 µg/ml Miltefosin. Etwas weniger als die Hälfte der im Durchflusszytometer gemessenen Zellen zeigen eine vermehrte Fluo-3 Fluoreszenz. Die Versuchsergebnisse der Erythrozyten nach Inkubation in Ringerlösung sind als grauer Schatten dargestellt.

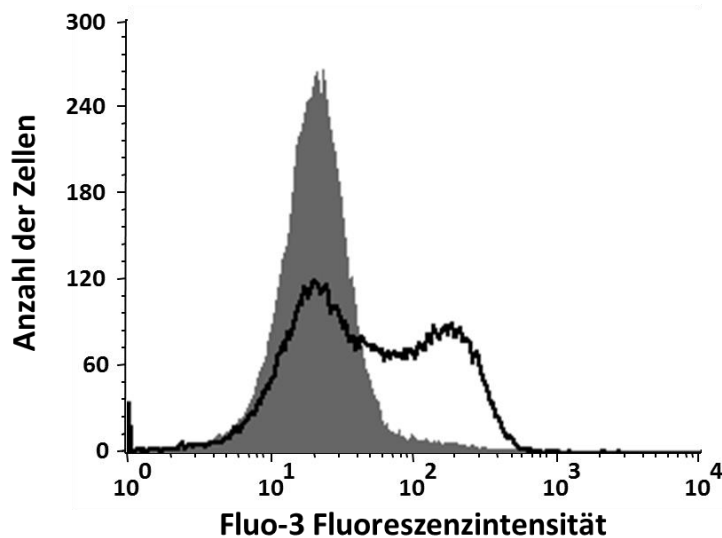


Abbildung 24: Effekt von Miltefosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Die erythrozytäre Fluo-3 Fluoreszenz nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und unter Anwesenheit (schwarze Linie) von Miltefosin bei einer Konzentration von 5 µg/ml ist im Histogramm dargestellt [56].

3.2.2 Forward Scatter (FSC)

Die Zellgröße wurde im Forward Scatter (FSC) Kanal bestimmt. Abbildung 25 veranschaulicht die Abnahme des mittleren Zellvolumens nach Miltefosininkubation über 48 Stunden. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde hierbei schon ab einer Miltefosinkonzentration von 1 µg/ml registriert ($p < 0,001$) [56]. Getestet wurden $n = 6$ unterschiedliche Zellproben. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des im FSC-Kanal dargestellten Zellvolumens liegen in der Ringerlösung ohne Miltefosin bei $467,8 \pm 5,3$ mit Miltefosin in den Konzentrationen von 0,1 µg/ml bei $467,5 \pm 3,6$, von 1 µg/ml bei $361,14 \pm 15,3$, von 2 µg/ml bei $349,28 \pm 20,32$ und der Maximalkonzentration von 5 µg/ml Miltefosin bei $300,1 \pm 8,7$.

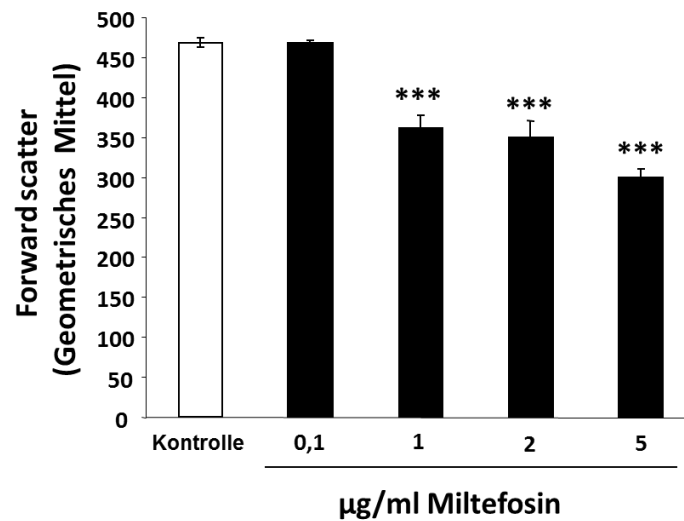


Abbildung 25: Miltefosin und das Zellvolumen gemessen im Forward Scatter Kanal

Das Balkendiagramm zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler des normierten Forward Scatters der Erythrozytenproben ($n = 6$) nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung (weißer Balken) und mit Miltefosin (schwarze Balken) in den Konzentrationen 0,1 - 5 µg/ml. Ein statistisch signifikanter Unterschied $***(p < 0,001)$ der Volumenminderung gegenüber der Ringerkontrolle wird bei einer Konzentration von 1 µg/ml erreicht (ANOVA) [56].

Das Originalhistogramm in Abbildung 26 zeigt den Unterschied des Erythrozytenvolumens ohne Zugabe von Miltefosin, dargestellt als grauer Schatten, im direkten Vergleich zur Zellgröße bei der Maximalkonzentration von 5 µg/ml Miltefosin, dargestellt als schwarze Linie. Neben den konstanten Zellgrößen in der Ringerlösung ist die Volumenminderung der Erythrozyten im Verlauf der schwarzen Linie deutlich zu erkennen.

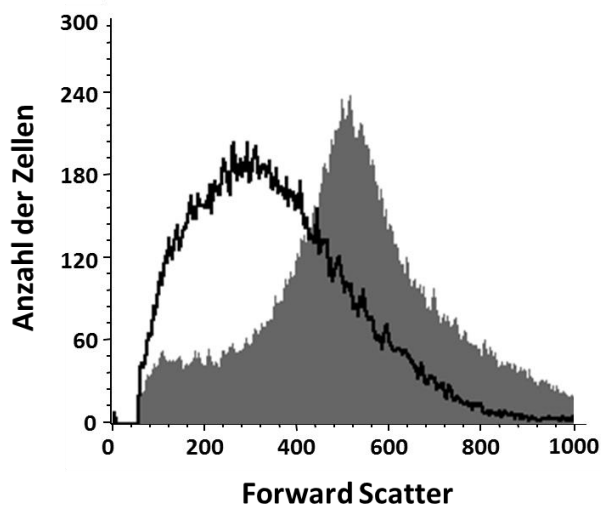


Abbildung 26: Das Erythrozytenvolumen im Forward Scatter Kanal nach Inkubation mit Miltefosin

Im Histogramm sind Erythrozyten im Forward Scatter Kanal nach 48-stündiger Inkubation dargestellt in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und mit Miltefosin (schwarze Linie) in einer Konzentration von 5 µg/ml [56].

3.2.3 Annexin V und Hämolyse

Die Phosphatidylserin-Exposition wurde mittels FITC gekoppeltem Annexin V im Durchflusszytometer untersucht. Das Originalhistogramm in Abbildung 27 verdeutlicht den Unterschied der Annexin V bindenden Zellen in Ringerlösung als grauer Schatten, gegenüber der Anwesenheit von 5 µg/ml Miltefosin als schwarze Linie, nach 48-stündiger Inkubation.

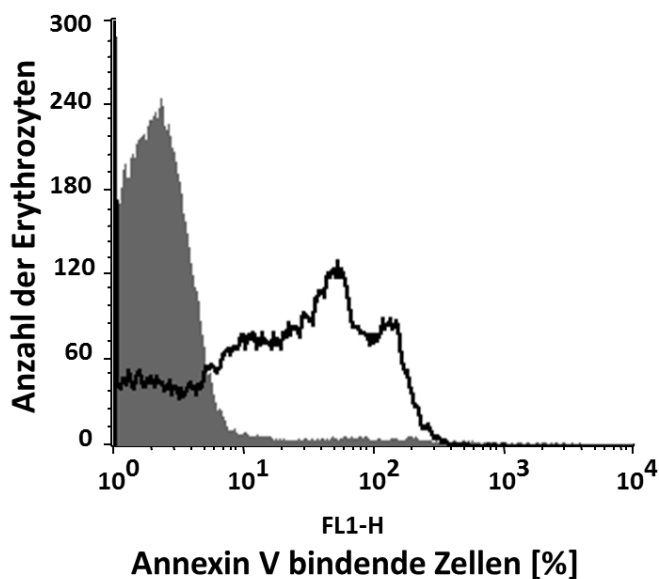


Abbildung 27: Darstellung der PS-exponierenden Erythrozyten

Das Histogramm zeigt Annexin V positive Erythrozyten im FL-1 Kanal nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in Ringerlösung ohne (grauer Schatten) und mit einer Miltefosinkonzentration von 5 µg/ml (schwarze Linie) [56].

Abbildung 28 zeigt den prozentualen Anstieg der Annexin V bindenden Erythrozyten nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit Miltefosin in verschiedenen Konzentrationen. Statistisch signifikant wird dieser Anstieg ab einer Konzentration von 2 µg/ml Miltefosin [56]. In Abbildung 28 sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler in Prozent der Annexin V bindenden Zellen, mit $n = 6$ Proben dargestellt. Die Mittelwerte in Prozent der PS-exponierenden Zellen liegen in der Kontrolle ohne Miltefosin bei $3,97 \pm 1,19$ %, bei einer Miltefosinkonzentration von 0,1 µg/ml bei $2,8 \pm 0,48$ %, in den Proben mit 1 µg/ml Miltefosin bei $7,67 \pm 1,17$ %, mit 2 µg/ml Miltefosin bei $14,28 \pm 3,31$ %, und mit 5 µg/ml Miltefosin bei $58,57 \pm 2,44$ %.

Anschließend erfolgte die Hämolysemessung durch die Bestimmung des Hämoglobins im Probenüberstand. Wie in Abbildung 28 dargestellt, steigt der

prozentuale Anteil hämolysierter Erythrozyten geringfügig, jedoch signifikant nach 48-stündiger Inkubation ab einer Miltefosinkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [56].

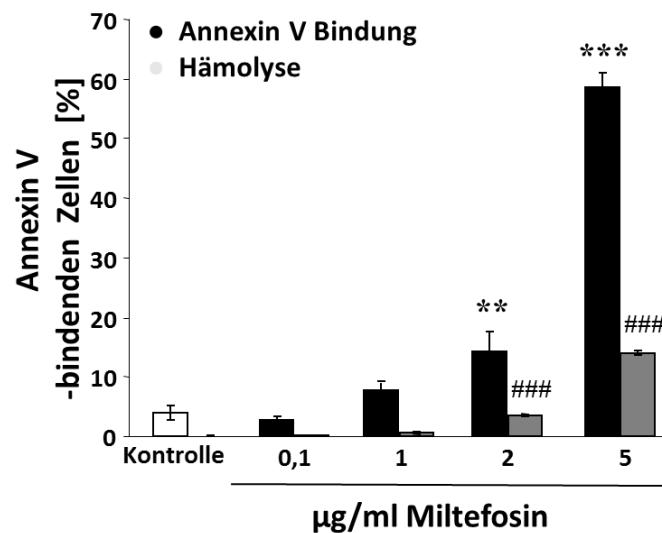


Abbildung 28: Darstellung der PS-exponierenden Erythrozyten und Hämolyse durch Miltefosin

Das Balkendiagramm zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler der Annexin V positiven Erythrozyten ($n = 6$) ohne (weißer Balken) und mit Miltefosin (schwarze Balken) in den Konzentrationen 0,1 - 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 48-stündiger Inkubation. Im Vergleich sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler des prozentualen Anteils der hämolysierten Zellen ($n = 5$) (graue Balken) dargestellt. **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied der Annexin V-Bindung in Anwesenheit von Miltefosin zur Ringerkontrolle (ANOVA). ###($p < 0,001$) markiert den signifikanten Unterschied des Anteils hämolysierter Erythrozyten unter Einfluss von Miltefosin im Vergleich zur Kontrolle [56].

3.2.4 Annexin V und Forward Scatter (FSC)

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die PS-exponierenden Zellen in Kombination mit dem ErythrozytENVolumen im Dotplot dargestellt. Der Dotplot in Abbildung 29 (links) veranschaulicht die Annexin V bindenden Erythrozyten und das Volumen mittels Messung im FSC Kanal in der Ringerkontrolle ohne Miltefosinzugabe. Der Dotplot in Abbildung 29 (rechts) zeigt den Anstieg der Annexin V-Bindung, bei gleichzeitiger Abnahme des Zellvolumens im FSC-Signal nach Miltefosinexposition von 5 µg/ml über 48 Stunden.

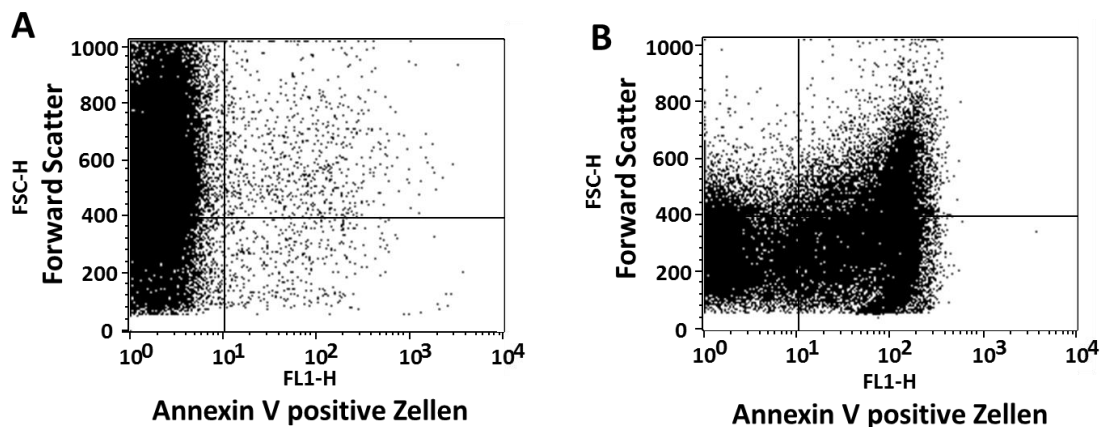


Abbildung 29: Wirkung von Miltefosin auf das ErythrozytENVolumen und die PS-Exposition

Das Original Dot Plot kombiniert die Darstellung der Parameter der Zellgröße im Forward Scatter und die im FL-1 Kanal gemessenen Annexin V-FITC bindenden Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in Ringerkontrolllösung (A) und mit der Miltefosinkonzentration von 5 µg/ml (B) [56].

