

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

**Einfluss der Ionophor-Antiinfektiva
Salinomycin, Nystatin und Nigericin
auf die Apoptose der Erythrozyten**

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

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

vorgelegt von

Malik, Abaid

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Wolz

Tag der Disputation: 21.06.2017

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Erythrozyten.....	1
1.1.1 Erythropoese.....	2
1.1.2 Aufbau der Erythrozytenmembran.....	3
1.2 Eryptose.....	4
1.2.1 Mechanismen und Signalwege.....	4
1.2.1.1 Der Gardos-Kanal.....	6
1.2.2 Klinische Relevanz der Eryptose.....	7
1.3 Anämie.....	8
1.4 Antibiotika und Antimykotika.....	9
1.5 Ionophor-Antiinfektiva.....	9
1.6 Salinomycin, Nystatin und Nigericin.....	11
1.6.1 Salinomycin.....	11
1.6.2 Nystatin.....	12
1.6.3 Nigericin.....	13
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Erythrozyten.....	16
2.2 Ringer-Lösung.....	16
2.3 Annexin-Waschpuffer.....	17
2.4 Durchflusszytometrie (FACS).....	18
2.5 Annexin-V-Bindung und Forward Scatter (FSC).....	19
2.6 Fluo-3-Fluoreszenz.....	20
2.7 Calciumfreie Ringer-Lösung.....	22
2.8 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	23
2.9 Hämolyse.....	24
2.10 Ceramid.....	24
2.11 Intrazellulärer pH (pH _i).....	26
2.12 Cariporid.....	27
2.13 Statistik.....	27
3 ERGEBNISSE	28
3.1 Einfluss von Salinomycin auf die Eryptose.....	28

3.1.1	Erythrozytäre Phosphatidylserinexposition (Annexin-V-Bindung).....	28
3.1.2	Erythrozytäre Zellgröße (Forward Scatter (FSC))	29
3.1.3	Intrazelluläre Calciumkonzentration (Fluo-3-Fluoreszenz)	29
3.1.4	Calciumfreie Ringer-Lösung	30
3.1.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	31
3.1.6	Hämolyse	33
3.1.7	Ceramid.....	33
3.2	Einfluss von Nystatin auf die Eryptose	34
3.2.1	Erythrozytäre Phosphatidylserinexposition (Annexin-V-Bindung).....	34
3.2.2	Erythrozytäre Zellgröße (Forward Scatter (FSC))	35
3.2.3	Intrazelluläre Calciumkonzentration (Fluo-3-Fluoreszenz)	35
3.2.4	Calciumfreie Ringer-Lösung	36
3.2.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	37
3.2.6	Hämolyse	38
3.2.7	Ceramid.....	38
3.3	Einfluss von Nigericin auf die Eryptose	40
3.3.1	Erythrozytäre Phosphatidylserinexposition (Annexin-V-Bindung).....	40
3.3.2	Erythrozytäre Zellgröße (Forward Scatter (FSC))	40
3.3.3	Intrazelluläre Calciumkonzentration (Fluo-3-Fluoreszenz)	41
3.3.4	Calciumfreie Ringer-Lösung	42
3.3.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	43
3.3.6	Hämolyse	44
3.3.7	Ceramid.....	44
3.3.8	Intrazelluläre pH-Messung (pHi)	45
3.3.9	Cariporid (Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher-Inhibitor).....	46
4	DISKUSSION	49
4.1	Salinomycin-induzierte Eryptose.....	49
4.2	Nystatin-induzierte Eryptose	52
4.3	Nigericin-induzierte Eryptose	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	LITERATURVERZEICHNIS	58
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT	75
8	DANKSAGUNG	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ACD	Anemia of Chronic Disease
AM	Acetoxymethyl-Ester
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANOVA	Analysis of Variance
Arb.	Arbitrary
ATPase	Adenosintriphosphatase
β	Beta
BCECF	2'-7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein
BD	Becton Dickinson
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca^{2+}	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CK1 α	Casein-Kinase 1 α
Cl^-	Chlorid
CXCL16/SR-PSOX	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16/Scavenger Receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
Dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FL	Fluorescence channel
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Glut 1	Glucose transporter 1
h	Stunde
H^+	Proton
H_2O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK3	Janus aktivierte Kinase 3

K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M1	Marker
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mOsm	Milliosmol
mM	Millimolar
n	Number (Anzahl der Blutspender)
Na ⁺	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCX1	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
p-Wert	Probability
p38 MAP Kinase	p38 mitogen-activated protein kinase
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAK 2	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE2	Prostaglandin E2
pH	Lat. <i>potentia hydrogenii</i>
pHi	Intrazellulärer pH
pKa	Säurekonstante
PKC	Proteinkinase C
RCF	Relative centrifugal force
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Revolutions per minute
SEM	Standard error of mean
SSC	Side scatter
TRPC6	Transient receptor potential channel
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenfassung der Hauptmechanismen zur Auslösung einer Eryptose, modifiziert nach [63].	6
Abbildung 2: Ionophor-Transport (selbst erstellt)	10
Abbildung 3: Strukturformel von Salinomycin [127]	11
Abbildung 4: Strukturformel von Nystatin [137]	12
Abbildung 5: Strukturformel von Nigericin [158]	13
Abbildung 6: Strukturformel von Fluo-3-AM [173]	22
Abbildung 7: Effekt von Salinomycin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	28
Abbildung 8: Effekt von Salinomycin auf das erythrozytäre Forward Scatter (FSC)	29
Abbildung 9 Effekt von Salinomycin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten	30
Abbildung 10: Effekt des Calciumentzugs auf die Salinomycin-induzierte Annexin-V-Bindung in Erythrozyten	31
Abbildung 11: Salinomycin-induzierter oxidativer Stress in Erythrozyten	32
Abbildung 12: Effekt von Salinomycin auf die Ceramidbildung in Erythrozyten	33
Abbildung 13: Effekt von Nystatin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	34
Abbildung 14: Effekt von Nystatin auf das erythrozytäre Forward Scatter (FSC)	35

Abbildung 15: Effekt von Nystatin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten	36
Abbildung 16: Effekt des Calciumentzugs auf die Nystatin-induzierte Annexin-V-Bindung in Erythrozyten	37
Abbildung 17: Effekt von Nystatin auf die erythrozytäre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	38
Abbildung 18: Effekt von Nystatin auf die Ceramidbildung in Erythrozyten	39
Abbildung 19: Effekt von Nigericin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten	40
Abbildung 20: Effekt von Nigericin auf das erythrozytäre Forward Scatter (FSC)	41
Abbildung 21: Effekt von Nigericin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten	42
Abbildung 22: Effekt des Calciumentzugs auf die Nigericin-induzierte Annexin-V-Bindung in Erythrozyten	43
Abbildung 23: Effekt von Nigericin auf die erythrozytäre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	44
Abbildung 24: Effekt von Nigericin auf die Ceramidbildung in Erythrozyten.....	45
Abbildung 25: Effekt von Nigericin auf den intrazellulären pH-Wert der Erythrozyten	46
Abbildung 26: Effekt von Nigericin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten in Anwesenheit und Abwesenheit von Cariporid	47

Abbildung 27: Effekt von Nigericin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten in Anwesenheit und Abwesenheit von Cariporid 48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung der Ringer-Lösung.....	17
Tabelle 2: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers	17
Tabelle 3: Zusammensetzung der calciumfreien Ringer-Lösung	23
Tabelle 4: Zusammensetzung der PBS-Lösung	25

1 EINLEITUNG

1.1 Erythrozyten

Erythrozyten sind zweifelsohne eine der wichtigsten Zellen des menschlichen Körpers und erfüllen viele lebensnotwendige Aufgaben. Mikroskopisch betrachtet weisen sie von oben eine zirkuläre Form auf und haben einen Durchmesser von etwa 6-8 μm [1]. Betrachtet man sie hingegen im Mikroskop von der Seite, erscheinen sie bikonkav und haben eine Dicke von etwa 2 μm [1]. Durch diese Form vergrößern Erythrozyten ihr Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und können auf diese Weise vermehrt Sauerstoff und Kohlendioxid aufnehmen bzw. abgeben [2].

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff im Blut zu allen im Körper gelegenen Geweben [3]. Aufgrund ihrer besonderen Form sind sie geradezu ideal für die Erfüllung dieser Aufgabe aufgebaut, denn sie besitzen eine flexible Plasmamembran, dank derer sie selbst 2-3 μm kleine Kapillaren passieren können [4]. Verantwortlich für den Sauerstofftransport ist das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin. Das adulte Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten (2 Hb α und 2 Hb β), die jeweils aus einer Polypeptidkette (Globin) und einem eisenhaltigen Porphyrinring (Häm) aufgebaut sind [5].

Damit Erythrozyten Sauerstoff und Kohlendioxid aufnehmen bzw. abgeben (Affinität) können, müssen bestimmte biochemische Bedingungen vorherrschen. Die Affinität von Hämoglobin zu Sauerstoff wird von vielen Faktoren beeinflusst und lässt sich anhand einer Sauerstoffbindungskurve sehr anschaulich beschreiben [6]. Die wichtigsten Faktoren hierbei sind Temperatur, pH-Wert, die 2,3-Bisphosphoglycerat-Konzentration in Erythrozyten und der Kohlendioxidgehalt im Blut. So kommt es beispielsweise in den alveolären Kapillaren der Lunge zu einem rapiden Abfall des Kohlendioxidgehaltes, was zu einem erhöhten pH-Wert (Alkalose) führt [6]. Unter diesen Bedingungen steigt die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff, d.h. Hämoglobin bindet den Sauerstoff leichter und kann viel hiervon aufnehmen. In den peripheren Kapillaren sind die

EINLEITUNG

biochemischen Bedingungen genau umgekehrt. Hier herrscht ein hoher Kohlendioxidgehalt vor, was zu einer Erniedrigung des pH-Wertes (Azidose) führt. In der Folge entsteht eine geringe Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff, welcher somit leichter an das Gewebe abgegeben werden kann. Neben der Versorgung von Geweben mit Sauerstoff transportieren Erythrozyten auch das Kohlendioxid von den Geweben zu der Lunge, wo es abgeatmet werden kann und regulieren auf diese Weise den pH-Wert des Blutes [6].

Um einen optimalen Sauerstofftransport zu gewährleisten, verwerfen Erythrozyten bereits während ihrer Reifung im Knochenmark ihren Zellkern [7] und sind daher nicht mehr in der Lage, Nukleinsäuren, Proteine oder Lipide zu synthetisieren [3]. Deshalb sind sie auch nicht zur Proliferation befähigt [7]. Aufgrund dieser Tatsache haben Erythrozyten eine begrenzte Lebensdauer von etwa 120 Tagen und werden bei Alterung oder Funktionsuntüchtigkeit von Makrophagen in Milz und Leber abgebaut [8]. Damit es durch den Abbau nicht zu einem Abfall der Zellpopulation kommt, werden Erythrozyten kontinuierlich im Knochenmark neu gebildet [9].

1.1.1 Erythropoese

Der Begriff Erythropoese bezeichnet die Regulation und Neubildung von Erythrozyten und findet physiologisch im Erwachsenenalter im roten Knochenmark statt [10]. In der Embryonalzeit erfolgt jedoch die Bildung der Erythrozyten im Mesenchym des Dottersacks [11]. Im weiteren Verlauf der fetalen Entwicklung übernehmen hauptsächlich Leber, Milz und Thymus diese Aufgabe [11, 12], sodass am Ende der fetalen Entwicklung das rote Knochenmark der Hauptort für die Bildung der Erythrozyten ist [13]. Die Erythropoese wird durch das Hormon Erythropoetin stimuliert, welches bei einem Sauerstoffmangel durch die Nieren ins Blut freigesetzt wird [11]. Nach dessen Freisetzung bindet Erythropoetin an Rezeptoren der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes [14], aus denen sich dann über mehrere Zwischenstufen reife Erythrozyten bilden [11].

1.1.2 Aufbau der Erythrozytenmembran

Um sich von dem Extrazellularraum abzugrenzen, verfügen Erythrozyten, wie auch andere Zellen, über eine Zellmembran [15]. Die Erythrozytenmembran ist dreischichtig aufgebaut und setzt sich aus Kohlenhydraten (8 %), Proteinen (52 %) und Lipiden (40 %) zusammen [16]. Die Membran besteht im Wesentlichen aus einer bipolaren Lipiddoppelschicht, die auf ihrer extrazellulär zugewandten Seite eine Glykokalix und der dem Zytosol zugewandten Seite ein Membranskelett enthält [17].

In der bipolaren Lipiddoppelschicht sind Transmembranproteine eingebettet. Die Lipiddoppelschicht besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, zwischen denen Cholesterinmoleküle eingelagert sind [18]. Während Cholesterinmoleküle zwischen der inneren und der äußeren Lipiddoppelschicht symmetrisch verteilt sind [19], sind die verschiedenen Phospholipide asymmetrisch verteilt [20, 21]. So enthält die äußere Schicht der Lipiddoppelmembran Phosphatidylcholin und Sphingomyelin. Die innere Schicht enthält hingegen Phosphatidylethanolamin, Phosphoinositol und Phosphatidylserin [18, 20, 21]. Diese Asymmetrie der Phospholipide wird durch die energieabhängigen Phospholipidtranslokatoren Flippasen und Floppasen (monodirektional) und der energieunabhängigen Phospholipid-Scramblase (bidirektional) aufrechterhalten [18]. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lipide bestimmt somit die Fluidität und die Permeabilität der Membran [22].

Die Glykokalix besteht aus Kohlenhydraten und ist an Lipide oder Proteine der äußeren Membranschicht gebunden. Die Glykolipide der Glykokalix von Erythrozyten beinhalten die Blutgruppenzugehörigkeit [17, 23] und spielen immunologisch eine wichtige Rolle [24].

Das auf der Innenseite der Lipiddoppelmembran lokalisierte Membranskelett besteht aus einem dichten strukturgebenden Netzwerk, welches hauptsächlich filamentartige Proteine und andere Proteine, wie α , β -Spektrin [25], Ankyrin, Aktin und Glycophorin [26] enthält. Das Membranskelett verleiht den Erythrozyten eine gute Widerstandsfähigkeit und Verformbarkeit [27].

EINLEITUNG

Die Transmembranproteine der Erythrozytenmembran erfüllen mannigfaltige Aufgaben und dienen beispielsweise als Transportproteine, Adhäsionsproteine und Signalrezeptoren. Folgende Membranproteine fungieren als Transportproteine: Band 3 (Anionentransporter) [28], Aquaporin 1 (H₂O-Transporter) [29], Glut 1 (Glukose und L-Dehydroascorbinsäure-Transporter) [30], Kidd-Antigen-Protein (Harnstofftransporter) [31], Na⁺-K⁺-ATPase [32], Ca²⁺-ATPase [33], Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter [34], Na⁺-K⁺-Cotransporter [35], K⁺-Cl⁻-Cotransporter [34], Gardos-Kanal [18] und Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE1) [36].

1.2 Eryptose

Eryptose ist ein Portmanteauwort, welches sich aus den beiden Begriffen Erythrozyten und Apoptose zusammensetzt und den suizidalen Zelltod von Erythrozyten bezeichnet. Die Eryptose ist ein Prozess, der im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen weder einen Zellkern noch Mitochondrien benötigt [37]. Aus diesem Grund fehlen der Eryptose auch wichtige Signaltransduktionswege [38], wie beispielsweise die mitochondriale Depolarisation und die Zellkernkondensierung [37]. Diese sind klassischerweise ein Merkmal der Apoptose kernhaltiger Zellen und finden während der Eryptose nicht statt [39].

Neben den genannten Unterschieden weisen Erythrozyten auch Gemeinsamkeiten zur Apoptose kernhaltiger Zellen auf, wie z.B. Zellschrumpfung, Bläschenbildung und „Zellmembran-Scrambling“ (Phosphatidylserinexposition auf die Membranoberfläche) [39, 40]. Erythrozyten werden während der Eryptose von Makrophagen erkannt, aufgenommen und anschließend abgebaut [41]. Dieser Vorgang dient der Eliminierung von potenziell schädlichen Zellen, ähnlich wie bei der Apoptose kernhaltiger Zellen [42].

1.2.1 Mechanismen und Signalwege

Einer der Hauptmechanismen zur Einleitung der Eryptose ist der Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺, welcher durch den Einstrom von Ca²⁺ über die Zellmembran der Erythrozyten ausgelöst wird. Erythrozyten exprimieren calciumpermeable nicht-selektive Kationenkanäle, deren molekulare Identität noch nicht näher definiert wurde. Allerdings

EINLEITUNG

wird angenommen, dass TRPC6-Kanäle (transient receptor potential channel) daran beteiligt sind [43]. Die nicht-selektiven Kationenkanäle werden durch hyperosmolaren Stress [44], Prostaglandin E₂ (PGE₂) [45], oxidativen Stress [46], extrazelluläres Cl⁻ [47] und Glukoseentzug [48] stimuliert. Die Zellschrumpfung, ein weiteres Merkmal der Eryptose, ist die Folge des Einstroms von Ca²⁺ durch die nicht-selektiven Kationenkanäle. Der Einstrom von Ca²⁺ führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch diese Zunahme werden calciumsensitive Kaliumkanäle (Gardos-Kanäle) stimuliert, deren Aktivierung zu einem Kaliumausstrom und zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen. Durch den hierdurch erzeugten elektrischen Gradienten kommt es zu einem Ausstrom von Cl⁻, das zusammen mit einem Kaliumausstrom das Wasser aus der Zelle treibt und zur Schrumpfung dieser führt [49].

Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert des Weiteren Calpain, eine Cysteinendopeptidase, welche Proteine des Zytoskeletts abbaut, wodurch die Ausknospung der Zellmembran begünstigt wird [50]. Ferner stimuliert eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration das Zellmembran-Scrambling, was zu einem Zusammenbruch der Phospholipidasymmetrie und zur Exposition von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche führt [51].

Eine Eryptose kann außerdem durch die Bildung von Ceramid ausgelöst werden. Ceramid wird aus Sphingomyelin durch das Enzym Sphingomyelinase synthetisiert [52]. Ceramid erhöht die Sensitivität der Erythrozyten für eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration [53], kann aber auch ohne einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ eine Eryptose auslösen [52]. Ein weiterer Mechanismus zur Bildung von Ceramid ist der plättchenaktivierende Faktor (PAF). Dieser wird durch eine osmotisch bedingte Zellschrumpfung der Erythrozyten freigesetzt. In Erythrozyten, die PAF-Rezeptoren exprimieren, führt die Bindung von PAF zum Zusammenbruch von Sphingomyelin. Dieser Zusammenbruch führt sogar unter isotonischen Bedingungen zur Bildung von Ceramid [54].

Die Aktivierung von Kinasen kann bei der Induktion der Eryptose eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Aktivierung der p38 MAP-Kinase [55], der Proteinkinase C (PKC) [48],

EINLEITUNG

der p21 aktivierten Kinase (PAK2) [56], der Casein-Kinase 1 α (CK1 α) [57], der Janus aktivierten Kinase 3 (JAK3) [58], der AMP aktivierten Kinase (AMPK) [59] und der cGMP abhängigen Proteinkinase [60].

Des Weiteren kann eine Eryptose auch durch Caspasen ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch die Aktivierung der Caspase 3, die durch oxidativen Stress aktiviert wird und die Exposition von Phosphatidylserin stimuliert [61]. Eine Phosphatidylserintranslokation, die durch eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration bedingt ist, benötigt hingegen keine Caspase 3 Aktivierung [62].

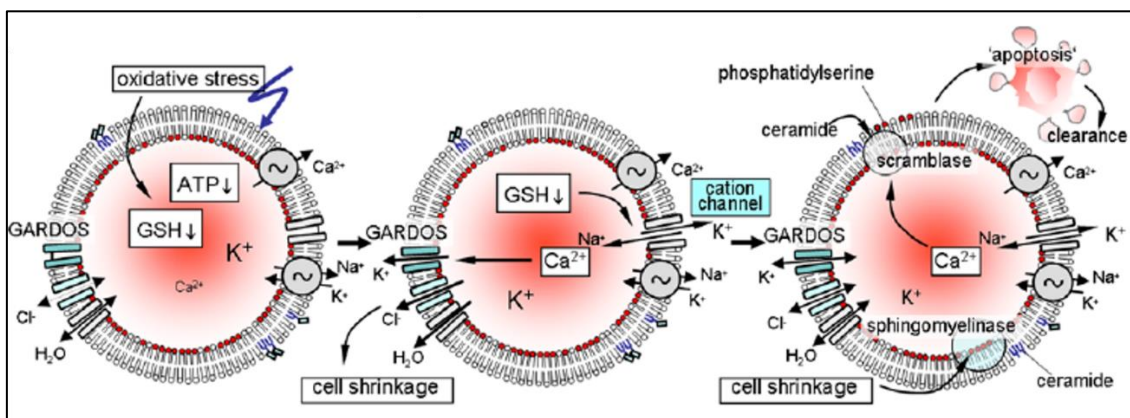


Abbildung 1: Zusammenfassung der Hauptmechanismen zur Auslösung einer Eryptose, modifiziert nach [63].