Die Verlaufskinetik in Abbildung 30 zeigt die erythrozytäre PS-Exposition mittels Annexin V-Bindungen und Volumenänderungen im FSC-Kanal nach jeweils 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden. Dargestellt sind die Kontrollreihen in Ringerlösung gegenüber den jeweiligen Erythrozytenproben unter Exposition von Miltefosin in der Konzentration 5 µg/ml. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler des prozentualen Anteils der Annexin V bindenden Erythrozyten sind unter Miltefosinexposition nach 12 Stunden signifikant ($p < 0,001$). Die Mittelwerte \pm Standardfehler der miltefosinexponierten Erythrozyten im FSC-Kanal erreichen bereits nach 6 Stunden signifikante Werte

($p < 0,01$). Nach 12 Stunden sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Zellvolumenminderung im FSC-Kanal hochsignifikant ($p < 0,001$).

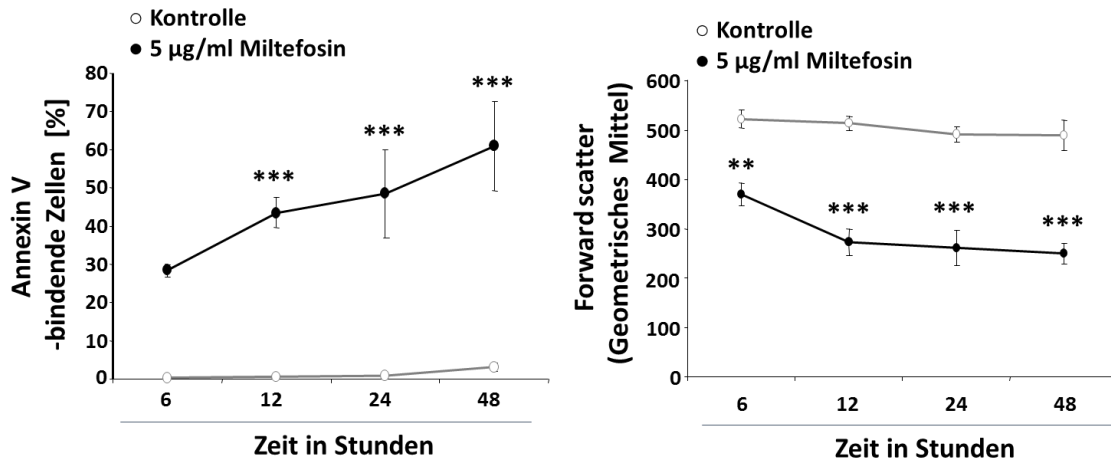


Abbildung 30: PS-exponierende Erythrozyten und Zellvolumenminderung über 48 Stunden

Das Diagramm zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 4$) der Annexin V bindenden Erythrozyten in Prozent (links) und des Erythrozytenvolumens im Forward Scatter Kanal (rechts) während der Inkubation über 48 Stunden in Ringerlösung als Kontrolle (graue Linie, weiße Kreise) und unter Miltefosinexposition bei einer Konzentration von 5 µg/ml (schwarze Linie, schwarze Kreise). Messungen wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten nach 6, 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt. ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) zeigen den signifikanten Unterschied der Ringerkontrolle in Abwesenheit von Miltefosin gegenüber den Werten in Anwesenheit von 5 µg/ml Miltefosin (ANOVA) [56].

3.2.5 Extrazelluläres Kalzium (Ca^{2+})

Um die Wirkung von Miltefosin auf typische Eryptosemechanismen, insbesondere die PS-Exposition besser zu verstehen, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Die Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium beeinflusst die Wirkung von Miltefosin. Erythrozyten wurden bei einer Miltefosinkonzentration von 2 µg/ml für 48 Stunden inkubiert, sowohl in Anwesenheit extrazellulären Kalziums von 1 mM, als auch in Abwesenheit von Kalzium. Zu einer weiteren Probenreihe der Experimente in Ca^{2+} -freier Lösung wurde der Ca^{2+} -Chelator EGTA (1 mM) hinzugegeben [56].

Abbildung 31 (links) zeigt die signifikante Reduktion der Annexin V-Bindung in Abwesenheit extrazellulären Kalziums bei einer Miltefosinkonzentration von

2 µg/ml ($p < 0,01$), verglichen mit den Werten in Ca^{2+} -haltiger Lösung. In Ca^{2+} -freier Lösung ist der Anteil Annexin V bindender Erythrozyten nach Inkubation mit Miltefosin leicht gesteigert verglichen mit der Kontrolllösung. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant [56].

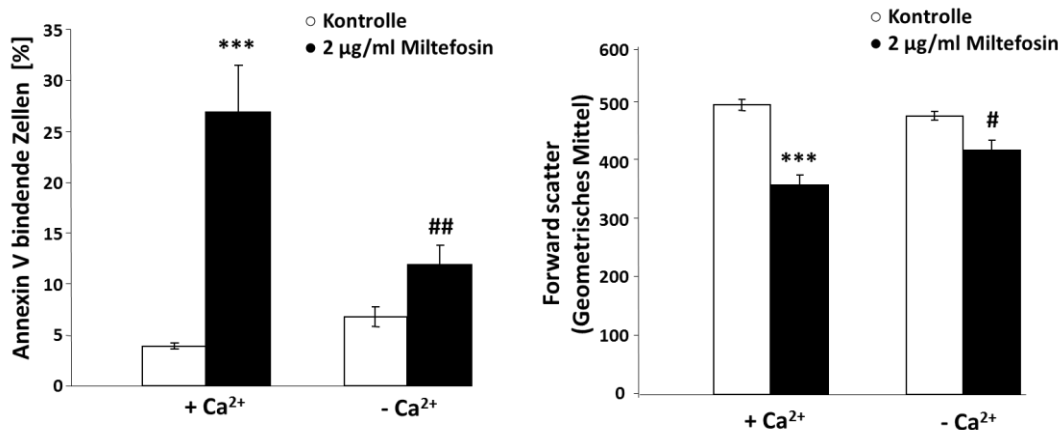


Abbildung 31: Die Wirkung der Kalziumdepletion auf Annexin V bindende Erythrozyten und Veränderungen im Forward Scatter Kanal

Die Balkendiagramme zeigen arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$) der Annexin V bindenden Erythrozyten (links) und des normierten Forward Scatters (rechts) nach 48 Stunden Inkubation in Ringerlösung ohne (weiße Balken) und mit Miltefosin 2 µg/ml (schwarze Balken), in Anwesenheit und in Abwesenheit von Kalzium. ***($p < 0,001$) zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollwerten (ANOVA). #($p < 0,5$), ##($p < 0,01$) stellen den signifikanten Unterschied der Werte dar, welche in Abwesenheit von extratellulärem Kalzium gegenüber den jeweiligen Werten in Anwesenheit von Kalzium gemessen wurden (ANOVA) [56].

Wie in Abbildung 31 (rechts) dargestellt sind unter Miltefosineinfluss von 2 µg/ml, die FSC-Werte in Abwesenheit von Kalzium signifikant weniger reduziert ($p < 0,5$) als unter Anwesenheit extrazellulären Kalziums. Die in Ca^{2+} -haltiger Lösung gemessenen Mittelwerte \pm Standardfehler der miltefosinexponierten Zellen im FSC sind gegenüber der Kontrollreihe hoch signifikant ($p < 0,001$) und sprechen für eine ausgeprägte Zellvolumenminderung. In Ca^{2+} -deplierter Lösung ist dagegen die Zellschrumpfung unter Anwesenheit von 2 µg/ml Miltefosin im Unterschied zur Kontrolle nicht signifikant.

3.2.6 Extrazelluläres Kalium (K⁺)

Um zu ermitteln, ob die induzierte Zellvolumenminderung nach Exposition gegenüber Miltefosin durch den Ausstrom von Kalium bewirkt wird, wurden folgende Experimente durchgeführt. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration wurde auf 125 mM erhöht und der chemische Konzentrationsgradient, welcher den Kaliumausstrom bedingt, aufgehoben [56]. Wie in Abbildung 32 dargestellt, bewirkt bereits eine Miltefosinkonzentration von 1 µg/ml bei einer geringen extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM eine signifikante Abnahme der FSC-Werte nach 48-stündiger Inkubationszeit ($p < 0,01$). Im Vergleich dazu waren die weniger stark reduzierten FSC-Werte bei Miltefosinkonzentrationen von 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml in einer Lösung mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration von 125 mM statistisch signifikant. Beträgt der extrazelluläre Kaliumgehalt 125 mM, erreicht die Reduktion der FSC-Werte ab einer Miltefosinkonzentration von 5 µg/ml statistische Signifikanz ($p < 0,001$).

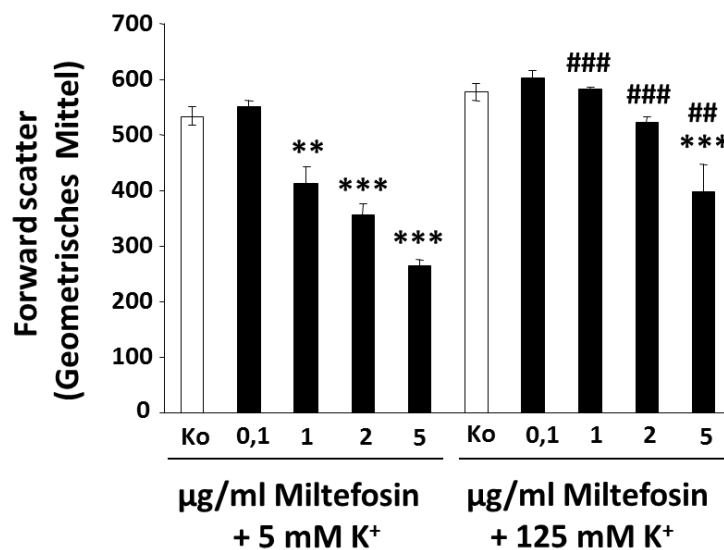


Abbildung 32: Wirkung von hochdosierter Kaliumlösung auf das Zellvolumen

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$) des normierten FSC der Erythrozyten nach 48-stündiger Inkubation in der Ringerkontrolle ohne (weiße Balken) und mit Miltefosin (schwarze Balken) in verschiedenen Konzentrationen 0,1 - 5 µg/ml. Niedrige extrazelluläre Kaliumkonzentrationen (links, 5 mM) und hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen (rechts, 125 mM) führen zu signifikanten Unterschieden der FSC-Werte. **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) zeigen signifikante Abweichungen gegenüber den Kontrollwerten (weiße Balken) ohne Miltefosin (ANOVA). ##($p < 0,01$), ###($p < 0,001$) verdeutlichen die signifikanten Unterschiede der Werte in hochdosierter gegen die der niedrigdosierten Kaliumlösung (ANOVA) [56].

Verglichen mit den Experimenten in einer Lösung mit niedriger extrazellulärer Kaliumkonzentration (5 mM) bewirkt eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration von 125 mM eine Reduktion der erythrozytären Annexin V-Bindung unter Miltefosinbehandlung. Abbildung 33 zeigt, dass dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Eine extrazelluläre Kaliumkonzentration von 5 mM führt schon bei einer Miltefosinkonzentration von 2 µg/ml zu einer signifikanten Annexin V-Bindung ($p < 0,5$), wohingegen ein signifikanter Anstieg der Annexin V-Bindung bei hohem Kaliumgehalt erst bei einer Miltefosinkonzentration von 5 µg/ml gemessen werden kann ($p < 0,01$).

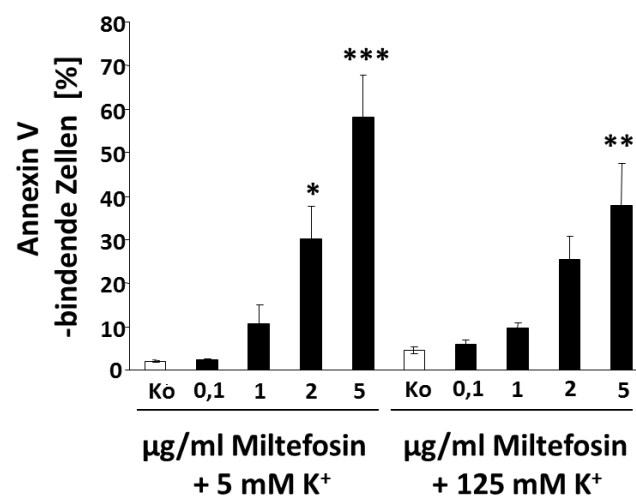


Abbildung 33: Der Einfluss auf die Annexin V-Bindung in hochdosierter Kaliumlösung nach Inkubation mit Miltefosin

Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$) der Annexin V-Bindung in Prozent nach Inkubation von 48 Stunden in der Ringerkontrolle ohne (weiße Balken) und mit Miltefosin (schwarze Balken) in verschiedenen Konzentrationen 0,1 - 5 µg/ml sind im Balkendiagramm dargestellt. Es zeigt die PS-Bindung in Anwesenheit niedriger Kaliumkonzentrationen (links, 5 mM), und unter Bedingungen in hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen (rechts, 125 mM). *($p < 0,5$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) zeigen signifikante Abweichungen gegenüber den Kontrollwerten (weiße Balken) ohne Miltefosin (ANOVA) [56].

4 DISKUSSION

4.1 Methodendiskussion

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode, welche nicht nur in wissenschaftlichen Laboratorien zu Forschungszwecken genutzt wird, sondern auch im Alltag der klinischen Diagnostik relevant ist. Beispielsweise wird sie bei der Detektion von Oberflächenmarkern hämatologischer Erkrankungen eingesetzt.