1.2.1.1 Der Gardos-Kanal

Um ein Gleichgewicht des elektrochemischen Gradienten zu wahren, verfügen Erythrozyten u.a. über Gardos-Kanäle. Man geht davon aus, dass jeder Erythrozyt in etwa 100-200 Gardos-Kanäle besitzt [64, 65]. Es wird angenommen, dass der Gardos-Kanal aus einem Homo-Tetramer, das aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut ist, besteht [66]. Der Kanal hat eine hohe Selektivität für K^+ gegenüber Na^+ , jedoch kann der Kaliumausstrom aus dem Kanal durch höhere intrazelluläre Natriumkonzentrationen inhibiert werden [66]. Die Aktivität des Gardos-Kanals ist abhängig von der Temperatur [67] und dem pH [68]. Durch die Aktivierung des Kanals kommt es zu einem Ausstrom von KCl und Wasser aus der Zelle und somit zu einer Zellschrumpfung [49, 69].

1.2.2 Klinische Relevanz der Eryptose

Physiologisch ist die Eryptose ein wichtiger Mechanismus, um defekte Erythrozyten rechtzeitig aus dem Blutkreislauf zu entfernen, bevor diese intravasal hämolysieren. Bei einer Hämolysen würde es zu einem Austritt von Hämoglobin kommen, welches als freies Hämoglobin durch die glomeruläre Filtration intraluminal ausfallen und somit zur Okklusion der Nierentubuli führen könnte [70]. Pathophysiologisch spielt die Eryptose eine wichtige Rolle, da Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten zügiger aus dem Blutkreislauf entfernt werden [53]. Dies geschieht dadurch, indem Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten von phagozytierenden Zellen erkannt und anschließend abgebaut werden [53]. Die abgebauten Erythrozyten können nicht in dem Maße durch die Erythropoese substituiert werden, wie sie während der Eryptose aus dem Blutkreislauf entfernt werden, wodurch eine Anämie resultiert [53].

Des Weiteren haften Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten an die Gefäßwand, indem sie an den endothelialen Rezeptor CXCL16/SR-PSO binden [71]. Diese Haftung an die Gefäßwände schränkt die Mikrozirkulation des Blutes ein [71-74]. Ferner stimulieren Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten die Blutgerinnung und fördern auf diese Weise die Bildung von Thrombosen [72, 75, 76].

Die Eryptose könnte auch ein wichtiges Hilfsmittel in der Bekämpfung der Malaria sein, da Eryptose auslösende Pharmaka dazu beitragen könnten eine Parasitämie zu limitieren, indem Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten zügiger aus dem Blutkreislauf entfernt werden [77]. Der Malaria-Erreger *Plasmodium* führt in infizierten Erythrozyten zu einem oxidativen Stress. Hierfür aktiviert das *Plasmodium* in den Erythrozyten verschiedene Ionenkanäle, einschließlich calciumpermeable Kationenkanäle [53, 78]. Ein Calciumeinstrom durch diese Kationenkanäle löst eine Eryptose aus, sodass die infizierten Erythrozyten rapide aus dem Blutkreislauf beseitigt werden [77]. Viele genetische Störungen der Erythrozyten wie zum Beispiel die Sichelzellanämie, die Beta-Thalassämie, das Hämoglobin C und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel (G6PD(H)) schützen vor einer schweren Malariaerkrankung. Dieser Schutz beruht teilweise auf genetischen Störungen, die Erythrozyten für die Eryptose anfälliger machen [53, 79-81]. Eine erhöhte Eryptose könnte neben Malaria auch gegen Intoxikationen mit

verschiedenen Xenobiotika, wie zum Beispiel Blei, Chlorpromazin oder NO-Synthase-Inhibitoren protektiv wirken [82, 83].

1.3 Anämie

Eine Blutarmut wird als Anämie bezeichnet und ist definiert als eine Abnahme der Erythrozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits [84]. Je nach Schweregrad präsentiert sich eine Anämie klinisch u.a. durch Abgeschlagenheit [85], Blässe [86], Kopfschmerzen [87], verminderte geistige Aktivität [88] und Dyspnoe [89]. Diese Symptome sind auf eine Mangelversorgung des Körpers mit Sauerstoff zurückzuführen [90]. Eine schwere und vor allem langanhaltende Anämie kann Organe, wie beispielsweise das Herz, schädigen [91].

Die Ursachen einer Anämie sind sehr vielfältig und können in erworbene [92, 93] oder angeborene Anämien [94] unterteilt werden. Der wohl häufigste Grund für eine Anämie ist ein Eisenmangel [95], welcher durch Blutverluste [95], durch Malabsorption [95] oder Malnutrition [96] hervorgerufen wird. Ein weiterer Grund für Anämien sind chronische Erkrankungen (Anemia of Chronic Disease, ACD), wie zum Beispiel Tumore, Infektionen und Autoimmunerkrankungen [97]. Ferner existieren auch hämolytische Anämien, die mit einer Zerstörung von Erythrozyten einhergehen [98]. Die hämolytischen Anämien können grob in korpuskuläre und extrakorpuskuläre unterteilt werden [99].

Auch eine chronische Niereninsuffizienz kann durch eine verminderte Bildung von Erythropoetin zur Anämie führen [100]. Schädliche Auswirkungen auf das Knochenmark, zum Beispiel durch Toxizität [101], Malignität [102] und ionisierende Strahlung [103] können eine Störung der Erythropoese bedingen und somit eine Anämie verursachen.

1.4 Antibiotika und Antimykotika

Antibiotika werden hauptsächlich gegen bakterielle Infektionen eingesetzt, wohingegen Antimykotika ihre Verwendung in der Bekämpfung von Pilzinfektionen finden. Beide Substanzklassen gehören zur Gruppe der Antiinfektiva. Antibiotika und Antimykotika werden in der Natur von Pilzen und Bakterien gebildet und werden heutzutage synthetisch modifiziert. Die Herstellung von neuen Antiinfektiva kann entweder halb- oder vollsynthetisch erfolgen [104].

Antibiotika können u.a. nach ihrem Wirkmechanismus eingeteilt werden. Sie hemmen entweder die Nukleinsäuresynthese [105], die Proteinbiosynthese [106] oder schädigen die Zellwand bzw. die Zellmembran [107]. Die in dieser Arbeit verwendeten Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin können in die Gruppe der Zellmembran schädigenden Substanzen eingeteilt werden, da sie Zellmembranen für Ionen durchlässiger machen [108-110].

1.5 Ionophor-Antiinfektiva

Lipophile Membranen sind grundsätzlich für geladene Partikel nicht durchlässig, weshalb Ionen nicht passiv durch eine Lipiddoppelschicht diffundieren können [15]. Transmembranproteine, wie zum Beispiel Ionenkanäle, Ionenaustauscher, Ionen-Cotransporter und ATP-abhängige Ionenpumpen sind daher besonders für den Transport von Ionen über die Zellmembran geeignet [15]. Außerdem existiert eine Reihe natürlich vorkommender Moleküle, die diesen Ionentransport über die Lipiddoppelschicht ermöglicht. Diese sind als Ionophore bekannt [15]. Ionophore sind Moleküle, die u.a. selektiv anorganische Kationen, wie beispielsweise Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und H^+ durch lipophile Barrieren (biologische Membranen) hindurch transportieren können [111]. Ionophore können auch selektiv Anionen transportieren. Diese kommen allerdings weitaus weniger häufig vor als Kationophore [15]. Kationophore lassen sich in Carrier-Ionophore und kanalbildende Ionophore unterteilen (Abb. 2) [112]. Carrier-Ionophore binden Ionen, diffundieren mit diesen durch die Membran hindurch und setzen diese auf der anderen Seite der Membran frei (Abb. 2). Ein kanalbildendes Ionophor besteht aus Peptiden und

EINLEITUNG

bildet einen Transmembrankanal (Pore), wodurch Ionen hindurch diffundieren können (Abb. 2) [112].

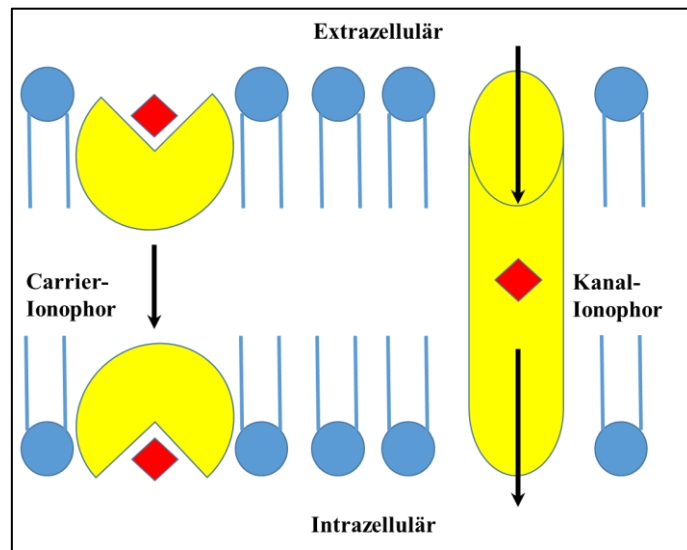


Abbildung 2: Ionophor-Transport (selbst erstellt)

Ionophore können biologischen Ursprungs sein, von Bakterien stammen oder synthetisch hergestellt werden [15]. Die Mehrzahl der Ionophore stammt von Bakterien ab und hat eine antibiotische Wirkung. Ionophore entfalten ihre Wirkung indem sie den Ionenkonzentrationsgradienten der Zelle abbauen und im Falle der Ionophor-Antibiotika zur Zerstörung der jeweiligen Bakterien führen [113, 114].

1.6 Salinomycin, Nystatin und Nigericin

1.6.1 Salinomycin

Salinomycin ist ein Polyether-Ionophor-Antibiotikum und stammt aus der Gattung der Streptomyceten [115]. Es weist eine starke Wirkung gegen verschiedene Erreger auf, wie beispielsweise Kokzidien [116] und Trypanosomen [117]. Außerdem zeigt Salinomycin in Experimenten nicht nur eine apoptotische Wirkung gegen Tumorzellen und Tumorstammzellen, sondern auch gegen Tumorzellen, die eine ausgeprägte Zytostatika-Resistenz aufweisen [108, 118, 119].