In der Eryptoseforschung wird die Durchflusszytometrie konventionell genutzt. Die Einstellungen des FACS-Gerätes haben einen maßgeblichen Einfluss auf die resultierenden Ergebnisse. Die standardisiert festgelegten Kontrollwerte für die Experimente wurden manuell eingestellt. Für jede Versuchsreihe wurde in den Kontrollansätzen das geometrische Mittel genormt. Die Normierung der Annexin V-Messungen wurde im Forward Scatter Kanal, die Normierung für die Fluo-3-Messungen im FL-1 Kanal vorgenommen. Die Kontrollproben wurden für den Vergleich der Experimentenreihen unterschiedlicher Blutgruppen festgelegt.

Die FACS-Maschine wurde mit den ordnungsgemäßen Flüssigkeiten vor und nach jedem Gebrauch gereinigt, um eine Verunreinigung als Ursache für unzutreffende Ergebnisse zu minimieren. Um valide und vergleichbare Werte zu erzielen, wurden die Experimente unter möglichst standardisierten Bedingungen durchgeführt.

Die Zellansätze wurden unter der sterilen Sicherheitswerkbank pipettiert. Die Versuchslösungen wurden mit einem pH-Meter auf 7,4 eingestellt. Für jeden Versuch wurde jeweils eine Lösung verwendet, um die gleichen Voraussetzungen für jeden Zellansatz der unterschiedlichen Blutgruppen zu schaffen. Die verwendeten Lösungen wurden regelmäßig neu hergestellt und wie die Erythrozytenzellkonzentrate bei +4° Celsius geschlossen gelagert. Für die Präparation der Ansätze wurden ausschließlich sterile Gefäße benutzt, um die Gefahr einer Kontamination und folglich stark abweichenden Ergebnissen möglichst gering zu halten. Die Risiken einer Verunreinigung der Ansätze lassen sich zwar minimieren, jedoch nicht vollkommen verhindern. Bei Kontamination

der Ansätze konnte dadurch eine fälschlicherweise hohe Eryptoserate detektiert werden. Diese Daten wurden nicht verwendet und die Experimente wiederholt.

Für die *in vitro* Experimente wurde weitgehend versucht die physiologischen Rahmenbedingungen des menschlichen Körpers zu rekonstruieren. Der pH-Wert von 7,4, die Inkubation bei 37° Celsius sowie die Elektrolytzusammensetzung der Ringerlösung erfüllen weitgehend physiologische Verhältnisse. Bezüglich des Hämatokrits, weiterer Blutplasmabestandteile, dem intravasalen Blutfluss, sowie multiplen Einflüssen von Organsysteme *in vivo* besteht jedoch ein beträchtlicher Unterschied.

Der strömungsphysiologisch optimale Hämatokrit *in vivo* liegt bei etwa 40 %, die Experimente *in vitro* wurden bei einem Hämatokrit von nur 0,4 % durchgeführt. Die niedrige Anzahl von Erythrozyten *in vitro* ist vorteilhaft, da während der Inkubation die Möglichkeit der stärkeren Substanzeinwirkung besteht und aussagekräftige Messergebnisse resultieren. Die Ergebnisse lassen sich nicht vollständig auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen, da im Blutplasma physiologisch vorkommende Substanzen wie Proteine, Hormone und organische Säuren mit Ionen und Erythrozyten wechselwirken. Der Versuchsaufbau beinhaltet die grundlegenden Gegebenheiten für eine isolierte Beurteilung von Substanzwirkungen auf Erythrozyten mit dem Vorteil einer guten Vergleichbarkeit der Daten und leicht zu eliminierenden Störfaktoren.

4.2 Der Einfluss von Mitotan auf den Erythrozytenzelltod

Mitotan ist das Medikament der Wahl in der als palliativ betrachteten Therapie nicht-resektabler, metastasierter und rezidivierter Nebennierenrindenzarzinome (ACC) [26]. Die operative Resektion von ACC's wird vorrangig angestrebt, jedoch bleibt bei diesem aggressiven Tumor eine Rezidivrate von etwa 50-70%, weshalb Mitotan zunehmend in der adjuvanten Therapie eingesetzt wird [28].

Mitotan (o,p'-DDD) wirkt adrenolytisch und bedarf einer metabolischen Aktivierung *in vivo* um die vollständige Ausprägung der Zelltoxizität zu erlangen. Diese Aktivierung findet Cytochrom P450 abhängig in den Mitochondrien adrenaler Zellen statt, welches die selektiv adrenale Wirkung von Mitotan erklärt

[30, 38]. Es wird vermutet, dass die zytotoxische Mitotanwirkung gegenüber Tumorzellen hauptsächlich auf die Induktion der Apoptose nach Schädigung der Mitochondrien zurückzuführen ist [30]. Da die metabolische Aktivierung intrazellulär stattfindet, kann angenommen werden, dass Mitotan noch vor der Aktivierung einen Einfluss auf Erythrozyten *in vivo* und *in vitro* nimmt. Ergebnisse die den Einfluß von Mitotan auf den erythrozytären Zelltod *in vitro* belegen, wurden in dieser Arbeit vorgestellt.

Die aktiven Metabolite von Mitotan hemmen als direkte Inhibitoren den Komplex IV der Atmungskette an den Mitochondrien adrenaler Zellen [30]. Da Erythrozyten keine Mitochondrien besitzen ist es wahrscheinlich, dass Mitotan über andere Signalwege auf den Zelltod der Erythrozyten wirkt. Außerdem ist zu vermuten, dass die intrazellulär aktivierten und wirkenden o,p'-DDD Metabolite keinen oder einen nur geringen Einfluss auf die Eryptose haben. Ob nach intrazellulärer Umwandlung von Mitotan (o,p'-DDD) in ein Essigsäure-Derivat (o,p'-DDA) zur renalen Elimination [40] ein Einfluss auf die Erythrozyten besteht, bleibt zukünftiger Forschung erhalten. Die durchgeführten Experimente *in vitro* zeigen einen signifikanten Einfluss von Mitotan vor metabolischer Aktivierung auf den Zelltod humaner Erythrozyten.

Die verwendeten Mitotankonzentrationen *in vitro* liegen im therapeutischen Bereich der Plasmakonzentration von Patienten. Schon im therapeutischen Bereich wird der erythrozytäre Zelltod *in vitro* induziert. Die verwendeten Konzentrationen liegen weit unter dem toxischen Bereich von Mitotan. Der Grenzbereich der therapeutischen Konzentration *in vivo* liegt bei 14 – 20 µg/ml, der toxische Bereich von Mitotan zeigt sich bei Konzentrationen über 30 µg/ml [233]. Unerwünschte Nebenwirkungen kommen bei über 80% der mit Mitotan behandelten Patienten vor [34]. Die Anämie ist eine häufige Nebenwirkung der Mitotanbehandlung und kann als Anzeichen für den verstärkten Zelltod von Erythrozyten gedeutet werden [34].

Die Zellmembranumlagerung mit Phosphatidylserin (PS)-Exposition, einem charakteristischen Mechanismus der Eryptose, konnte in den Experimenten unter Anwesenheit von Mitotan mittels Annexin V-Bindung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

Die Aufhebung der physiologischen Membranasymmetrie und damit einhergehenden PS-Exposition nach Mitotanbehandlung ist sehr wahrscheinlich eine Folge des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration [159].

Mitotan erhöht in Anwesenheit extrazellulären Kalziums (Ca^{2+}) den Einstrom in Erythrozyten und den intrazellulären Kalziumgehalt, welches mittels Fluo-3 Fluoreszenz dargestellt werden konnte. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der PS-exprimierenden Erythrozyten durch Inkubation in einer Ca^{2+} -depletierten Lösung signifikant verringert wurde. Die Kalziumsensibilität und die verminderte Annexin V-Bindung in Ca^{2+} -freier Lösung, weisen daraufhin, dass Mitotan den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen bewirkt. Die Fluo-3 Fluoreszenz nach Mitotanbehandlung konnte jedoch nur in einem gewissen Anteil der Erythrozyten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann als Heterogenität der Erythrozyten hinsichtlich der Sensibilität gegenüber Mitotan gedeutet werden. Frühere Forschungsergebnisse zeigen, dass die Empfindlichkeit gegenüber dem Zelltod vom Alter der Erythrozyten abhängt [187].

In anderen Forschungsarbeiten konnte unter Mitotanbehandlung verschiedener ACC-Zelllinien eine Hemmung der Tumorzellproliferation durch Aktivierung von proapoptotischen Effektorcaspasen-3 und -7 beobachtet werden [41, 42]. Es ist bekannt, dass Erythrozyten die Caspasen-3 und -8 besitzen [166]. Aktuelle Forschungsarbeiten zeigen, dass erythrozytäre Caspasen durch oxidativen Stress aktiviert werden [219]. Unter oxidativem Stress kann eine Translokation von Fas-Rezeptoren beobachtet werden. Es erfolgt die Bindung von Fas-Liganden, ein Fas-assoziiertes Komplex wird gebildet, Caspase-3 und -8 werden aktiviert [201]. Caspase-3 hemmt das Enzym Translokase und stimuliert die PS-Exposition über die der Erythrozyt als Phagozytosematerial *in vivo* erkannt wird [220]. Die Einwirkung von Mitotan auf Erythrozyten *in vitro* hat ebenso eine PS-Exposition zur Folge. Es kann angenommen werden, dass die Anämie in mitotanbehandelten Patienten zum Teil durch verstärkte Eliminierung mittels Phagozytose bedingt ist.

Keinen Nachweis gibt es jedoch dafür, dass erythrozytäre Caspasen von einer hohen Kalziumkonzentration aktiviert werden oder für den Anstieg von

intrazellulärem Kalzium mit nachfolgender Membranumlagerung notwendig sind [2, 166]. Aktivierte Caspasen sind keine Voraussetzung für die PS-Exposition, sie sind jedoch an diesem Vorgang der Eryptose beteiligt [5]. Um zu erforschen, ob Mitotan einen Einfluss auf den durch oxidativen Stress oder caspaseninduzierten Erythrozytenzelltod hat, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Oxidativer Stress stimuliert die erythrozytären Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle [236]. Ca^{2+} -permeable nicht selektive Kationenkanäle regulieren den Kalziumeinstrom mit Beteiligung der Transient-Rezeptor-Potential (TRP) Ionenkanäle (TRP6) [195]. In den Experimenten mit Eryptosehemmern, dem Antioxidans N-Acetylcystein (N-AC), dem Kaliumkanalinhibitor Clotrimazol und dem Caspaseinhibitor zVAD konnte kein signifikanter Unterschied der Mitotan induzierten Eryptose festgestellt werden. Es kam nicht zu einer verminderten Annexin V-Bindung unter Anwesenheit von Mitotan in Kombination mit den inhibierenden Substanzen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mitotan den Erythrozytenzelltod anscheinend nicht über oxidativen Stress induziert. Die Mitotan gesteuerte Eryptose läuft weder über aktivierte K^+ -Kanäle noch zVAD aktivierte Caspasen.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden über welchen Mechanismus Mitotan genau im Verlauf der Eryptose wirkt. Es kann angenommen werden, dass Mitotan über eryptose-regulierende Kinasen wirkt, wie beispielsweise die AMP-aktivierte Proteinkinase / AMPK oder die cGMP-abhängige Proteinkinase G / PKG, [159] die Januskinase 3 / JAK-3, [208] die Casein-Kinase 1α , [237, 238] die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase / p38 MAPK, [210] die p21-aktivierte Kinase / PAK2, [239] oder Sorafenib sensible Kinasen [240].

Den Effekt von Mitotan auf die PS-Exposition durch den Kalziumeinstrom zurückzuführen ist naheliegend. Ein intrazellulärer Kalziumanstieg bewirkt die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle [241] mit anschließendem Verlust von K^+ -Ionen, welches zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt [197]. Es erfolgt ein Chloridausstrom mit dem Gesamtverlust zellulären Kaliumchlorids (KCl), woraufhin die plasmazelluläre Osmolarität sinkt. Dieses hat einen

Flüssigkeitsausstrom zur Folge und führt zu einer Volumenminderung der Erythrozyten [159, 241, 242]. Die Versuche mit Mitotan ergaben jedoch, trotz des nachgewiesenen intrazellulären Kalziumanstiegs, keine beträchtliche Zellvolumenminderung. Darüber hinaus inhibierte Mitotan sogar die, auf den Kalziumanstieg folgende Erythrozytenschumpfung durch den Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin. Dieses lässt vermuten, dass Mitotan die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle oder / und auch die Cl^- -Kanäle der Zellmembran inhibiert.

Bei gleichzeitiger Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle kann der Natriumeinstrom über unselektive Kationenkanäle zu zellulärer Volumenvergrößerung führen. Dieses bedingt möglicherweise die Destruktion der Erythrozytenmembran und folglich die Hämolyse.

Wie bereits erwähnt, kann die Stimulation von Membranumlagerungen durch Mitotan Auslöser einer Anämie sein, da PS-exponierende Erythrozyten zügig aus dem zirkulierenden menschlichen Blut mittels Phagozytose entfernt werden [216]. Eine Anämie entwickelt sich unter verstärktem Abbau PS-exponierender Zellen, während die Neuproduktion von Erythrozyten nicht ausreicht, um dieses Defizit auszugleichen [159]. Bei PS-exponierenden Erythrozyten besteht die zusätzliche Gefahr der Endotheladhäsion *in vivo*. Diese binden an das am Endothel lokalisierte CXCL16/SR-PSOX [243], bleiben damit an Gefäßwänden haften und dieses geht mit der Gefahr von Mikrozirkulationsstörungen einher [244-246]. Außerdem wird die Blutgerinnung durch die PS-exponierenden Erythrozyten begünstigt, welches die Gefahr der Thromboseentwicklung verstärkt [200, 247].