Salinomycin bewirkt über verschiedene Mechanismen eine apoptotische Wirkung [120]. Salinomycin ist ein Ionophor für Alkalimetalle und weist hierbei eine relative Selektivität für K^+ auf. Ferner sorgt Salinomycin für einen Kaliumausstrom aus den Mitochondrien und der Zelle [121]. Der Kaliumausstrom aus der Zelle führt u.a. zu einer Funktionsstörung der Mitochondrien [122], zu einer Aktivierung der Caspase über den mitochondrialen Signalweg [123], zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [124], zur Autophagie [125] und zu einer Aktivierung der p38 Kinase [123, 126].

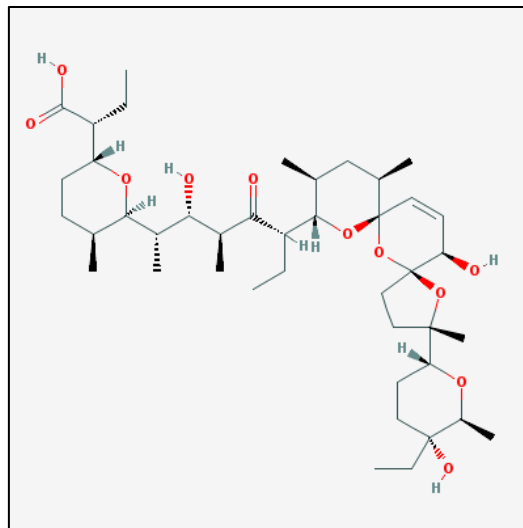


Abbildung 3: Strukturformel von Salinomycin [127]

EINLEITUNG

1.6.2 Nystatin

Bei Nystatin handelt es sich um ein Polyen-Makrolacton, ein Ionophor-Antibiotikum aus der Gattung der Streptomyceten [128]. Aufgrund seiner Eigenschaft als Ionophor erlaubt es Ionen, wie Na^+ , K^+ , H^+ und Cl^- , die Zellmembran zu passieren [109]. Eine Behandlung der Erythrozyten mit Nystatin führt zu einer Zerstörung des Ionengradienten entlang der Zellmembran [109]. Das Pharmakon wird als lokales Antimykotikum für die Behandlung von Pilzinfektionen und als Prophylaxe bei HIV-Infektionen verwendet [129-131]. Bei oraler Anwendung wird Nystatin kaum über die Darmschleimhaut aufgenommen und wirkt auf diese Weise hauptsächlich lokal im Intestinaltrakt [130]. Bei einer systemischen Applikation zeigt Nystatin toxische Nebenwirkungen, die sich klinisch in einer Thrombophlebitis, einem Rigor und Fieber präsentieren können [132]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Nystatin in seiner liposomalen Form [132] bei systemischer Applikation eine gute antifungale Wirkung und weniger Toxizität aufweist [133, 134]. Ferner konnte in *in vitro* Versuchen sogar eine Wirkung gegen Amphotericin B resistente Pilze gezeigt werden [135]. Daher wird Nystatin auch oft bei einer Resistenz gegenüber Amphotericin B angewandt [136]. Somit besteht durch den Einsatz von Nystatin Hoffnung auf eine bessere systemische Therapie gegen schwer zu behandelnde invasive Pilzinfektionen, wie beispielsweise der Aspergillose [135].

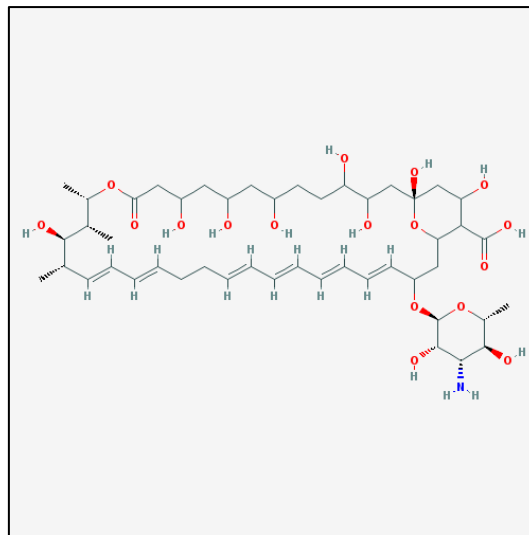


Abbildung 4: Strukturformel von Nystatin [137]

1.6.3 Nigericin

Nigericin ist ein Ionophor-Antibiotikum, welches aus der Gattung der Streptomyceten stammt [138] und Zellmembranen für H^+ und K^+ durchlässig macht [110, 139]. Neben einer antibakteriellen [140] und antiviralen [141] Potenz, zeigt Nigericin auch eine Wirkung gegen die Erreger der Malaria [142] und der Toxoplasmose [143]. Des Weiteren wird Nigericin für die Behandlung von Tumoren des Nasopharynx [144, 145], des Kolorektums [146] und der Prostata [147] in Betracht gezogen. Nigericin induziert eine Apoptose [148] durch die Zerstörung des Protonengradienten entlang der mitochondrialen Membran [149], durch eine Aktivierung von Caspasen [150] und durch eine Inhibierung der Autophagie [151]. Ferner induziert Nigericin einen nekrotischen Zelltod [150]. Die beteiligten Mechanismen von Nigericin auf zellulärer Ebene beinhalten eine Zunahme von oxidativem Stress [152], eine Freisetzung von Ca^{2+} [153] und eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration [154]. Weiterhin bewirkt Nigericin eine Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) [155], einen Energieentzug der Zelle [154], eine Aktivierung der Phospholipase A₂ [156] und eine Acylierung von Sphingomyelin [157].

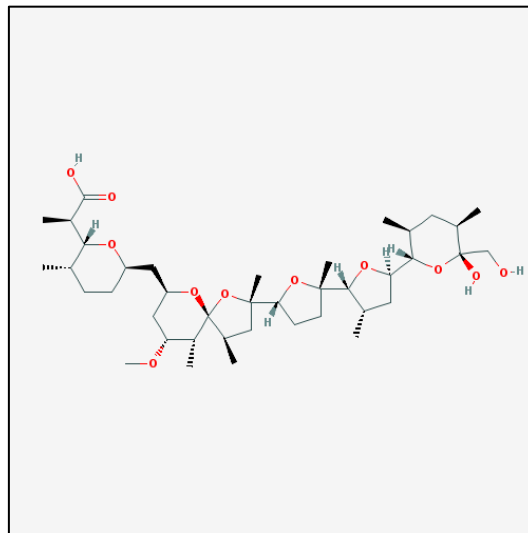


Abbildung 5: Strukturformel von Nigericin [158]

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Zeitalter von global wachsenden Antibiotikaresistenzen und multiresistenten Keimen [159] muss die Forschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe mit Hochdruck gefördert werden. Um in Zukunft gegen multiresistente Keime eine Chance zu haben, ist neben der Entwicklung neuer Antiinfektiva auch die Forschung an altbekannten Antiinfektiva unerlässlich [160]. Trotz ihres schlechten Nebenwirkungsprofils sind diese bei lebensbedrohlichen Infektionen mit multiresistenten Keimen immer noch lebensrettend [161]. Um in solchen lebensbedrohlichen Situationen ein Nutzen-Risiko besser abwägen zu können, ist eine Erforschung der Nebenwirkungen dieser alten Antiinfektiva von großer Bedeutung [160].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu überprüfen, ob die verschiedenen Ionophor-Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin einen Einfluss auf den suizidalen Erythrozytentod (Eryptose) ausüben. Des Weiteren sollen die Mechanismen der Eryptose unter der Einwirkung dieser Ionophor-Antiinfektiva aufgeklärt werden.

Zu diesem Zweck wurden Erythrozyten verschiedener Spender für 48 h mit den jeweiligen Antiinfektiva unter verschiedenen Konzentrationen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Ein charakteristisches Merkmal der Eryptose ist die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche der Erythrozyten [162]. Auch die Zellschrumpfung und der Einstrom von Ca^{2+} sind kennzeichnend für den suizidalen Erythrozytentod [162]. So kann auch durch den Entzug von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Medium überprüft werden, ob der durch die Antiinfektiva induzierte suizidale Erythrozytentod calciumabhängig ist. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [163] und die Ceramidbildung [39] können ebenfalls eine Eryptose einleiten. N-Acetylcystein (NAC) hemmt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [164] und beeinflusst daher auch den suizidalen Erythrozytentod.

Um die Mechanismen der Eryptose, die möglicherweise durch die Ionophor-Antiinfektiva ausgelöst werden, zu untersuchen, wurden alle bisher genannten Parameter, nämlich Phosphatidylserinexposition, Zellschrumpfung, intrazellulärer Calciumgehalt,

EINLEITUNG

oxidativer Stress und Ceramidbildung bei allen drei verwendeten Ionophor-Antiinfektiva untersucht. Der Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) auf den oxidativen Stress wurde nur mit dem Antiinfektivum Salinomycin überprüft. Die Hämolyse ist eine andere Form des Zelltodes, die sich von der Eryptose unterscheidet, da es bei dieser zur Freisetzung von intrazellulärem Hämoglobin kommt [165]. Zusätzlich zur Eryptose wurde daher auch die hämolytische Wirkung der Ionophor-Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin auf Erythrozyten untersucht.

Da das Ionophor-Antibiotikum Nigericin die Permeabilität der Zellmembran für H^+ -Ionen erhöht [152], wurde zusätzlich der intrazelluläre pH in den Erythrozyten unter dem Einfluss von Nigericin gemessen. Da Cariporid ein selektiver Hemmer des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE1) in Zellmembranen ist [166] und somit auch den intrazellulären pH-Wert beeinflusst [167], wurde untersucht, ob die Eryptose unter Nigericin bei Anwesenheit von Cariporid beeinflusst wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Erythrozyten

Die für die Experimente verwendeten Erythrozyten stammten von gesunden Probanden und wurden dankenswerterweise von der Blutspendezentrale der Universität Tübingen als Vollblut zur Verfügung gestellt. Die experimentelle Studie und die Blutentnahmen aus gesunden Spendern wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen unter der Projektnummer 184/2003V überprüft und genehmigt. Um aus dem gespendeten Vollblut Erythrozyten zu isolieren, wurde 1 ml Vollblut zusammen mit 3 ml Ringer-Lösung in einem Zentrifugenröhrchen bei einer Temperatur von 21 °C mit 120 RCF (relative centrifugal force) für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, der Plasma und mononukleäre Zellen enthielt, verworfen. Die auf diese Weise isolierten Erythrozyten wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C für maximal zwei Tage gelagert. Der Hämatokrit betrug für alle Lösungen mit den jeweiligen Reagenzien 0,4 %. Sofern explizit keine anderen Werte angegeben sind, gelten für alle Experimente die oben genannten Werte und Einstellungen.