Kenntnisse über die Wirkung von Mitotan auf Erythrozyten und Anämien sind noch ungenügend [248, 249]. Mitotan ist ein Medikament, das bei malignen Tumoren zum Einsatz kommt [28, 250]. Maligne Prozesse selbst können Anämien bedingen. Die von Mitotan bewirkte Reduktion der Tumormasse überwiegt, so dass dessen eryptotische Wirkung hingenommen wird [251, 252].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Mitotan den Prozess der Eryptose induziert. Mitotan bewirkt den eryptotischen Kalziumeinstrom mit folglich

Aufhebung der physiologischen Zellmembranasymmetrie in humanen Erythrozyten. Eine Volumenminderung der Erythrozyten als Merkmal der Eryptose bleibt jedoch aus.

4.3 Miltefosin und die Eryptose

Die vorliegenden Ergebnisse der Experimente *in vitro* beweisen die stimulierende Wirkung von Miltefosin auf den Zelltod humaner Erythrozyten. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit dem Medikament Miltefosin konnten typische Kennzeichen der Eryptose, wie die erythrozytäre Volumenminderung und Phosphatidylserin (PS)-Exposition nachgewiesen werden.

Die Konzentrationen von 0,1 bis 5 µg/ml Miltefosin *in vitro* wurden niedriger gewählt als jene Konzentrationen, die nach oraler Einnahme eine apoptotische Wirkung auf Tumorzellen haben. Ergebnisse von Forschungsgruppen, die mit anderen Zelllinien arbeiteten, zeigten erst ab einer Miltefosinkonzentrationen von 25 µg/ml eine Annexin V-Bindung leukämischer Blasten von über 90 % [235].

In der Leukämiebehandlung konnten *in vivo* Plasmakonzentrationen von über 40 µg/ml (bis 80 µg/ml) festgestellt werden [235]. In der Behandlung der Leishmaniose wurde ein medianer Maximalwert von 70 µg/ml *in vivo* erreicht [50].

Die verschiedenen Unterarten der Leishmanien weisen eine starke natürliche Variabilität ihrer Empfindlichkeit gegenüber den unterschiedlichen Miltefosinkonzentrationen auf. In der Behandlung der Leishmaniose werden je nach Subspezies stark variierende Plasmakonzentrationen verwendet [50]. Die größte Empfindlichkeit zeigt *Leishmania donovani* gegenüber Miltefosin, bei EC₅₀ Werten von 1,3 - 1,9 µg/ml. Im Gegensatz dazu spricht *Leishmania major* erst bei EC₅₀ Werten von 12,9 – 15,2 µg/ml auf die Miltefosintherapie an [50, 253].

Die Miltefosinkonzentrationen betragen in den Experimenten *in vitro* 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, und 5 µg/ml. Die verwendeten Miltefosinkonzentrationen entsprechen den Konzentrationen *in vivo*, die zur Behandlung bestimmter Leishmanioseerreger genutzt werden.

Der intrazelluläre Kalziumanstieg und die zelluläre Volumenminderung der Erythrozyten konnten als typische Mechanismen der Eryptose unter Anwesenheit von Miltefosin nachgewiesen werden. Die Zellschrumpfung unter Miltefosinbehandlung kann mit dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und der nachfolgenden Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^{+} -Kanäle erklärt werden [241, 254]. Durch die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanäle kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Dieses führt zu einem nachfolgenden Chloridausstrom. Die entstandene Elektrolytdifferenz durch den zellulären Kaliumchlorid-Verlust (KCl) führt zu einem osmotisch bedingten Flüssigkeitsausstrom und einer zellulären Volumenminderung [255].

Bei Fehlen des Kaliumgradienten durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration von 125 mM kommt es zu einer geringeren Zellvolumenabnahme im FSC-Signal bei niedrigen Miltefosinkonzentrationen. Bei einer hohen Miltefosinkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und gleichzeitig hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration kommt es dennoch zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellgröße, gemessen im Forward Scatter Kanal. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass Miltefosin eventuell konzentrationsabhängig über weitere Mechanismen zu einer Zellschrumpfung führt.

Werden die Miltefosinkonzentrationen, die eine erythrozytäre Zellschrumpfung und einen intrazellulären Kalziumanstieg bewirken, direkt miteinander verglichen, zeigen die Ergebnisse, dass schon geringe Konzentrationen von Miltefosin eine Zellschrumpfung auslösen. Der Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts erreicht erst bei höheren Miltefosinkonzentrationen statistische Signifikanz. Hierbei muss beachtet werden, dass die Messung der Zellvolumengröße im Forward Scatter mittels Photodiode und die Fluo-3-Fluoreszenzmessung über PTM's (Photomultiplier Tubes) unterschiedlich sensitiv sind. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass Miltefosin die Erythrozytenschumpfung durch weitere alternative Mechanismen bewirkt.

Eine erythrozytäre Zellschrumpfung verstärkt die PS-Exposition [255]. Wird die erythrozytäre Volumenminderung durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration verhindert, folgt nicht nur eine weniger starke

Zellschrumpfung, sondern darüber hinaus auch eine Reduktion der Ca^{2+} -abhängigen PS-Exposition [159].

Ein wesentliches Merkmal der Eryptose ist die Umlagerung der Phosphoglyceride an der Zellmembran mit PS-Exposition. Die durch Miltefosin induzierte PS-Umlagerung wird bei extrazellulärer Kalziumdepletion fast vollständig gehemmt. Die erythrozytäre PS-Umlagerung wird hauptsächlich durch den Kalziumeinstrom und folglich den Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts ausgelöst [158]. In Ca^{2+} -deplierter Lösung besteht dennoch eine Tendenz zur PS-Exposition unter Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ Miltefosin im Vergleich zur mitgeführten Ringerkontrolle, wenn auch ohne statistische Signifikanz. Gegebenenfalls könnten weitere Mechanismen der Eryptose die PS-Exposition an der Außenseite der Erythrozytenmembran Ca^{2+} -unabhängig bewirken.

Die Forschungsgruppe um *Wieder et al. (1998)* konnte belegen, dass in Keratinozytenzelllinien (HaCaT) *in vitro* unter Anwesenheit des Hexadecylphosphocholins Miltefosin eine verstärkte Bildung von proapoptotischem Ceramid vorliegt [70].

In kernhaltigen Zellen beginnt die Biosynthese von Ceramid am endoplasmatischen Retikulum aus Serin und Palmityl-CoA [256]. Es dient als Ausgangsstruktur der Sphingolipide, welche im Golgi-Apparat synthetisiert werden [256]. Abgebaut wird Sphingomyelin über verschiedene Typen von Sphingomyelinasen [256], welche teilweise auch in Erythrozyten zu finden sind. Es kann vermutet werden, dass der Mechanismus der Ceramidbildung durch Miltefosin in den unterschiedlichen Zelltypen voneinander abweicht. Da Erythrozyten keine Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum besitzen kann angenommen werden, dass Ceramid wesentlich aus membranständigem Sphingomyelin mit Hilfe des Enzyms der Sphingomyelinase generiert wird.

Aktuelle Forschungsergebnisse belegen die Sphingomyelinase abhängige Bildung von Ceramid in malignen Zellen durch Alkylphospholipide wie Miltefosin [257]. Die Experimente von Gills et al. 2012 wurden an Zelllinien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms *in vivo* und *in vitro* durchgeführt. Die

Forschergruppe konnte mittels Immunfluoreszenz den intrazellulären Konzentrationsanstieg von Ceramid nach Behandlung mit den Alkylphospholipiden Perifosin und Miltefosin, sowie weiteren Phosphatidylinositolanaloga darstellen [257]. Um zu belegen, dass die Ceramidbildung durch Alkylphospholipide wie Miltefosin sphingomyelinaseabhängig stattfindet, wurden maligne Zellen mit neutralen und sauren Sphingomyelinaseinhibitoren (GW4869 und Desipramin) vorbehandelt [257]. Das Ergebnis war die verminderte Bildung von Ceramid unter Anwesenheit der Sphingomyelinaseinhibitoren [257]. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Aktivität von Sphingomyelinasen gemessen [257]. Hierbei ist interessant, dass Miltefosin besonders bei sauren pH-Werten eine Aktivierung der Sphingomyelinase bedingt [257].

Werden die relevanten Forschungsdaten von Miltefosin in Bezug auf die Ceramidformation betrachtet, kann angenommen werden, dass Miltefosin abhängig von Konzentration, Zelltyp und pH-Wert eine induzierende Wirkung auf die Ceramidbildung hat. Es ist nicht vollkommen auszuschließen, dass Miltefosin auch in Erythrozyten zu einer Erhöhung des intrazellulären Ceramidgehalts führt. Die Experimente dieser Arbeit sprechen jedoch gegen den Zelltod von Erythrozyten durch Ceramidbildung, da in extrazellulär Ca^{2+} -deplierter Lösung und einer Miltefosinkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ eine statistisch signifikante Reduktion der Annexin V-Bindung im Vergleich zu den Versuchsergebnissen in Ca^{2+} -haltigen Milieu nachgewiesen werden konnte.

Ob Miltefosin in höherer Konzentration oder bei niedrigerem pH-Wert trotz Kalziumdepletion in Erythrozyten zu einer verstärkten PS-Exposition über Ceramidbildung führen würde, kann nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen Ca^{2+} -abhängige PS-Umlagerungen, welche bei extrazellulärer Kalziumdepletion statistisch signifikant vermindert sind.

Der Einstrom von Kalziumionen erfolgt durch Ca^{2+} -permeable nicht-selektive Kationenkanäle, welche unter anderem TRPC6-Proteine beinhalten [195] und durch Prostaglandin E_2 aktiviert werden. Die Bildung von Prostaglandin E_2 wird durch unterschiedliche Stressoren wie osmotischen Schock, Chloriddepletion

oder oxidativen Stress induziert [3, 194]. Über welchen Mechanismus Miltefosin die membranständigen Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle aktiviert, konnte nicht abschließend geklärt werden. Miltefosin greift nicht nur in Leishmanien, sondern auch in malignen Zellen in lipidabhängige Überlebenssignalwege ein und ist an der Modulation des Phospholipidmetabolismus von Membranbestandteilen beteiligt. Es ist nicht auszuschließen, dass Miltefosin auch Veränderungen an der erythrozytären Membran verursacht und in Erythrozyten an der Modulation von Signalkaskaden beteiligt ist. Miltefosin kann mit seinem apolaren Rest in die Zellmembran eindringen und in zelluläre Signalwege regulierend eingreifen.

Alkylphospholipide sind an der Regulation der Proteinkinase C beteiligt [72]. In Experimenten mit den Zelllinien humaner promyelozytischer Leukämiezellen 60 (HL60) und humaner immortalisierter myeloischer Leukämiezellen 562 (K562) konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Miltefosin eine Aktivitätsminderung der membrangebundenen und zytosolischen Proteinkinase C bewirkt [73]. Miltefosin inhibiert die Proteinkinase C Aktivität in Leishmanien und *Trypanosoma cruzi* [74]. In Erythrozyten führt die aktivierte Proteinkinase C zu vermehrtem Kalziumeinstrom, Zellschrumpfung und PS-Exposition [75]. Nach Inkubation mit Miltefosin *in vitro* ist die Möglichkeit der Eryptoseinduktion durch Aktivierung der erythrozytären Proteinkinase C auf Grund der inhibierenden Wirkung von Miltefosin in HL60- und K562-Zelllinien eher unwahrscheinlich, jedoch ist eine Interaktion nicht vollkommen auszuschließen.

Die *in vitro* durchgeführten Experimente dieser Arbeit dienen dem Erkenntnisgewinn des Miltefosineinflusses auf den Zelltod humaner Erythrozyten. Das Modell für die Experimente *in vitro* beinhaltet viele physiologische Faktoren nicht, wie beispielsweise den intravasalen Blutfluss und diverse Blutplasmabestandteile. Die Plasmaproteinbindung von Miltefosin beträgt *in vivo* etwa 96 % - 98 %. Miltefosin wird hauptsächlich an Albumin gebunden transportiert, zu einem kleineren Anteil an Lipoproteinen (LDL) [50, 80]. Albumin und Lipoproteine sind jedoch keine Bestandteile der *in vitro* Experimente. Deshalb muss in Betracht gezogen werden, dass durch die Anwesenheit von Plasmaproteinen die Wirkung auf Erythrozyten verändert sein

kann. Die *in vitro* Ergebnisse lassen sich nicht auf die physiologische Situation *in vivo* übertragen.

Bekannt ist, dass die intravenöse (i.v.) Gabe von Miltefosin zu einer starken akuten Hämolyse führt, deshalb wird Miltefosin oral verabreicht [50]. Miltefosin ist momentan das einzig oral wirksame Medikament gegen Leishmaniose [50, 56], weshalb die häufig auftretenden gastrointestinalen Nebenwirkungen hingenommen werden. Weitere Erfolge in der Behandlung mit Miltefosin konnten für Patienten mit Leishmaniose und HIV-Koinfektion erzielt werden [60]. Für die orale Behandlung bestimmter Tumorarten wurde wegen der dosis-limitierenden gastrointestinalen Toxizität und folglich unzureichender Wirksamkeit die weitere klinische Forschung für Miltefosin eingestellt [67, 72]. Es wurde zwar eine liposomale Formulierung entwickelt, welche intravenös verabreicht werden kann. Gastrointestinale Nebenwirkungen bleiben jedoch vorhanden, womit die Dosislimitation bestehen bleibt und keine verbesserte antitumorale Wirkung erlangt wird [258].

Die nachgewiesene Wirkung von Miltefosin auf die Membranolagerung mit PS-Exposition der Erythrozyten *in vitro*, führt *in vivo* zügig zu einer Elimination aus dem zirkulierenden Blut durch Makrophagen [165, 170]. Wird der Verlust von Erythrozyten durch die Produktion neuer Zellen ausgeglichen, hat dieser keinen relevanten Einfluss auf das Blutbild [216]. Verstärkte Eryptose kann durch eine gestiegene Anzahl der erythrozytären Vorläuferzellen, der Retikulozyten im Blut nachgewiesen werden [159]. Die Entwicklung einer Anämie ist begünstigt, sobald mehr Erythrozyten in den Prozess der Eryptose eintreten, phagozytiert werden oder hämolysieren als nachgebildet werden können [158]. Außerdem können PS-exponierende Erythrozyten am endothelialen CXCL16/SR-PSO der Gefäßwände hängen bleiben [243]. Dieses birgt das Risiko von Mikrozirkulationsstörungen, da durch die Endotheladhäsion der Erythrozyten der Blutfluss beeinträchtigt [244, 246] und die Entwicklung von Thrombosen begünstigt werden kann [200, 244].

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Miltefosin ab einer bestimmten Konzentration in unmittelbarem Kontakt mit Erythrozyten *in vitro* die typischen Merkmale der Eryptose induziert. Diese umfassen den Kalziumeinstrom, den Umbau der Erythrozytenmembran mit PS-Exposition, sowie die zelluläre Volumenminderung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Begriff Eryptose beschreibt den Mechanismus des programmierten Zelltods von Erythrozyten. Merkmale der Eryptose sind die Aktivierung membranständiger kalziumpermeabler Kationenkanäle mit nachfolgendem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, erythrozytäre Membranumlagerungen mit Aufhebung der Zellmembranasymmetrie und Phosphatidylserin (PS)-Exposition. Außerdem kann es zu einer Zellvolumenminderung durch osmotisch bedingten Ausstrom von Flüssigkeit kommen.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde der Effekt der beiden zytostatischen Medikamente Mitotan und Miltefosin auf humane Erythrozyten untersucht. Mittels *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass beide Medikamente den Prozess der Eryptose initiieren. Mitotan und Miltefosin besitzen jeweils hämolytische Eigenschaften und können in der Therapie von Patienten Auslöser einer Anämie sein.

Die gewählten Konzentrationen von Mitotan und Miltefosin in den *in vitro* Experimenten lagen im niedrigen bis normalen therapeutischen Bereich der bekannten Plasmakonzentrationen *in vivo*. Beide Medikamente besitzen schon in geringen Konzentrationen toxische Eigenschaften gegenüber Erythrozyten *in vitro*. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten die charakteristischen Merkmale suizidaler Erythrozyten gemessen und dargestellt werden. Der Einfluss von Mitotan und Miltefosin auf humane Erythrozyten wurde jeweils in voneinander getrennten Versuchsreihen getestet.

Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, welche mittels Fluo-3 Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen wurde, konnte sowohl in den Experimenten mit Mitotan als auch mit Miltefosin nachgewiesen werden. Ein statistisch signifikanter Anstieg der Annexin V-Bindung an PS-exponierende suizidale Erythrozyten konnte ebenfalls nach Inkubation mit jeweils Mitotan und Miltefosin detektiert werden.

Das Zellvolumen der Erythrozyten wurde im Forward Scatter (FSC) Kanal gemessen. Miltefosin verursacht eine signifikante Zellschrumpfung. Zur weiteren Überprüfung von Signalwegen wurden Experimente mit hoher extrazellulärer

Kaliumkonzentration durchgeführt, welche der Zellschrumpfung entgegenwirkt. Die Zellschrumpfung konnte dadurch bei niedrigen Konzentrationen von Miltefosin inhibiert werden. Bei hohen Miltefosinkonzentrationen jedoch wurden weiterhin signifikant verminderte FSC-Werte gemessen, welches vermuten lässt, dass Miltefosin die Eryptose zusätzlich über andere Mechanismen stimuliert.

Mitotan hingegen inhibiert die Zellschrumpfung der Erythrozyten. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten keine verminderten FSC-Werte nachgewiesen werden. In Kombination mit Ionomycin, einem Eryptoseinduktor, welcher zu einer starken Zellschrumpfung führt, ergaben die Ergebnisse unter Anwesenheit von Mitotan eine Hemmung der zellulären Volumenminderung. Um Details der von Mitotan induzierten Signalwege zu ermitteln, wurden weitere Experimente durchgeführt. Im kalziumfreien Milieu unter Anwesenheit von Mitotan konnte beispielsweise ein statistisch signifikanter prozentualer Anteil an Annexin V bindenden Erythrozyten in Versuchsreihen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mitotan über zusätzliche Mechanismen verfügt kalziumunabhängig Eryptose auszulösen. Weitere *in vitro* Experimente mit den Substanzen Clotrimazol, zVAD und N-Acetylcystein ergaben, dass Mitotan weder über die Aktivierung von Kaliumkanälen, noch Caspasen oder oxidativen Stress wirkt. Statistisch signifikante Werte zeigten sich beim Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts und in Bezug auf die gesteigerte PS-Exposition an der Membranaußenseite der Erythrozyten nach Mitotanbehandlung in unterschiedlichen Konzentrationen.

Es konnte mittels *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden, dass Mitotan und Miltefosin Auslöser des suizidalen Zelltods humaner Erythrozyten sind. Charakteristische Merkmale der Eryptose konnten unter dem Einfluss beider Medikamente im Durchflusszytometer gemessen werden. Die Ergebnisse der *in vitro* Forschung an humanen Erythrozyten sind nicht auf *in vivo* Experimente übertragbar, da hier viele weitere physiologische Faktoren auf die Erythrozyten einwirken. Deshalb bleibt zukünftiger Forschung erhalten in wie weit ein Einfluß von Mitotan und Miltefosin auf Erythrozyten *in vivo* besteht und in welchem Ausmaß diese beiden Substanzen bei der Entstehung von medikamenteninduzierten Anämien beteiligt sind.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Braun, C.v., *Mythen des Blutes*. 2007, Frankfurt [u.a.]: Campus-Verl. 369.
2. Bratosin, D., et al., *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(12): p. 1143-56.
3. Lang, K.S., et al., *Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(2): p. 249-56.
4. Lang, K.S., et al., *Mechanisms of suicidal erythrocyte death*. *Cell Physiol Biochem*, 2005. **15**(5): p. 195-202.
5. Lang, E. and F. Lang, *Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 513518.
6. Abed, M., et al., *Stimulation of suicidal death of erythrocytes by rifampicin*. *Toxicology*, 2012. **302**(2-3): p. 123-8.
7. Mahmud, H., et al., *Triggering of suicidal erythrocyte death by amphotericin B*. *Cell Physiol Biochem*, 2009. **24**(3-4): p. 263-70.
8. Mahmud, H., M. Foller, and F. Lang, *Suicidal erythrocyte death triggered by cisplatin*. *Toxicology*, 2008. **249**(1): p. 40-4.
9. Lang, P.A., et al., *Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel*. *Cell Physiol Biochem*, 2006. **18**(1-3): p. 151-64.
10. Bissinger, R., et al., *Estramustine-induced suicidal erythrocyte death*. *Cell Physiol Biochem*, 2013. **32**(5): p. 1426-36.
11. Nicolay, J.P., et al., *Lithium-induced suicidal erythrocyte death*. *J Psychopharmacol*, 2010. **24**(10): p. 1533-9.
12. Shaik, N., A. Lupescu, and F. Lang, *Sunitinib-sensitive suicidal erythrocyte death*. *Cell Physiol Biochem*, 2012. **30**(3): p. 512-22.
13. Tassinari, D., et al., *Hemolytic-uremic syndrome during therapy with estramustine phosphate for advanced prostatic cancer*. *Oncology*, 1999. **56**(2): p. 112-3.
14. Guzzini, F., et al., *[Immune hemolytic anemia and acute kidney failure due to rifampicin]*. *Recenti Prog Med*, 1994. **85**(3): p. 182-5.
15. Kucherenko, Y.V. and F. Lang, *Inhibitory effect of furosemide on non-selective voltage-independent cation channels in human erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2012. **30**(4): p. 863-75.
16. Qadri, S.M., M. Foller, and F. Lang, *Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol*. *Life Sci*, 2009. **85**(1-2): p. 33-8.
17. Kempe, D.S., et al., *Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes*. *Faseb j*, 2006. **20**(2): p. 368-70.
18. Zappulla, D., *Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO2 increases?* *J Cardiometab Syndr*, 2008. **3**(1): p. 30-4.
19. Calderon-Salinas, J.V., et al., *Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease*. *Mol Cell Biochem*, 2011. **357**(1-2): p. 171-9.
20. Firat, U., et al., *Increased caspase-3 immunoreactivity of erythrocytes in STZ diabetic rats*. *Exp Diabetes Res*, 2012. **2012**: p. 316384.

21. Foller, M., et al., *Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(3-4): p. 133-40.
22. Bottger, E., et al., *Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-Hsp70*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33774.
23. Jarman, W.M. and K. Ballschmiter, *From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring*. Endeavour, 2012. **36**(4): p. 131-42.
24. Yeo, I.S., *U.S. Military Administration's Malaria Control Activities (1945-1948)*. Uisahak, 2015. **24**(1): p. 35-65.
25. Nelson, A.A. and G. Woodard, *Adrenal cortical atrophy and liver damage produced in dogs by feeding 2,2-bis-(parachloro-phenyl)-1,1-dichloroethane*. Fed Proc, 1948. **7**(1 Pt 1): p. 277.
26. Else, T., et al., *Adrenocortical carcinoma*. Endocr Rev, 2014. **35**(2): p. 282-326.
27. Schteingart, D.E., et al., *Structural requirements for mitotane activity: development of analogs for treatment of adrenal cancer*. Anticancer Res, 2012. **32**(7): p. 2711-20.
28. De Francia, S., et al., *Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview*. Minerva Endocrinol, 2012. **37**(1): p. 9-23.
29. Rübben, H., ed. *Uroonkologie : mit 330 Tabellen*. 1994, Springer: Berlin. XVI, 703.
30. Fassnacht, M., et al., *Adrenocortical carcinoma: a clinician's update*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(6): p. 323-35.
31. Hescot, S., et al., *Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells*. Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(3): p. 371-81.
32. Lindhe, O. and B. Skogseid, *Mitotane effects in a H295R xenograft model of adjuvant treatment of adrenocortical cancer*. Horm Metab Res, 2010. **42**(10): p. 725-30.
33. Cerquetti, L., et al., *Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation*. Int J Oncol, 2010. **37**(2): p. 493-501.
34. Terzolo, M., et al., *Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection*. Eur J Endocrinol, 2013. **169**(3): p. 263-70.
35. Przytulska, J., N. Rogala, and G. Bednarek-Tupikowska, *Current and emerging therapies for adrenocortical carcinoma - review*. Adv Clin Exp Med, 2015. **24**(2): p. 185-93.
36. Berruti, A., et al., *Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 7**: p. vii131-8.
37. Arenas, C., C. Melian, and M.D. Perez-Alenza, *Long-term survival of dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism: a comparison between mitotane and twice daily trilostane treatment*. J Vet Intern Med, 2014. **28**(2): p. 473-80.

38. Berruti, A., et al., *Emerging drugs for adrenocortical carcinoma*. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2008. **13**(3): p. 497-509.
39. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
40. Schteingart, D.E., *Adjuvant mitotane therapy of adrenal cancer - use and controversy*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(23): p. 2415-8.
41. Garg, M.B., J.A. Sakoff, and S.P. Ackland, *A simple HPLC method for plasma level monitoring of mitotane and its two main metabolites in adrenocortical cancer patients*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011. **879**(23): p. 2201-5.
42. Hermesen, I.G., et al., *Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(6): p. 1844-51.
43. Poli, G., et al., *Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2013. **20**(4): p. 537-50.
44. Lehmann, T.P., T. Wrzesinski, and P.P. Jagodzinski, *The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCIH295R adrenocortical cells*. *Mol Med Rep*, 2013. **7**(3): p. 893-900.
45. Lindhe, O., B. Skogseid, and I. Brandt, *Cytochrome P450-catalyzed binding of 3-methylsulfonyl-DDE and o,p'-DDD in human adrenal zona fasciculata/reticularis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(3): p. 1319-26.
46. Kroiss, M., et al., *Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011. **75**(5): p. 585-91.
47. van Erp, N.P., et al., *Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity*. *Eur J Endocrinol*, 2011. **164**(4): p. 621-6.
48. Bourdeau, I., J. MacKenzie-Feder, and A. Lacroix, *Recent advances in adrenocortical carcinoma in adults*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2013. **20**(3): p. 192-7.
49. Croft, S.L. and J. Engel, *Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006. **100 Suppl 1**: p. S4-8.
50. Dorlo, T.P., et al., *Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis*. *J Antimicrob Chemother*, 2012. **67**(11): p. 2576-97.
51. Houlihan, W.J., et al., *Phospholipid antitumor agents*. *Med Res Rev*, 1995. **15**(3): p. 157-223.
52. Eibl, H. and C. Unger, *Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug*. *Cancer Treat Rev*, 1990. **17**(2-3): p. 233-42.
53. Smorenburg, C.H., et al., *Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients*. *Anticancer Drugs*, 2000. **11**(10): p. 825-8.
54. Sindermann, H. and J. Engel, *Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006. **100 Suppl 1**: p. S17-20.