2.2 Ringer-Lösung

Kernhaltige Zellen sind wegen ihrer diversen Stoffwechselwege und hohen Stoffwechsellistung, wie zum Beispiel der Proteinsynthese, auf besondere Bedingungen und Nährmedien angewiesen. Im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen stellen Erythrozyten aufgrund des fehlenden Zellkerns und der fehlenden Organellen keine hohen Ansprüche an ihr Nährmedium, wie etwa Aminosäuren oder Wachstumsfaktoren. Erythrozyten sind auf ein Milieu angewiesen, welches ihnen einen Elektrolytenaustausch erlaubt [168] und zur Energiegewinnung Glucose enthält [168]. Da die Ringer-Lösung die gleichen Elektrolytkonzentrationen enthält, die auch im gesunden menschlichen Blutplasma zu finden sind (300 mOsmol), ist diese das ideale Nährmedium für die Erythrozyten.

MATERIAL UND METHODEN

Darüber hinaus weisen Erythrozyten in Ringer-Lösung eine erniedrigte Rate an spontaner Eryptose auf. Deshalb wurde die Ringer-Lösung bei allen durchgeführten Experimenten als Lösungsmittel und als Kontrolllösung verwendet. Zur Pufferung der Ringer-Lösung diente 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-1 (HEPES). Für alle Experimente lag ein physiologischer pH-Wert von 7,4 vor [169]. Tabelle 1 enthält eine genaue Zusammensetzung der für alle Experimente verwendeten Ringer-Lösung.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Ringer-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge für ca. 1 l [g]
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
CaCl ₂	1	0,111
Glucose	5	0,901
HEPES	32,2	7,674
NaOH	13,7	0,541
H ₂ O		982,798 ml

2.3 Annexin-Waschpuffer

Um die Phosphatidylserinexposition nach stattgefundenener Eryptose zu untersuchen, wurden die Erythrozyten mit einem Annexin-Waschpuffer, der Annexin-V-FITC oder Fluo-3-AM in einer Verdünnung von 1:200 enthielt, inkubiert. Die genaue Zusammensetzung des Puffers ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers

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

2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Analyseverfahren zur quantitativen Bestimmung von Zellen und Partikeln. Das Verfahren liefert Informationen über die Zellgröße, die Zellstruktur und über das Zellinnere. Es ist üblicherweise auch unter dem Begriff FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) bekannt. Der Begriff FACS ist ein eingetragenes Warenzeichen des Unternehmens Becton Dickinson (BD). Bei diesem Verfahren werden Zellen und Partikel beim Durchtritt durch eine sehr kleine Durchflusszelle hydrodynamisch so fokussiert, dass die Zellen oder Partikel einzeln von einem Halbleiterlaser bestrahlt werden. Durch die Streuung des Lichts in unterschiedliche Richtungen werden Signale detektiert, wodurch die Zellen auf verschiedene Eigenschaften hin separiert werden.

Der Photodetektor des Vorwärtsstreulichts (Forward-Scatter = FSC) steht annähernd (10°) zu der Achse des einfallenden Lichtstrahls und gibt im Wesentlichen Auskunft über die Größe einer Zelle. Das bedeutet, dass größere Zellen ein größeres Streulichtsignal als kleinere Zellen erzeugen. Der Photodetektor des Seitwärtsstreulichts (Side-Scatter = SSC) steht im rechten Winkel (90°) zum einfallenden Lichtstrahl, dessen Streulichtsignal neben der Größe einer Zelle auch von dessen Innenstruktur bzw. der „Granularität“ abhängig ist.

Des Weiteren ist es mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich, mit fluoreszierenden Substanzen Zellbestandteile zu markieren und zu bestimmen. Dazu wird das von den fluoreszierenden Substanzen nach Anregung durch den Laser emittierte Licht von Interferenzfiltern und entsprechenden Photodetektoren, die für unterschiedlich emittierte Wellenlängen empfindlich sind, analysiert. Diese unterschiedlichen Wellenlängen können von den entsprechenden Fluoreszenzkanälen (FL-1, 2, 3 und 4) aufgenommen und dargestellt werden. Der Fluoreszenzkanal FL-1 kann, wie im Falle von Annexin V-FITC, eine Emission von 530 nm aufnehmen und das Signal darstellen. Die Zahl der analysierbaren Parameter der zu untersuchenden Zelle steigt mit der Zahl der eingesetzten

Laser und fluoreszierenden Substanzen. In dieser Arbeit wurden alle Messungen mit einem FACS Calibur der Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA, welches mit vier verschiedenen Fluoreszenzkanälen (FL-1 bis FL-4) ausgestattet ist, durchgeführt. Zur Auswertung der Messdaten wurde ein Rechner der Firma Macintosh und das Programm Cell Quest Software verwendet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Für die zu untersuchenden Wirkstoffe Salinomycin, Nystatin und Nigericin wurden entsprechende Konzentrations-Stocks hergestellt. Zunächst wurden 1000 µl einer Ringer-Lösung in alle Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde die jeweilige Substanz in verschiedenen Konzentrationen hinzugesetzt. Zuletzt wurden in alle Reaktionsgefäße 4 µl der hergestellten Erythrozytenkonzentrate hinzugegeben, wodurch sich für alle Proben ein Hämatokrit von 0,4 % ergab. Alle Versuchsansätze wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Jede Versuchsreihe enthielt Erythrozytenkonzentrate von einer unterschiedlichen Anzahl an Probanden. Um auszuschließen, dass die Ringer-Lösung oder das Lösungsmittel DMSO selbst einen Einfluss auf das Messergebnis hatte, wurden jeweils Negativkontrollen, in denen nur Ringer-Lösung oder nur Ringer-Lösung mit DMSO enthalten war, erstellt. Wenn explizit kein anderes Lösungsmittel angegeben ist, war DMSO für alle Versuche das verwendete Lösungsmittel. Zudem wurde in alle DMSO-Negativkontrollen die höchste Konzentration der zu untersuchenden Substanz hinzugefügt. Die weitere Behandlung und Messung der Proben nach der Inkubation ist im jeweiligen Abschnitt beschrieben.

2.5 Annexin-V-Bindung und Forward Scatter (FSC)

Die Translokation von Phosphatidylserin (Phosphatidylserinexposition) vom inneren Blatt hin zum äußeren Blatt der erythrozytären Membran ist ein Kennzeichen der Eryptose [162]. Aufgrund seiner hohen Affinität zu anionischen Phospholipiden weist Annexin-V eine starke Bindung zu Phosphatidylserin auf [170] und eignet sich sehr gut zu dessen Bestimmung. Annexin-V weist selbst keine Fluoreszenzeigenschaft auf, weshalb die Substanz mit FITC (Fluorescein-isothiocyanat) konjugiert ist. Erst durch diese Konjugation ist eine durchflusszytometrische Detektion des Phosphatidylserins

MATERIAL UND METHODEN

möglich. Für die Versuche wurde das Annexin-V-FITC (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 in Annexin-Waschpuffer eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob die Ionophor-Antiinfektiva in der Lage sind eine Eryptose auszulösen, wurde ihr Effekt auf die Phosphatidylserinexposition hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Erythrozyten für 48 h bei 37 °C mit den jeweiligen Antiinfektiva in Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert. Nach der Inkubation wurden aus jeder Probe 150 µl Zellsuspension in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Danach wurde die 96-well Mikrotiterplatte bei 1600 rpm (revolutions per minute) und bei Raumtemperatur (21 °C) für 3 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet unter Lichtausschluss mit dem vorbereiteten Annexin-Waschpuffer resuspendiert. Zur Markierung des Phosphatidylserins wurde ein Annexin-Waschpuffer, welcher 1:200 verdünntes Annexin-V-FITC enthielt, verwendet. Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden im Anschluss in FACS-Röhrchen übertragen und für 20 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Intensität der Annexin-V-Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal FL-1 mittels einer Erregungswellenlänge von 488 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 530 nm am FACS Calibur gemessen.

Parallel dazu wurde die Zellgröße anhand des Forward Scatters (FSC) mitbestimmt. Das FSC kann im Gegensatz zum Phosphatidylserin ohne Färbung bzw. fluoreszierenden Antikörper gemessen werden. Für die Bestimmung des FSC wurde ein Dotplot FSC versus Side Scatter (SSC) erstellt. Die Messungen für beide Parameter wurden auf einer linearen Skala durchgeführt. Anschließend wurde für jede Probe das geometrische Mittel analysiert. Die Bestimmung des FSC gibt Auskunft über die Größe einer Zelle. Hierdurch kann festgestellt werden, ob eine Schrumpfung der Zelle stattgefunden hat, was ein weiteres Merkmal der Eryptose darstellt [49].

2.6 Fluo-3-Fluoreszenz

Eine Zellschrumpfung der Erythrozyten, was ein Merkmal der Eryptose darstellt, ist eine Folge des Einstroms von Ca^{2+} durch nicht-selektive Kationenkanäle [43]. Der Einstrom

MATERIAL UND METHODEN

von Ca^{2+} führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch diese Zunahme werden calciumsensitive Kaliumkanäle aktiviert, die zu einem Kaliumausstrom und zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen. Aufgrund des hierdurch erzeugten elektrischen Gradienten kommt es zu einem Ausstrom von Cl^- , das zusammen mit einem Kaliumausstrom das Wasser aus der Zelle treibt und zur Schrumpfung dieser führt [49].

Um die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h bei 37 °C mit den jeweiligen Antiinfektiva zu bestimmen, wurden 150 μl der Zellsuspension in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und für 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Proben mit dem vorbereiteten Annexin-Waschpuffer resuspendiert. Der vorbereitete Annexin-Waschpuffer enthielt zur Markierung des intrazellulären Ca^{2+} Fluo-3-AM in einer Verdünnung von 1:200. Fluo-3-AM (Biotium, Hayward, USA) ist eine calciumbindende und fluoreszierende Substanz. Aufgrund seiner Ester-Eigenschaft kann Fluo-3-AM problemlos die Zellmembran passieren. Mit Hilfe von unspezifischen intrazellulären Esterasen wird Fluo-3-AM in seine freie Form Fluo-3 gespalten [171]. Nur in der gespaltenen Form kann Fluo-3-AM an intrazelluläres Ca^{2+} binden, verliert aber zugleich auch seine Membranpermeabilität und kann somit die Zelle nicht mehr verlassen [171]. Deshalb eignet sich Fluo-3-AM hervorragend zur intrazellulären Calciumbestimmung [172].