55. Sundar, S., et al., *Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis*. Lancet, 1998. **352**(9143): p. 1821-3.
56. Munoz, C., et al., *Effect of miltefosine on erythrocytes*. Toxicol In Vitro, 2013. **27**(6): p. 1913-9.
57. Naucke, T.J., et al., *Sandflies and leishmaniasis in Germany*. Parasitol Res, 2008. **103 Suppl 1**: p. S65-8.
58. Ready, P.D., *Leishmaniasis emergence in Europe*. Euro Surveill, 2010. **15**(10): p. 19505.
59. Desjeux, P., *Leishmaniasis*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(9): p. 692.
60. Soto, J. and P. Soto, *Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2006. **4**(2): p. 177-85.
61. Maurer, M., et al., *Miltefosine: a novel treatment option for mast cell-mediated diseases*. J Dermatolog Treat, 2013. **24**(4): p. 244-9.
62. Unger, C., et al., *Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients*. Cancer Treat Rev, 1990. **17**(2-3): p. 243-6.
63. Leonard, R., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(21): p. 4150-9.
64. Dummer, R., et al., *Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study*. J Am Acad Dermatol, 1993. **29**(6): p. 963-70.
65. Arndt, D., et al., *Alkylphosphocholines and Alkylphosphocholine Liposomes*. Journal of Liposome Research, 1995. **5**(1): p. 91-98.
66. Mollinedo, F., *Alkylphospholipids and Leishmaniasis*. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. 2014.
67. van Blitterswijk, W.J. and M. Verheij, *Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 663-74.
68. Ruitter, G.A., et al., *Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(2): p. 167-73.
69. Silbernagl, S., F. Lang, and R. Gay, *Taschenatlas Pathophysiologie*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. 2009, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XII, 427.
70. Wieder, T., C.E. Orfanos, and C.C. Geilen, *Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11025-31.
71. Zeisig, R., et al., *Antitumor effects of alkylphosphocholines in different murine tumor models: use of liposomal preparations*. Anticancer Drugs, 1991. **2**(4): p. 411-7.
72. Agresta, M., et al., *Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines*. Chem Phys Lipids, 2003. **126**(2): p. 201-10.
73. Berkovic, D., et al., *Inhibition of calcium-dependent protein kinase C by hexadecylphosphocholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine do not correlate with inhibition of proliferation of HL60 and K562 cell lines*. Eur J Cancer, 1994. **30a**(4): p. 509-15.

74. Saraiva, V.B., et al., *Na(+)-ATPase and protein kinase C are targets to 1-O-hexadecylphosphocoline (miltefosine) in Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys, 2009. **481**(1): p. 65-71.
75. Klarl, B.A., et al., *Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(1): p. C244-53.
76. Perez-Victoria, F.J., et al., *Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use*. Drug Resist Updat, 2006. **9**(1-2): p. 26-39.
77. Marques, N., et al., *Miltefosine for visceral leishmaniasis relapse treatment and secondary prophylaxis in HIV-infected patients*. Scand J Infect Dis, 2008. **40**(6-7): p. 523-6.
78. van Thiel, P.P., et al., *Miltefosine treatment of Leishmania major infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(1): p. 80-3.
79. Brodt, H.-R. and W. Stille, *Antibiotika-Therapie : Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung; mit ... 240 Tabellen; Dosierungen der wichtigsten Antiinfektiva bei verminderter Nierenfunktion und Nierenersatztherapie auf separaten Ausklapp-Seiten am Buchende*. 12., kompl. überarb. und erw. Aufl. ed. 2013, Stuttgart: Schattauer. XVIII, 1086.
80. Kotting, J., et al., *Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution*. Prog Exp Tumor Res, 1992. **34**: p. 131-42.
81. Dorlo, T.P., et al., *Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(8): p. 2855-60.
82. Löscher, T., *Tropenmedizin in Klinik und Praxis, in mit Reise- und Migrationsmedizin; 287 Tabellen*, T. Löscher, Editor. 2010, Thieme: Stuttgart. p. Online-Ressource.
83. Vakil, N.H., N. Fujinami, and P.J. Shah, *Pharmacotherapy for leishmaniasis in the United States: focus on miltefosine*. Pharmacotherapy, 2015. **35**(5): p. 536-45.
84. Reed, J.C., *Apoptosis-based therapies*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(2): p. 111-21.
85. Ledda-Columbano, G.M., et al., *Cell deletion by apoptosis during regression of renal hyperplasia*. Am J Pathol, 1989. **135**(4): p. 657-62.
86. Ledda-Columbano, G.M., et al., *Cell proliferation, cell death and hepatocarcinogenesis*. Cell Death Differ, 1996. **3**(1): p. 17-22.
87. Saunders, J.W., Jr., *Death in embryonic systems*. Science, 1966. **154**(3749): p. 604-12.
88. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. **88**(3): p. 347-54.
89. Meier, P., A. Finch, and G. Evan, *Apoptosis in development*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 796-801.
90. Raff, M.C., et al., *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. Science, 1993. **262**(5134): p. 695-700.

91. Levy, R. and I. Seifer-Akkin, [*Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization*]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2001. **59**(5): p. 531-45.
92. Goodnow, C.C., *Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(6): p. 2264-71.
93. Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo*. *Science*, 1990. **250**(4988): p. 1720-3.
94. Hartley, S.B., et al., *Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death*. *Cell*, 1993. **72**(3): p. 325-35.
95. Greenberg, P.L., *Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment*. *Leuk Res*, 1998. **22**(12): p. 1123-36.
96. Philpott, N.J., et al., *Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance*. *Exp Hematol*, 1995. **23**(14): p. 1642-8.
97. Mullauer, L., et al., *Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease*. *Mutat Res*, 2001. **488**(3): p. 211-31.
98. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer*. *Mol Aspects Med*, 2000. **21**(6): p. 167-223.
99. Kroemer, G., *The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis*. *Nat Med*, 1997. **3**(6): p. 614-20.
100. Goldar, S., et al., *Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. **16**(6): p. 2129-2144.
101. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. *Science*, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
102. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. *Cell*, 1996. **87**(2): p. 171.
103. Skeldon, A.M., M. Faraj, and M. Saleh, *Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(4): p. 304-13.
104. Zermati, Y., et al., *Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation*. *J Exp Med*, 2001. **193**(2): p. 247-54.
105. Garrido, C. and G. Kroemer, *Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(6): p. 639-46.
106. Green, D.R., *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. *Cell*, 1998. **94**(6): p. 695-8.
107. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 383-424.
108. MacKenzie, S.H. and A.C. Clark, *Death by caspase dimerization*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **747**: p. 55-73.
109. Fan, T.J., et al., *Caspase family proteases and apoptosis*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005. **37**(11): p. 719-27.
110. Schulze-Osthoff, K., et al., *Apoptosis signaling by death receptors*. *Eur J Biochem*, 1998. **254**(3): p. 439-59.

111. Nair, P., et al., *Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway*. *Methods Enzymol*, 2014. **544**: p. 99-128.
112. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 793-802.
113. Wilson, N.S., V. Dixit, and A. Ashkenazi, *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(4): p. 348-55.
114. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
115. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 26-35.
116. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. *Cell*, 2003. **114**(2): p. 181-90.
117. Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(1): p. 75-86.
118. Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer, *Death receptor signaling*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 2): p. 265-7.
119. Willis, S., et al., *The Bcl-2-regulated apoptotic pathway*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 20): p. 4053-6.
120. Ferri, K.F., et al., *Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases*. *J Exp Med*, 2000. **192**(8): p. 1081-92.
121. Bollinger, C.R., V. Teichgraber, and E. Gulbins, *Ceramide-enriched membrane domains*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1746**(3): p. 284-94.
122. Gulbins, E., *Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide*. *Pharmacol Res*, 2003. **47**(5): p. 393-9.
123. Grassme, H., J. Riethmuller, and E. Gulbins, *Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains*. *Prog Lipid Res*, 2007. **46**(3-4): p. 161-70.
124. Gulbins, E. and H. Grassme, *Ceramide and cell death receptor clustering*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1585**(2-3): p. 139-45.
125. Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov, and V.L. Gabai, *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* *Exp Cell Res*, 2003. **283**(1): p. 1-16.
126. Labi, V., et al., *BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(8): p. 1325-38.
127. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 205-19.
128. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-56.
129. Lang, F., et al., *Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death*. *Cell Physiol Biochem*, 2000. **10**(5-6): p. 417-28.
130. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?* *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(4): p. 157-64.

131. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondrial regulation of cell death*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
132. Kinnally, K.W., et al., *Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both?* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(4): p. 616-22.
133. Danial, N.N., A. Gimenez-Cassina, and D. Tondera, *Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2010. **687**: p. 1-32.
134. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
135. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
136. Susin, S.A., et al., *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 381-94.
137. Mancini, M., et al., *The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling*. J Cell Biol, 1998. **140**(6): p. 1485-95.
138. Labeledzka, K., A. Grzanka, and M. Izdebska, *[Mitochondria and cell death]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006. **60**: p. 439-46.
139. Uren, R.T., et al., *Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2266-74.
140. Gradzka, I., *[Mechanisms and regulation of the programmed cell death]*. Postepy Biochem, 2006. **52**(2): p. 157-65.
141. Riedl, S.J. and G.S. Salvesen, *The apoptosome: signalling platform of cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 405-13.
142. Czerski, L. and G. Nunez, *Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart?* J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(3): p. 643-52.
143. Pop, C., et al., *The apoptosome activates caspase-9 by dimerization*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 269-75.
144. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
145. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
146. Slee, E.A., et al., *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner*. J Cell Biol, 1999. **144**(2): p. 281-92.
147. Stark, H. and S. Schuster, *Comparison of various approaches to calculating the optimal hematocrit in vertebrates*. J Appl Physiol (1985), 2012. **113**(3): p. 355-67.
148. Zandecki, M., et al., *Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes*. Int J Lab Hematol, 2007. **29**(1): p. 21-41.
149. Lodish, H., J. Flygare, and S. Chou, *From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones*. IUBMB Life, 2010. **62**(7): p. 492-6.

150. Gregoli, P.A. and M.C. Bondurant, *The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin*. Blood, 1997. **90**(2): p. 630-40.
151. Zhang, J., et al., *Autophagy as a regulatory component of erythropoiesis*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 4083-94.
152. Hattangadi, S.M., et al., *From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications*. Blood, 2011. **118**(24): p. 6258-68.
153. Bos, C., L. Hoofd, and T. Oostendorp, *The effect of separate red blood cells on capillary tissue oxygenation calculated with a numerical model*. IMA J Math Appl Med Biol, 1996. **13**(4): p. 259-74.
154. Lucker, A., B. Weber, and P. Jenny, *A dynamic model of oxygen transport from capillaries to tissue with moving red blood cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(3): p. H206-16.
155. Mohandas, N. and P.G. Gallagher, *Red cell membrane: past, present, and future*. Blood, 2008. **112**(10): p. 3939-48.
156. Yim, J., et al., *Photothermal spectral-domain optical coherence reflectometry for direct measurement of hemoglobin concentration of erythrocytes*. Biosens Bioelectron, 2014. **57**: p. 59-64.
157. Blum, K.U., *Der Stoffwechsel menschlicher Erythrozyten*. Blut, 1965. **11**(2): p. 90-101.
158. Lang, F., et al., *Eryptosis, a window to systemic disease*. Cell Physiol Biochem, 2008. **22**(5-6): p. 373-80.
159. Lang, E., S.M. Qadri, and F. Lang, *Killing me softly - suicidal erythrocyte death*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1236-43.
160. Arese, P., F. Turrini, and E. Schwarzer, *Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(4-6): p. 133-46.
161. Straat, M., et al., *Red blood cell clearance in inflammation*. Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 353-61.
162. Deplaine, G., et al., *The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro*. Blood, 2011. **117**(8): p. e88-95.
163. Barabino, G.A., M.O. Platt, and D.K. Kaul, *Sickle cell biomechanics*. Annu Rev Biomed Eng, 2010. **12**: p. 345-67.
164. Bosman, G.J., F.L. Willekens, and J.M. Werre, *Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?* Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(1-3): p. 1-8.
165. Fadok, V.A., et al., *A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells*. Nature, 2000. **405**(6782): p. 85-90.
166. Berg, C.P., et al., *Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1197-206.
167. Lang, F. and P.A.F. Lang, *Basiswissen Physiologie : mit ... 46 Tabellen*. 2., vollst. neu bearb. und aktualisierte Aufl. ed. Springer-Lehrbuch. 2007, Heidelberg: Springer Medizin-Verl. XVI, 483.
168. Foller, M., S.M. Huber, and F. Lang, *Erythrocyte programmed cell death*. IUBMB Life, 2008. **60**(10): p. 661-8.

169. Pötzsch, B., ed. *Hämostaseologie : 163 Tabellen; [Grundlagen, Diagnostik, Therapie]*. 2., vollständig aktual. und erw. Aufl. ed. 2010, Springer: Berlin. XXV, 972.
170. Boas, F.E., L. Forman, and E. Beutler, *Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3077-81.
171. Banerjee, D., et al., *Porous red cell ultrastructure and loss of membrane asymmetry in a novel case of hemolytic anemia*. Eur J Haematol, 2008. **81**(5): p. 399-402.
172. Kean, L.S., et al., *Comparison of mechanisms of anemia in mice with sickle cell disease and beta-thalassemia: peripheral destruction, ineffective erythropoiesis, and phospholipid scramblase-mediated phosphatidylserine exposure*. Exp Hematol, 2002. **30**(5): p. 394-402.
173. Lang, K.S., et al., *Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Cell Physiol Biochem, 2002. **12**(5-6): p. 365-72.
174. Foller, M., et al., *Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death*. Eur J Clin Invest, 2010. **40**(6): p. 534-40.
175. Kirk, K., *Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 495-537.
176. Kempe, D.S., et al., *Suicidal erythrocyte death in sepsis*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(3): p. 273-81.
177. Lang, P.A., et al., *Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(5): p. 378-88.
178. Myssina, S., et al., *Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2750-7.
179. Abed, M., et al., *Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 871-9.
180. Lang, P.A., et al., *Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 164-70.
181. Lang, E., et al., *Carbon monoxide-sensitive apoptotic death of erythrocytes*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **111**(5): p. 348-55.
182. Abed, M., et al., *Sensitization of erythrocytes to suicidal erythrocyte death following water deprivation*. Kidney Blood Press Res, 2013. **37**(6): p. 567-78.
183. Birka, C., et al., *Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion*. Pflugers Arch, 2004. **448**(5): p. 471-7.
184. Lang, E. and F. Lang, *Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death*. Semin Cell Dev Biol, 2015.
185. Lang, F., et al., *Oxidative stress and suicidal erythrocyte death*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(1): p. 138-53.
186. Qadri, S.M., et al., *Enhanced suicidal erythrocyte death in mice carrying a loss-of-function mutation of the adenomatous polyposis coli gene*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(5): p. 1085-93.
187. Ghashghaeinia, M., et al., *The impact of erythrocyte age on eryptosis*. Br J Haematol, 2012. **157**(5): p. 606-14.

188. Vota, D.M., et al., *Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin*. J Cell Biochem, 2012. **113**(5): p. 1581-9.
189. Lang, F., E. Lang, and M. Foller, *Physiology and pathophysiology of eryptosis*. Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 308-14.
190. Lang, P.A., et al., *PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death*. Cell Death Differ, 2005. **12**(5): p. 415-28.
191. Lang, F. and S.M. Qadri, *Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes*. Blood Purif, 2012. **33**(1-3): p. 125-30.
192. Lang, E., et al., *Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death*. Apoptosis, 2015. **20**(5): p. 758-67.
193. Bao, G.Q. and A.Z. Ju, *[Signal pathways of eryptosis-review]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2009. **17**(4): p. 1097-100.
194. Duranton, C., S.M. Huber, and F. Lang, *Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells*. J Physiol, 2002. **539**(Pt 3): p. 847-55.
195. Foller, M., et al., *TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2008. **21**(1-3): p. 183-92.
196. Gardos, G., *The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes*. Biochim Biophys Acta, 1958. **30**(3): p. 653-4.
197. Dyrda, A., et al., *Local membrane deformations activate Ca²⁺-dependent K⁺ and anionic currents in intact human red blood cells*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9447.
198. Bevers, E.M. and P.L. Williamson, *Phospholipid scramblase: an update*. FEBS Lett, 2010. **584**(13): p. 2724-30.
199. Comfurius, P., et al., *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**(2): p. 153-60.
200. Zwaal, R.F., P. Comfurius, and E.M. Bevers, *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(9): p. 971-88.
201. Mandal, D., et al., *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**(47): p. 39460-7.
202. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
203. Messmer, U.K. and J. Pfeilschifter, *New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells*. Bioessays, 2000. **22**(10): p. 878-81.
204. Khorchid, A. and M. Ikura, *How calpain is activated by calcium*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(4): p. 239-41.
205. Wieschhaus, A., et al., *Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology*. Biochem J, 2012. **448**(1): p. 141-52.
206. Chan, S.L. and M.P. Mattson, *Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death*. J Neurosci Res, 1999. **58**(1): p. 167-90.

207. Al, Z. and C.M. Cohen, *Phorbol 12-myristate 13-acetate-stimulated phosphorylation of erythrocyte membrane skeletal proteins is blocked by calpain inhibitors: possible role of protein kinase M*. *Biochem J*, 1993. **296 (Pt 3)**: p. 675-83.
208. Bhavsar, S.K., et al., *Janus kinase 3 is expressed in erythrocytes, phosphorylated upon energy depletion and involved in the regulation of suicidal erythrocyte death*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **27(5)**: p. 547-56.
209. Andrews, D.A., L. Yang, and P.S. Low, *Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells*. *Blood*, 2002. **100(9)**: p. 3392-9.
210. Gatidis, S., et al., *p38 MAPK activation and function following osmotic shock of erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **28(6)**: p. 1279-86.
211. Allan, D. and R.H. Michell, *Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions*. *Biochem J*, 1977. **166(3)**: p. 495-9.
212. Lang, P.A., et al., *Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor*. *J Cell Sci*, 2005. **118(Pt 6)**: p. 1233-43.
213. Lang, K.S., et al., *Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes*. *Cell Death Differ*, 2004. **11(2)**: p. 231-43.
214. Garay, R. and P. Braquet, *Involvement of K⁺ movements in the membrane signal induced by PAF-acether*. *Biochem Pharmacol*, 1986. **35(16)**: p. 2811-5.
215. Rivera, A., P. Jarolim, and C. Brugnara, *Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes*. *Blood*, 2002. **99(1)**: p. 357-603.
216. Lang, F., et al., *Ceramide in suicidal death of erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **26(1)**: p. 21-8.
217. Maellaro, E., et al., *Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients*. *Acta Diabetol*, 2013. **50(4)**: p. 489-95.
218. Jay, D., H. Hitomi, and K.K. Griendling, *Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40(2)**: p. 183-92.
219. Matarrese, P., et al., *Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases*. *Faseb j*, 2005. **19(3)**: p. 416-8.
220. Mandal, D., et al., *Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes*. *FEBS Lett*, 2002. **513(2-3)**: p. 184-8.
221. Mandal, D., et al., *Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)*. *J Biol Chem*, 2003. **278(52)**: p. 52551-8.
222. Foller, M., et al., *Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death*. *J Physiol Pharmacol*, 2009. **60(3)**: p. 135-43.
223. Bhavsar, S.K., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by alpha-lipoic acid*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **26(6)**: p. 859-68.
224. Ghashghaenia, M., et al., *The NFkB pathway inhibitors Bay 11-7082 and parthenolide induce programmed cell death in anucleated Erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **27(1)**: p. 45-54.

225. Kempe, D.S., et al., *Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(2): p. C396-402.
226. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford*. Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1819-27.
227. Ormerod, M.G., *Flow cytometry : a practical approach*. 2. ed. The practical approach series. 1994, Oxford: IRL Press. XXIII, 282.
228. Shapiro, H.M., *Practical flow cytometry*. 4. ed. 2003, Hoboken, NJ [u.a.]: Wiley-Liss. XLIX, 681.
229. Darzynkiewicz, Z., *Cytometry*. - A. 3. ed. Cytometry. 2001, San Diego: Academic Press. XXXI, 650.
230. Suzuki, J. and S. Nagata, *Phospholipid scrambling on the plasma membrane*. Methods Enzymol, 2014. **544**: p. 381-93.
231. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
232. Andree, H.A., et al., *Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers*. J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 4923-8.
233. Mauclere-Denost, S., et al., *High-dose mitotane strategy in adrenocortical carcinoma: prospective analysis of plasma mitotane measurement during the first 3 months of follow-up*. Eur J Endocrinol, 2012. **166**(2): p. 261-8.
234. Jacobi, J., et al., *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mitotane*. Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(5): p. 1516-26.
235. Verdonck, L.F. and H.G. van Heugten, *Ether lipids are effective cytotoxic drugs against multidrug-resistant acute leukemia cells and can act by the induction of apoptosis*. Leuk Res, 1997. **21**(1): p. 37-43.
236. Brand, V.B., et al., *Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte*. Cell Physiol Biochem, 2003. **13**(6): p. 347-56.
237. Kucherenko, Y., et al., *Effect of casein kinase 1alpha activator pyrvinium pamoate on erythrocyte ion channels*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(2): p. 407-17.
238. Zelenak, C., et al., *Protein kinase CK1alpha regulates erythrocyte survival*. Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(1-2): p. 171-80.
239. Zelenak, C., et al., *Proteome analysis of erythrocytes lacking AMP-activated protein kinase reveals a role of PAK2 kinase in eryptosis*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1690-7.
240. Lupescu, A., et al., *Enhanced erythrocyte membrane exposure of phosphatidylserine following sorafenib treatment: an in vivo and in vitro study*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(4): p. 876-88.
241. Brugnara, C., L. de Franceschi, and S.L. Alper, *Inhibition of Ca(2+)-dependent K+ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 520-6.
242. Franco, R.S., et al., *Dehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4359-65.

243. Borst, O., et al., *Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(4): p. C644-51.
244. Andrews, D.A. and P.S. Low, *Role of red blood cells in thrombosis*. Curr Opin Hematol, 1999. **6**(2): p. 76-82.
245. Clossé, C., J. Dachary-Prigent, and M.R. Boisseau, *Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 300-2.
246. Pandolfi, A., et al., *Mechanisms of uremic erythrocyte-induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 699-709.
247. Chung, S.M., et al., *Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 414-21.
248. Kaufman, J., *Diseases of the adrenal cortex of dogs and cats*. Mod Vet Pract, 1984. **65**(6): p. 429-34.
249. Weiss, D.J., *Bone marrow necrosis in dogs: 34 cases (1996-2004)*. J Am Vet Med Assoc, 2005. **227**(2): p. 263-7.
250. Kirschner, L.S., *The next generation of therapies for adrenocortical cancers*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(7): p. 343-50.
251. Gaspar, B.L., P. Sharma, and R. Das, *Anemia in malignancies: Pathogenetic and diagnostic considerations*. Hematology, 2015. **20**(1): p. 18-25.
252. Fields, S.Z., et al., *Activin receptor antagonists for cancer-related anemia and bone disease*. Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(1): p. 87-101.
253. Escobar, P., et al., *Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B*. Acta Trop, 2002. **81**(2): p. 151-7.
254. Johnson, R.M. and K. Tang, *Induction of a Ca(2+)-activated K+ channel in human erythrocytes by mechanical stress*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1107**(2): p. 314-8.
255. Lang, P.A., et al., *Role of Ca2+-activated K+ channels in human erythrocyte apoptosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(6): p. C1553-60.
256. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. ed. Springer-Lehrbuch, ed. P.C. Heinrich and L. Graeve. 2014, Berlin; Heidelberg: Springer. XXIX,1073.
257. Gills, J.J., et al., *Ceramide mediates nanovesicle shedding and cell death in response to phosphatidylinositol ether lipid analogs and perifosine*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e340.
258. Kaufmann-Kolle, P., et al., *Pharmacokinetic behavior and antineoplastic activity of liposomal hexadecylphosphocholine*. Cancer Chemother Pharmacol, 1994. **34**(5): p. 393-8.

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die durchgeführten Experimente wurden von den Betreuern Frau Dr. med. Elisabeth Lang, Herrn Dr. med. Majed Abed und Herrn Dr. rer. nat. Kousi Al Zoubi im Labor des Physiologischen Instituts Tübingen begleitet. Die Konzeption des Versuchsaufbaus erfolgte in beiden Fällen in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang als habilitierter Betreuer.

Die Veröffentlichung „Stimulation of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by Mitotane“ (Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(5): p. 1516-26.) wurde in Zusammenarbeit von Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang, Janin Jacobi und Frau Dr. med. Elisabeth Lang verfasst, korrigiert und ergänzt. Das Datenmaterial und die Graphiken der Publikation wurden von Janin Jacobi erstellt und zusammengetragen.

Gemessen wurden alle Zellsuspensionen im Durchflusszytometer des Physiologischen Instituts Tübingen.

Stimulation of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by Mitotane

Cell Physiol Biochem, 2014. 33(5): p. 1516-26.

Jacobi J, Lang E, Bissinger R, Frauenfeld L, Modicano P, Faggio C, Abed M, Lang F.

Die Konzeption des Versuchsaufbaus und Literaturrecherche erfolgte von Frau Dr. med. Elisabeth Lang und Janin Jacobi in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang.

Die Versuche der Publikation wurden eigenständig von Janin Jacobi durchgeführten. Unterstützend stand Frau Dr. med. Elisabeth Lang zur Seite. Die Versuche der Annexin V-Bindung, Fluo-3- und Forward Scatter- Messungen wurden von Janin Jacobi und Frau Dr. rer. nat. Rosi Bissinger durchgeführt. Allein von Janin Jacobi durchgeführt wurden die Experimente von Mitotan mit Clotrimazol, N-Acetylcystein und zVAD, nach gemeinsamer Literaturrecherche mit Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang und Herrn Dr. med. Majed Abed. Die Durchführung der Experimente mit Mitotan in Kalziumdepletion, sowie die Annexin V-Bindung und Hämolysemessung im Vergleich wurde ebenfalls selbständig von Janin Jacobi abgeschlossen. Der Ionomycin-Versuch gelang in

Zusammenarbeit mit Leonie Frauenfeld und Paola Modicano. Die statistische Auswertung mit Erstellung der publizierten Graphen und Originalhistogramme erfolgte von Janin Jacobi. Bei Unklarheiten wurde Unterstützung von Frau Dr. med. Elisabeth Lang gegeben.

Effect of Miltefosine on Erythrocytes

Toxicol In Vitro, 2013. **27**(6): p. 1913-9.

Munoz C, Alzoubi K, Jacobi J, Abed M, Lang F.

Die Konzeption des Versuchsaufbaus erfolgte von Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Carlos Munoz Hernando.

Die Versuche der Annexin V-Bindung, Fluo-3- und Forward Scatter- Messungen wurden von Herrn Dr. rer. nat. Carlos Munoz Hernando und Janin Jacobi gemeinsam durchgeführt. Die Experimente in Lösungen mit Kalziumdepletion und mit hohem extrazellulärem Kaliumgehalt wurden von Janin Jacobi allein nach Absprache mit Herrn Dr. rer. nat. Kousi Alzoubi durchgeführt. Die statistische Auswertung mit Erstellung der Graphen, Originalhistogramme und Dotplots erfolgte durch Dr. rer. nat. Carlos Munoz Hernando, Herrn Dr. rer. nat. Kousi Alzoubi und Janin Jacobi.

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

[Ort, Datum]

[Unterschrift]

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

1. Stimulation of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by Mitotane

Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(5): p. 1516-26.

Jacobi J, Lang E, Bissinger R, Frauenfeld L, Modicano P, Faggio C, Abed M, Lang F.

2. Effect of Miltefosine on Erythrocytes

Toxicol In Vitro, 2013. **27**(6): p. 1913-9.

Munoz C, Alzoubi K, Jacobi J, Abed M, Lang F.

3. Estramustine-induced suicidal erythrocyte death.

Cell Physiol Biochem. 2013;**32**(5):1426-36.