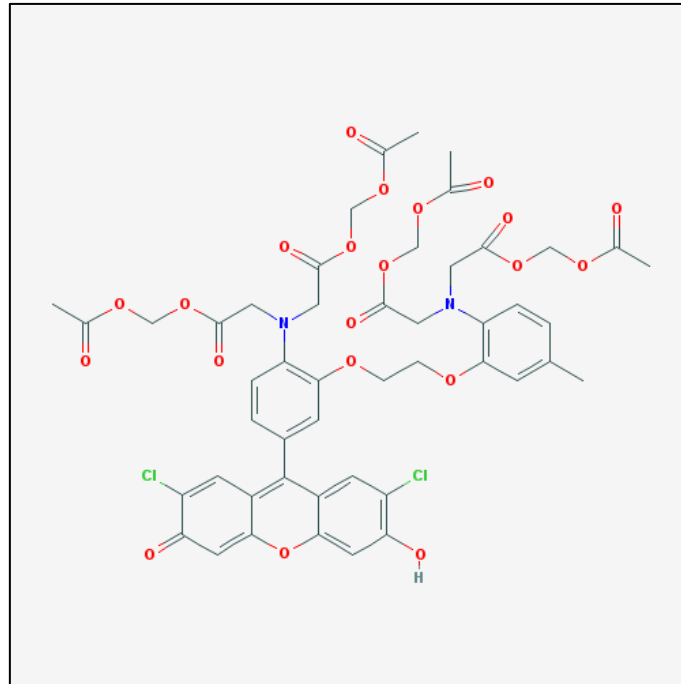


Abbildung 6: Strukturformel von Fluo-3-AM [173]

Um den intrazellulären Calciumgehalt zu bestimmen, wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt, die anschließend unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert wurden. Daraufhin wurde die Intensität der calciumabhängigen Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal FL-1 mittels einer Erregungswellenlänge von 488 nm, sowie einer Emissionswellenlänge von 530 nm am FACS Calibur gemessen. Anschließend wurde das geometrische Mittel der calciumabhängigen Fluo-3-Fluoreszenz für jede Probe analysiert.

2.7 Calciumfreie Ringer-Lösung

Um zu überprüfen, ob die durch die Antiinfektiva ausgelöste Eryptose vom Einstrom extrazellulären Calciums abhängig ist, wurde der Effekt der Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin auf die Eryptose in einer calciumfreien Ringer-Lösung (Tabelle 3) untersucht.

Tabelle 3: Zusammensetzung der calciumfreien Ringer-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge für ca. 1 l [g]
NaCl	125	7,305
KCl	5	0,373
MgSO ₄	1	0,296
EGTA	1	0,190
Glucose	5	0,901
HEPES	32,2	7,674
NaOH	13,7	0,541
H ₂ O		982,798

Bei dieser Messung wurden die Proben mit jeweils der höchsten Konzentration des zu untersuchenden Antiinfektivums sowohl in Ringer-Lösung als auch in calciumfreier Ringer-Lösung für 48 h inkubiert. Danach wurde die Phosphatidylserinexposition mit Hilfe der Annexin-V-Bindung und das FSC bestimmt.

2.8 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Um der Frage nachzugehen, ob oxidativer Stress bei der durch die Antiinfektiva ausgelösten Eryptose eine Rolle spielt, wurden die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Erythrozyten bestimmt, da bekannt ist, dass oxidativer Stress eine Eryptose auslöst [163]. Dafür wurden die ROS mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetat (DCFDA) quantitativ bestimmt. DCFDA (Sigma, Schnellendorf, Deutschland) kann wegen seiner Acetylierung problemlos durch die Zellmembran hindurch diffundieren. In der Zelle wird DCFDA von intrazellulären Esterasen zu einer nicht-fluoreszierenden Verbindung deacetyliert. Durch die Oxidation der deacetylierten Verbindung durch ROS entsteht das 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF). DCF ist seinerseits eine sehr stark fluoreszierende Verbindung und kann anhand der Durchflusszytometrie analysiert werden [174].

Für die Bestimmung der ROS wurden die Proben zunächst für 48 h bei 37 °C mit den jeweiligen Antiinfektiva inkubiert. Nach der Inkubation wurden 150 µl der Zellsuspension in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und für 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Endkonzentration von 10 µM DCFDA bei 37 °C für 30 Minuten gefärbt. Die Erythrozyten wurden anschließend drei Mal mit 150 µl Ringer-Lösung gewaschen und in 200 µl Ringer-Lösung resuspendiert. Die ROS-abhängige Fluoreszenzintensität wurde anschließend im Fluoreszenzkanal FL-1 mittels einer Erregungswellenlänge von 488 nm, sowie einer Emissionswellenlänge von 530 nm am FACS Calibur gemessen. Anschließend wurde für jede Probe das geometrische Mittel der DCFDA-abhängigen Fluoreszenz analysiert.

2.9 Hämolyse

Bei der Hämolyse wurde überprüft, inwiefern die Ionophor-Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin neben einer Erythrozytose auch zu einer Hämolyse der Erythrozyten führen. Für die Bestimmung der Hämolyse wurden die Proben für 48 h bei 37 °C in Ringer-Lösung inkubiert. Gleichzeitig erfolgte für denselben Zeitraum eine Inkubation der Erythrozyten in H₂O dest. (100 % Hämolyse). Nach 48 stündiger Inkubation wurden die Proben für 3 Minuten bei 1600 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl Überstand der jeweiligen Probe in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Um die Hämolyse in den Proben mit den Referenzwerten zu vergleichen, wurde eine Standardkurve mit 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 % Hämolyse erstellt. Auch hierfür wurden wiederum 100 µl Überstand der jeweiligen Probe in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Um die Hämolyse in den Proben zu bestimmen, wurde die Hämoglobinkonzentration im Überstand photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

2.10 Ceramid

Neben einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration ist die Anreicherung von Ceramid auf der Zelloberfläche der Erythrozyten ein weiterer Mechanismus zur Auslösung einer Erythrozytose [39]. Ceramid ist eine Untergruppe der Lipide und gehört zu

MATERIAL UND METHODEN

den Sphingolipiden [175]. Es besteht aus einem Sphingosinmolekül, welches durch eine Amidbindung an eine Fettsäure gebunden ist [176]. Die Ceramid-Anreicherung wurde mittels eines monoklonalen Antikörper-Assays bestimmt.

Der Anti-Ceramid-Antikörper (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland), ein von der Maus stammender monoklonaler Antikörper, der im Verhältnis 1:10 in PBS (Phosphate Buffered Saline) + 0,1% Rinderalbumin (Bovine Serum Albumin = BSA) verdünnt wurde, bindet an die Oberfläche des Ceramids. Um den monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörper in der Durchflusszytometrie nachzuweisen, wurde ein spezifischer polyklonaler FITC (fluorescein-isothiocyanate)-konjugierter, von der Ziege stammender, Anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) verwendet. PBS ist eine nicht zytotoxische und isotonische Lösung und eignete sich aufgrund dieser Eigenschaften für die Versuche (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung der PBS-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]	Menge für ca. 1 l [g]
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,2
Na₂HPO₄ • 2 H₂O	8,1	1,44
KH₂PO₄	1,76	0,24

Um zu überprüfen, ob die Bildung von Ceramid eine Rolle bei der Ionophor-Antiinfektiva-induzierten Eryptose spielt, wurde der Einfluss von Salinomycin, Nystatin und Nigericin auf die Anreicherung von Ceramid auf der Oberfläche der Erythrozyten hin untersucht. Hierfür wurden die Proben für 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl Zellsuspension aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und für 3 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Proben in einer vorbereiteten PBS-Lösung resuspendiert. Die vorbereitete PBS-Lösung enthielt 0,05 % Rinderalbumin (BSA) und den 1:10 verdünnten Anti-Ceramid-Antikörper. Die auf diese Weise angefärbten Zellen wurden für 1 h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen

einmal mit 100 μ l PBS-BSA-Lösung gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen in PBS-BSA-Lösung mit einem spezifischen polyklonalen Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-konjugierten, von der Ziege stammenden, Anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper (1:50) angefärbt. Die angefärbten Zellen wurden für weitere 30 Minuten inkubiert und wie oben beschrieben mit der PBS-BSA-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS-BSA-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die FITC-abhängige Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal FL-1 mittels einer Erregungswellenlänge von 488 nm, sowie einer Emissionswellenlänge von 530 nm am FACS Calibur gemessen. Anschließend wurde für jede Probe das geometrische Mittel der Ceramid-abhängigen Fluoreszenz analysiert.

2.11 Intrazellulärer pH (pH_i)

Um zu untersuchen, inwiefern Nigericin den intrazellulären pH der Erythrozyten beeinflusst, wurde dieser mit BCECF-AM (2'-7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein)-(acetoxymethyl ester) (Life Technologies, Carlsbad, USA) gemessen. Aufgrund seiner Ester-Eigenschaft kann BCECF-AM leicht Zellmembranen überwinden [177]. Die Esterverbindung des BCECF-AM wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen abgebaut, wodurch BCECF entsteht [177]. BCECF selbst weist fluoreszierende Eigenschaften auf und kann die Zellmembran aufgrund einer Ladungsänderung nicht mehr verlassen. Hierdurch reichert sich BCECF intrazellulär an [178-180]. Ferner weist BCECF einen pKa-Wert von etwa 7,0 auf [181, 182]. Dies entspricht etwa dem physiologischen pH-Bereich des Intrazellularraumes (6,8 -7,4) [177]. Aufgrund dieser Vorteile eignet sich BCECF hervorragend für die Bestimmung des pH_i [178]. BCECF ist bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm sensibel für Änderungen des pH_i [177].

Für die Bestimmung des pH_i wurden unbehandelte und mit Nigericin behandelte Erythrozyten in Ringer-Lösung gewaschen und nach Hinzufügen von 5 μ M BCECF-AM für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um den intrazellulären pH-Wert zu kalibrieren wurde eine Standardkurve angelegt. Hierfür wurden die unbehandelten, gefärbten Erythrozyten in eine stark kaliumhaltige Lösung, bestehend aus 105 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1,2 mM

MgSO₄, 32,2 mM HEPES und 10 mM Mannitol, in einem pH-Bereich von 6,8 – 8,0 in 0,2 pH-Schritteinheiten resuspendiert. Fünf Minuten vor den durchflusszytometrischen Messungen wurden 10 mM Nigericin hinzugefügt. Mittels FACS wurde die Fluoreszenz in FL-1 (530/30) und in FL-2 (585/42) bei 488 nm detektiert. Das Verhältnis von FL-1 und FL-2 wurde aus dem geometrischem Mittelwert jedes einzelnen Kanals, mit 50,000 Erythrozyten in jeder Behandlungsgruppe, berechnet [178].

2.12 Cariporid

Cariporid (Tocris Bioscience, Bristol, UK) ist ein selektiver Hemmer des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE1) in der Zellmembran. Die Hauptwirkung des Na⁺/H⁺-Austauschers ist die Regulierung des intrazellulären pH-Wertes [183].

2.13 Statistik

Für die Darstellung der gemessenen Daten wurde das arithmetische Mittel ± Standardfehler (SEM) gewählt. Sowohl der ANOVA-Test (Analysis of variance) als auch der Tukey's-Test wurden je nach Indikation als Test im Anschluss an die Experimente verwendet. Die Anzahl der Patienten entspricht den verwendeten Erythrozytenkonzentraten und wird mit n angegeben. Da jede Erythrozytenprobe unterschiedlich auf die Experimente reagiert, wurden für jeden Versuch die gleichen Erythrozyten, sowohl für die Kontrollen als auch für das eigentliche Experiment, verwendet. Hierbei wurden nur p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Salinomycin auf die Eryptose

3.1.1 Erythrozytäre Phosphatidylserinexposition (Annexin-V-Bindung)

Um zu überprüfen, ob das Ionophor-Antibiotikum Salinomycin eine Eryptose auslöst, wurde der Einfluss dieser Substanz auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten in unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 100 nM) getestet. Nach 48 stündiger Inkubation der Proben zeigte sich prozentuell bereits bei 5 nM Salinomycin ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Annexin-V-bindenden Zellen. Dieser Anstieg nahm bis zu einer Konzentration von 50 nM stetig zu, erfuhr allerdings bei einer höheren Dosierung (100 nM) keinen weiteren Anstieg mehr (Abb. 7 A & B).

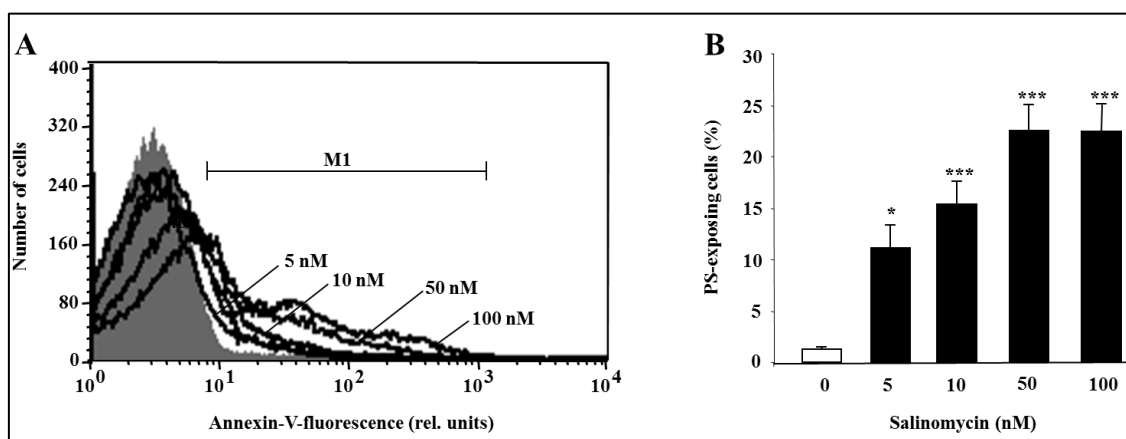


Abbildung 7: Effekt von Salinomycin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linien) Effekt von 5, 10, 50 und 100 nM Salinomycin. M1 zeigt den Bereich der Annexin-V-positiven Zellen (%) an.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=12$) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 5, 10, 50 und 100 nM Salinomycin. * ($p < 0,05$) und *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Salinomycin (weißer Balken) (ANOVA) [184].

ERGEBNISSE

3.1.2 Erythrozytäre Zellgröße (Forward Scatter (FSC))

Da die Zellschrumpfung ein weiteres Merkmal der Eryptose darstellt, wurde untersucht, ob der Einfluss von Salinomycin in unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 100 nM) zu einer Veränderung der Zellgröße führt. Nach 48 stündiger Inkubation mit Salinomycin zeigte sich eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Zellgröße bei 5 und 10 nM. Bei 5 nM war die stärkste Zellvolumenabnahme (Schrumpfung) der Erythrozyten zu beobachten. Bei den Salinomycin-Konzentrationen 50 und 100 nM konnte allerdings keine Veränderung der Zellgröße im Vergleich zur Ringer-Kontrolle beobachtet werden (Abb. 8 A & B).

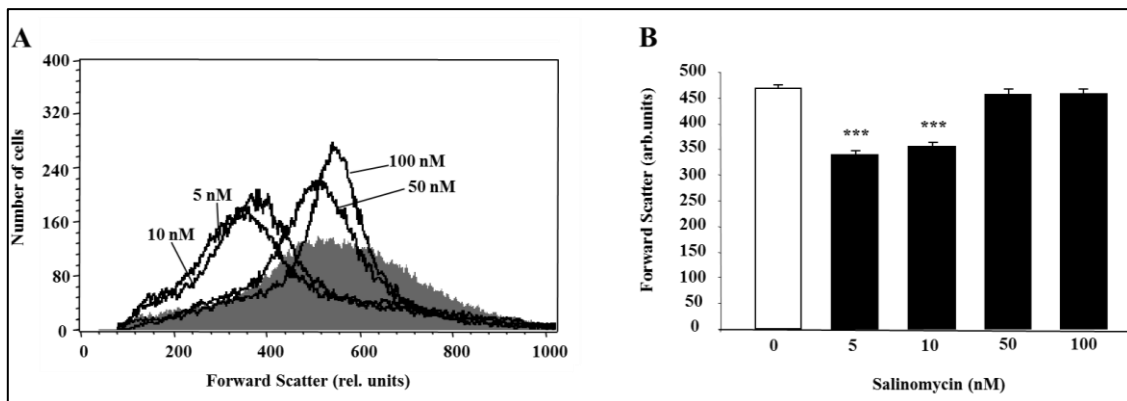


Abbildung 8: Effekt von Salinomycin auf das erythrozytäre Forward Scatter (FSC)

A: Original-Histogramm des Forward Scatters der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linien) Effekt von 5, 10, 50 und 100 nM Salinomycin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=12$) des erythrozytären Forward Scatters nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 5, 10, 50 und 100 nM Salinomycin. *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Salinomycin (weißer Balken) (ANOVA) [184].

3.1.3 Intrazelluläre Calciumkonzentration (Fluo-3-Fluoreszenz)

Um festzustellen, ob die Schrumpfung der Erythrozyten durch Salinomycin auf eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zurückzuführen ist, wurden die Erythrozyten für 48 h inkubiert und anschließend mit Fluo-3-AM markiert. Fluo-3 (siehe Kapitel 3.3.2) bindet nur an intrazelluläres Ca^{2+} und kann dank seiner Fluoreszenzeigenschaft mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

ERGEBNISSE

Die Messergebnisse zeigten bereits bei 10 nM Salinomycin eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der Fluo-3-Fluoreszenz. Diese erreichte bei 50 nM Salinomycin ihren höchsten Wert. Ab höheren Salinomycin-Konzentrationen (100 nM) war jedoch kein weiterer Anstieg mehr zu verzeichnen (Abb. 9 A & B).

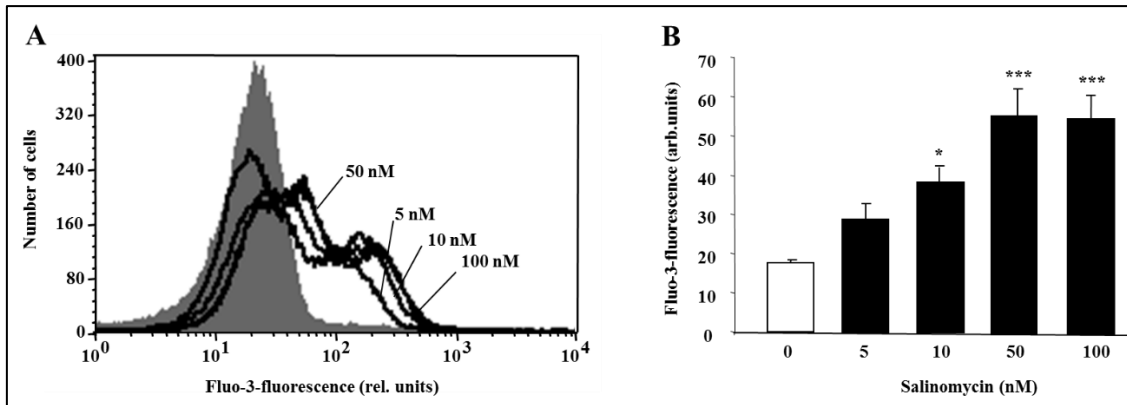


Abbildung 9 Effekt von Salinomycin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linien) Effekt von 5, 10, 50 und 100 nM Salinomycin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=12$) der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 5, 10, 50 und 100 nM Salinomycin. * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Salinomycin (weißer Balken) (ANOVA) [184].

3.1.4 Calciumfreie Ringer-Lösung

Um zu überprüfen, ob eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration an der Salinomycin-induzierten Eryptose beteiligt ist, wurden die Proben mit der höchsten Salinomycin-Konzentration (100 nM) sowohl in Ringer-Lösung als auch in calciumfreier Ringer-Lösung für 48 h inkubiert. Danach wurde die Phosphatidylserinexposition bestimmt. Die Salinomycin-induzierte Annexin-V-Bindung nahm in calciumfreier Ringer-Lösung im Vergleich zur calciumhaltigen Ringer-Lösung signifikant ab (Abb. 10). Dennoch konnte eine signifikante Zunahme der Annexin-V-bindenden Erythrozyten durch Salinomycin auch ohne Calciumeinfluss beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass noch andere Mechanismen außer einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration an der Salinomycin-induzierten Eryptose beteiligt sind.