Bissinger R, Modicano P, Frauenfeld L, Lang E, Jacobi J, Faggio C, Lang F.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Metabolismus von Mitotan in adrenalen Zellen [40].....	10
Abbildung 2: Chemische Struktur von Miltefosin [66].....	16
Abbildung 3: Antiparasitäre Mechanismen von Miltefosin [50]	18
Abbildung 4: Modell der TNFR1-vermittelten Apoptose [116].....	27
Abbildung 5: Auswirkungen der Caspase-8 und Ceramidformation, modifiziert nach [124].....	28
Abbildung 6: Erkrankungen und Eryptose [184].....	35
Abbildung 7: Überblick der Zellmechanismen beim Prozess der Eryptose	38
Abbildung 8: Detaillierte Darstellung der molekularen Veränderungen im Verlauf der Eryptose	43
Abbildung 9: FACS Interaktion von Licht und Zelle [228]	53
Abbildung 10: Allgemeingültiges optisches System eines Durchflusszytometers, nach [227, 228]	54
Abbildung 11: Bindung von FITC gekoppeltem Annexin V an Phosphatidylserin (PS)	56
Abbildung 12: Intrazellulärer Kalziumgehalt unter Einwirkung von Mitotan	60
Abbildung 13: Wirkung von Mitotan auf die Kalziumkonzentration	60
Abbildung 14: PS-Exposition humaner Erythrozyten unter dem Einfluss von Mitotan	61
Abbildung 15: Wirkung von Mitotan auf die Phosphatidylserin (PS)-Exposition.....	62
Abbildung 16: Annexin V bindende Erythrozyten unter Kalziumdepletion	63
Abbildung 17: Anteil der Annexin V bindenden Erythrozyten unter Einwirkung von Mitotan in Kombination mit N-Acetylcystein, Clotrimazol und zVAD	65
Abbildung 18: Mitotanauswirkung auf das Zellvolumen im FSC nach 24 Stunden	66
Abbildung 19: Mitotanauswirkung auf das Zellvolumen im FSC nach 48 Stunden	66
Abbildung 20: Veränderung des FSC unter Einfluss von Ionomycin	68
Abbildung 21: Direkter Vergleich der Annexin V-Bindung und Hämolyse in Prozent nach 2,5- stündiger Inkubation mit Mitotan	69
Abbildung 22: Effekt von Miltefosin auf Erythrozyten.....	70
Abbildung 23: Intrazellulärer Kalziumgehalt der Erythrozyten nach Inkubation mit Miltefosin ...	71
Abbildung 24: Effekt von Miltefosin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration	72
Abbildung 25: Miltefosin und das Zellvolumen gemessen im Forward Scatter Kanal	73
Abbildung 26: Das Erythrozytenvolumen im Forward Scatter Kanal nach Inkubation mit Miltefosin	73
Abbildung 27: Darstellung der PS-exponierenden Erythrozyten.....	74
Abbildung 28: Darstellung der PS-exponierenden Erythrozyten und Hämolyse durch Miltefosin	75
Abbildung 29: Wirkung von Miltefosin auf das Erythrozytenvolumen und die PS-Exposition	76
Abbildung 30: PS-exponierende Erythrozyten und Zellvolumenminderung über 48 Stunden....	77
Abbildung 31: Die Wirkung der Kalziumdepletion auf Annexin V bindende Erythrozyten und Veränderungen im Forward Scatter Kanal	78
Abbildung 32: Wirkung von hochdosierter Kaliumlösung auf das Zellvolumen	79
Abbildung 33: Der Einfluss auf die Annexin V-Bindung in hochdosierter Kaliumlösung nach Inkubation mit Miltefosin	80

10 TABELLARISCHER ANHANG

<i>Tabelle 1:</i> Übersicht der Caspasen mit Aufteilung in Unterfamilien (I-III) und Funktion.....	24
<i>Tabelle 2:</i> Einteilung der TNF-Rezeptoren mit zugehörigen Liganden nach Funktion.....	25
<i>Tabelle 3:</i> Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösung.....	49
<i>Tabelle 4:</i> Zusammensetzung der verwendeten Ca^{2+} -depletierten Lösung.....	50
<i>Tabelle 5:</i> Zusammensetzung des verwendeten Annexin-Waschpuffers.....	50

11 DANKSAGUNG

Attempto! Ich wage es!

Das Motto der Universität Tübingen. Dieses kann jedoch nur wörtlich genommen werden, wenn Menschen einen dabei unterstützen und die Möglichkeit geben zu beginnen und sich zu bemühen. Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang für sein Vertrauen, die Überlassung des Themas dieser Dissertationsschrift und die ausgezeichneten Möglichkeiten, welche zur Bearbeitung bereitgestellt wurden. Zusätzlich bedanke ich mich für die Zuverlässigkeit und Präsenz bei Fragen und Problemen. Danke auch für das Vertrauen der Nutzung wertvoller Laborgeräte sowie die regelmäßigen Treffen, in denen Ergebnisse vorgestellt, Anregungen gegeben und Diskussionen gefördert wurden. Die letzten Jahre an Ihrem Institut verschafften mir einen detaillierten Einblick des wissenschaftlichen Arbeitens, welches für die zukünftige akademische Laufbahn von Vorteil ist. Ich danke Ihnen für diese Chance.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Betreuern Frau Dr. med. Elisabeth Lang und Herrn Dr. med. Majed Abed verpflichtet, welche mir das wissenschaftliche Arbeiten präzise beibrachten. Die gelehrte Sachkenntnis und die Fähigkeiten der Literaturrecherche halfen mir sehr bei der Erstellung meiner Arbeit. Bei Herrn Dr. med. Majed Abed bedanke ich mich für die kontinuierliche Präsenz, den fachlichen Rat bei Problemen sowie die dauerhafte Verbreitung positiver Stimmung, die einem nach fehlgeschlagenen Experimenten zur Ausdauer verhalf. Bei Frau Dr. med. Elisabeth Lang bedanke ich mich besonders, für die ausgezeichnete Lehre und die gegebenen Möglichkeiten der selbständigen Ausführung von Ideen und Experimenten. Die von Frau Dr. med. Elisabeth Lang professionell durchgeführte Laborarbeit diente mir als Beispiel und Vorbild. Diverse Unklarheiten über themenbezogene Zusammenhänge konnten von Ihr verständlich erklärt werden. Vielen Dank für die fachkundigen Hinweise und die Hilfe bei der Beurteilung von Einstellungen der Messgrößen und von Versuchsergebnissen. Besonders danke ich Ihr für die Vermittlung beständiger Motivation und das intensive Betreuungsverhältnis. Nicht nur der

themenbezogene Informationsaustausch sondern auch unsere privaten Gespräche haben meine Forschungszeit im Physiologischen Institut Tübingen bereichert. Danke für die Anregung und den Austausch von Gedanken, auch nach der Laborarbeit.

Des Weiteren danke ich Michael Theurer, Tabea Hermann und Nazneen Shaik, welche mich in der Anfangszeit mit den Abläufen, Geräten und Räumlichkeiten vertraut gemacht haben. Rosi Bissinger, Paola Modicano und Leonie Frauenfeld danke ich für die gute produktive Zusammenarbeit und die Unterstützung die wir einander geben konnten, sowie für viele angenehme aber auch anstrengende Stunden im Labor.

Besonderer Dank gilt Kousi Al Zoubi, welchen ich ebenso bei technischen oder sachlichen Problemen fragen durfte. Vor allem in der finalen Phase meiner Arbeit konnte er mir mit diversen Ratschlägen weiterhelfen – vielen Dank. Mein weiterer Dank gebührt allen Mitarbeitern des Physiologischen Insituts Tübingen, wobei hier insbesondere Michael Föllner, Lejla Subasic und Tanja Loch hervorzuheben sind.

Ebenso danke ich meinen Freunden Anabel Kersten, Stella Metzger, Johanna von Spee, Constantin Pläcking, Felix Rieber, Lena Tolkmitt, Lennart Meyer, Anjolie Krunnies und Anja Kalfaß für das Zuhören, den Optimismus und die Kraft die ihr mir mit eurer Freundschaft in ergebnislosen Phasen der Arbeit geben konntet. Außerdem möchte ich euch für die schöne unvergessliche Studienzeit in Tübingen danken. Danke auch Stephan Wennagel für die Untersützung bei der Organisation von Datenmaterial.

Besonderer Dank gebührt Marietta Bruns, welche durch ihre beständige Freundschaft einen festen Anker für mich darstellte, mich motivierte und durch fachliche Ratschläge über Vorgehensweisen wissenschaftlicher Arbeiten herausragte. Danke für die Bereicherung der vielen fachlichen und privaten Stunden miteinander.

Für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit, sowie die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren möchte ich von ganzem Herzen Frau

Dr. med. Elisabeth Lang, sowie meiner Schwester Nicole Jacobi und meinem Vater Holger Stegmann danken. Hervorheben möchte ich das herausragende Engagement meiner Schwester Nicole Jacobi, welche mir dauerhaft und gerade in schwierigen Zeiten geduldig und liebevoll zur Seite stand. Sie war jederzeit eine unentbehrliche Stütze, Wegbegleiterin und eine unendliche Bereicherung meiner Studien- und Forschungszeit in Tübingen.

Schließlich gilt mein stärkster und verbindlichster Dank meiner Familie: Gabriele Jacobi, Nicole Larissa Natalie Jacobi, Holger Werner Karl Heinz Stegmann und Herbert Jacobi. Ohne eure kontinuierliche Unterstützung wären der Aufwand für die Forschungsarbeit und diese Dissertationsschrift nicht möglich gewesen. Danke für eure Investition, Zeit und Liebe.

12 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Geburtstag & -ort am 19.12.1988 in Hamburg
Nationalität deutsch

Studium und praktische Tätigkeiten

01/2017 Mitglied der Ärztekammer Hamburg
23.12.2016 Approbation als Ärztin nach §3 der Bundesärzteordnung (Baden-Württemberg)
09.12.2016 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut) Gesamtnote: 2,33
05.11.2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)

11/2015-10/2016 Praktisches Jahr
1. Tertial - Wahlfach Radiologie
Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Strasse 3, 72076 Tübingen für 2 Monate
Auslandsstudium am Flinders Medical Centre, Medical Imaging Department, Flinders Drive, Bedford Park SA 5042, Adelaide, Australien für 2 Monate
2. Tertial - 4 Monate Allgemeine Chirurgie, Kantonsspital Münsterlingen, Spitalcampus 1, 8596 Münsterlingen, Schweiz
3. Tertial - 4 Monate Innere Medizin am Universitätsklinikum Tübingen

30.03.- 12.04.2015 Famulatur im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für diagnostische und interventionelle Radiologie, Martinistraße 52, 20246 Hamburg

15.02.- 02.03.2015 Famulatur im Ev. Amalie Sieveking-Krankenhauses, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Haselkamp 33, 22359 Hamburg

23.08.-21.09.2014 Auslandsfamulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe im Spital Herisau, Appenzell-Ausserrhoden, Frauenklinik, 9100 Herisau, Schweiz

15.03.-13.04.2014 Tätigkeit als Famulus in der hausärztlichen Versorgung in der Praxis von K. Eckmann und Dr. med. T. Eckmann, Fachärzte für Allgemeinmedizin, Lasbeker Str. 2, 22143 Hamburg

05.08.-03.09.2013 Famulatur in der Dermatologie, Asklepios Nordseeklinik unter Chefarzt Dr. Buhles, Norderstr. 81, 25980 Sylt / OT Westerland

04.04.2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)
04/2010 Studienbeginn Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Forschungsarbeit, Publikationen, Kongreßteilnahme

- 09/2012-01/2015 Experimentelle Forschungsarbeit am Institut für Physiologie I in der Arbeitsgruppe Eryptose unter der Leitung von Prof. Dr. med. F. Lang, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Gmelinstr. 5, 72076 Tübingen
- Publikationen
1. Jacobi J., et al., *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by mitotane*. Cell physiol biochem, 2014. 33(5):1516-26.
 2. Bissinger R., et al., *Estramustine-induced suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2013. 32(5):1426-36.
 3. Munoz C., et al., *Effect of miltefosine on erythrocytes*. Toxicol In Vitro, 2013. 27(6):1913-9.
- 03.-05.03.2013 Teilnahme am 92. Kongreß der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG) in Heidelberg. Präsentation des Posters: „*Effect of miltefosine on erythrocytes*“.

Lehrtätigkeit an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- 09/2013- 12/2013 Tischassistentin im Präparierkurs am Anatomischen Institut incl. Seminarleitung der Lehrinhalte für die “Sectio chirurgica”, (Zeitraum: 1 Semester) Klinische Anatomie, Elfriede-Aulhorn-Str. 8, 72076 Tübingen
- 19.-20.09.2013 Teilnahme an der Tutorenschulung des Kompetenzzentrums für Hochschuldidaktik in Medizin, Baden-Württemberg
- 10/2012-02/2013 Tutorin des „Grundkurs für Chirurgische Techniken“ (Zeitraum: 1 Semester) DocLab, Interdisziplinäres Ausbildungszentrum, Elfriede-Aulhorn-Straße 10, 72076 Tübingen
- 10/2011- 07/2012 Seminarleitung im Bereich der makroskopischen Anatomie, Vorklinik (Zeitraum: 2 Semester) Anatomisches Institut, Österbergstr. 3, 72074 Tübingen

Nebenerwerbstätigkeit

- 07/2013-04/2014 Studentische Hilfskraft für Blutabnahmen im „Needle-Team“ auf der Inneren Medizin II, unter der Leitung von J. Riegger Fallmanager, Universitätsklinikum Tübingen, Medizinische Klinik und Poliklinik, Otfried-Müller-Str. 10, 72076 Tübingen

Außeruniversitäres Engagement, Freiwilligen Dienst, Schulausbildung, Fremdsprachen

- 2010-2012 Tübinger Fachschaftsgruppe: Arbeitskreis Austausch, Betreuung und Organisationshilfe für internationale Studenten
- 09/2008-08/2009 Ausbildung zur Rettungssanitäterin im Rahmen des Freiwilligen Sozialen Jahres bei der Johanniter Unfallhilfe Hamburg
- 06/2008 Allgemeine Hochschulreife (Abschlußnote: 1,7), Hamburg
- 01/-12/2005 Marryatville-Highschool, Adelaide, Australien
- 1999-2008 Gymnasium Oldenfelde, Hamburg
- Fremdsprachen Englisch: Fließend, Lateinisch: Latinum