ERGEBNISSE

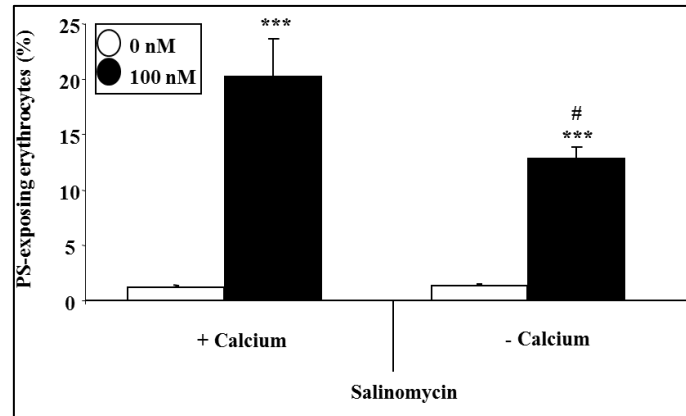


Abbildung 10: Effekt des Calciumentzugs auf die Salinomycin-induzierte Annexin-V-Bindung in Erythrozyten

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=5) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 100 nM Salinomycin. Linke Balken: Effekt von Salinomycin auf die Phosphatidylserinexposition mit Ca^{2+} ; Rechte Balken: Einfluss von Salinomycin auf die Phosphatidylserinexposition ohne Ca^{2+} . *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten ohne Salinomycin (ANOVA); # (p<0,05) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten in der Anwesenheit von Ca^{2+} (ANOVA) [184].

3.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Da oxidativer Stress auch eine Eryptose auslösen kann, wurde getestet, ob es nach 48 stündiger Inkubation der Erythrozyten mit Salinomycin zu einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies bzw. der DCFDA-abhängigen Fluoreszenz kommt. Nach Inkubation der Erythrozyten mit 100 nM Salinomycin konnte ein signifikanter Anstieg der DCFDA-positiven Zellen verzeichnet werden (Abb. 11 A & B). Um zu überprüfen, ob der oxidative Stress bzw. die Annexin-V-Bindung unter dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) abgeschwächt wird, wurden die Proben mit und ohne Anwesenheit von NAC untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine NAC Konzentration von 1 mM die Wirkung von 100 nM Salinomycin auf die Phosphatidylserinexposition signifikant herabsetzte (Abb. 11 C). Folglich beruht eine Teilwirkung von Salinomycin auf dessen Fähigkeit den oxidativen Stress in Erythrozyten zu erhöhen.

ERGEBNISSE

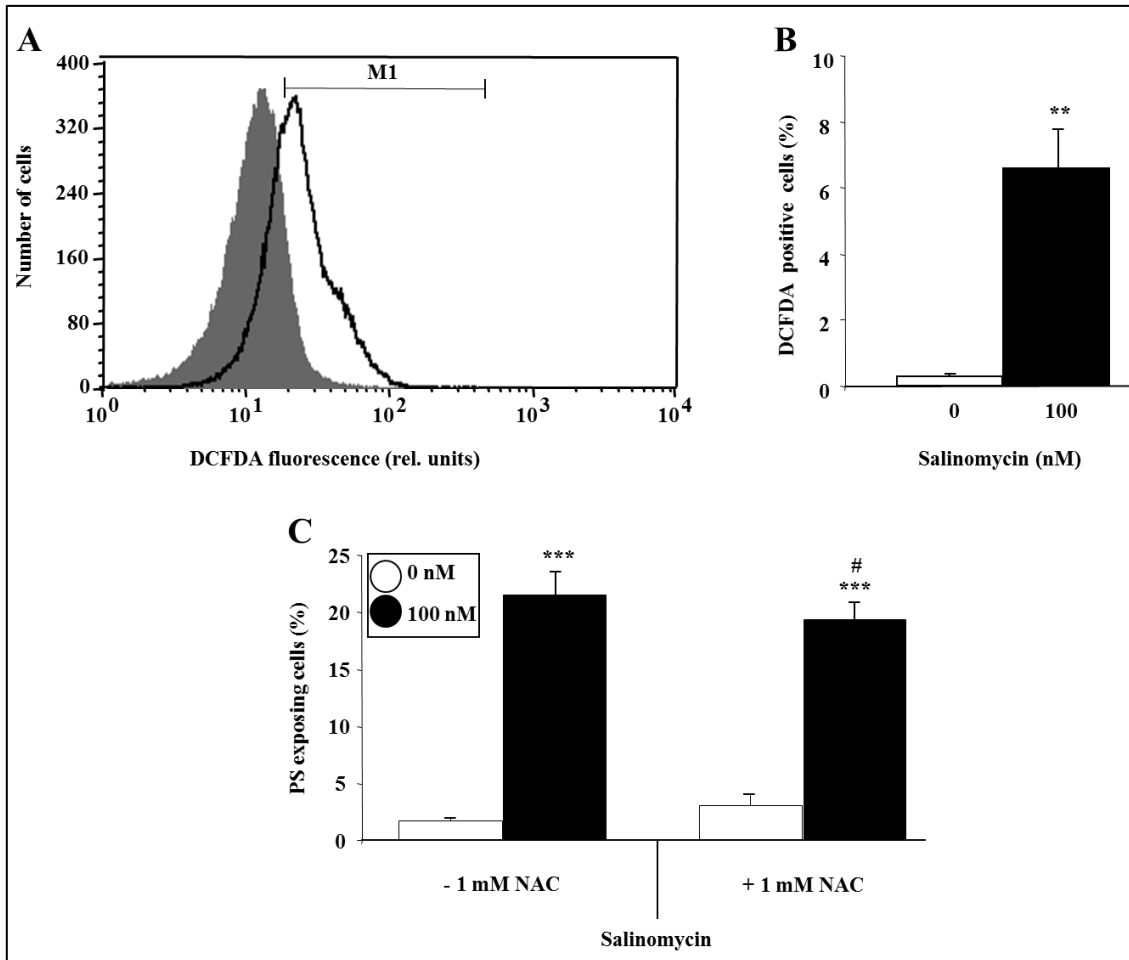


Abbildung 11: Salinomycin-induzierter oxidativer Stress in Erythrozyten

A: Original-Histogramm der DCFDA-positiven Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) 100 nM Salinomycin. M1 zeigt den Bereich der DCFDA-positiven Zellen (%) an.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=8) aus dem Prozentsatz der DCFDA-positiven Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) Effekt von 100 nM Salinomycin. ** (p<0,01) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Salinomycin (unpaired t-test) [184].

C: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=6) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-bindenden Erythrozyten nach Behandlung für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 100 nM Salinomycin. Linke Balken: Behandlung der Proben mit Salinomycin ohne N-Acetylcystein (NAC); Rechte Balken: Behandlung der Proben mit Salinomycin und 1 mM NAC. *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ringer-Kontrolle ohne Salinomycin (ANOVA); # (p<0,05) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten bei Abwesenheit von 1 mM NAC (ANOVA).

ERGEBNISSE

3.1.6 Hämolyse

Neben der Eryptose wurde ebenfalls untersucht, ob durch die Exposition der Erythrozyten mit Salinomycin (5-100 nM) für 48 h auch eine Hämolyse ausgelöst wird. Für die jeweiligen Salinomycin-Konzentrationen wurden jeweils verschiedene Spender ($n = 5$) verwendet. Der Mittelwert der Prozentsätze für die jeweiligen Salinomycin-Konzentrationen (5-100 nM) betragen: $0,01 \pm 0,01$ % (Ringer-Kontrolle); $0,02 \pm 0,01$ % (5 nM); $0,02 \pm 0,01$ % (10 nM); $0,06 \pm 0,01$ % (50 nM) und $0,02 \pm 0,01$ % (100 nM) [184]. Insgesamt war die Hämolyse unter den verschiedenen Salinomycin-Konzentrationen also prozentuell sehr niedrig.

3.1.7 Ceramid

Da Ceramid ein weiterer Mechanismus ist, um eine Eryptose auszulösen, wurde die Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach 48 stündiger Inkubation untersucht. Nach einer Behandlung der Erythrozyten mit 100 nM Salinomycin zeigte sich ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Ceramid-Anreicherung (Abb. 12 A & B). Somit ist eine Ceramidbildung am Entstehen der durch Salinomycin-induzierten Eryptose beteiligt.

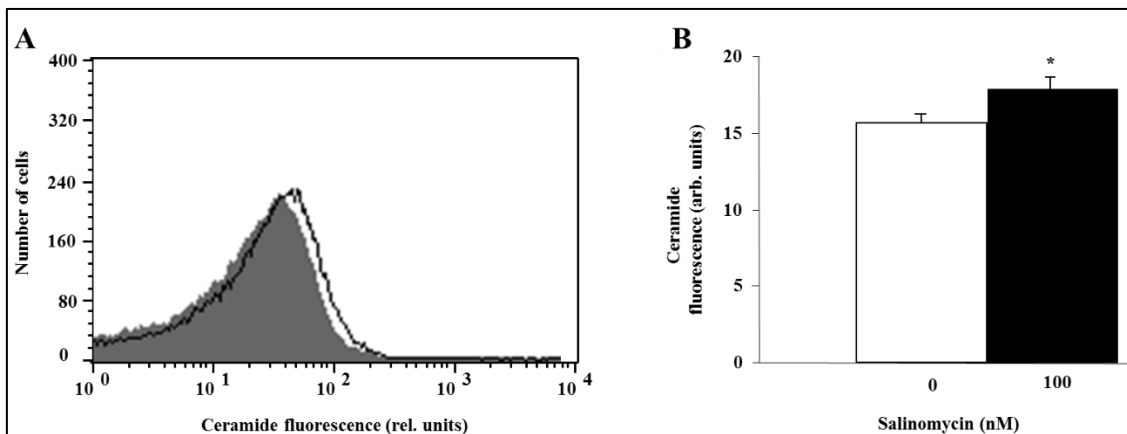


Abbildung 12: Effekt von Salinomycin auf die Ceramidbildung in Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) 100 nM Salinomycin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=5$) der Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) Effekt von 100 nM Salinomycin * ($p < 0,05$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Salinomycin (unpaired t-test) [184].

3.2 Einfluss von Nystatin auf die Eryptose

3.2.1 Erythrozytäre Phosphatidylserinexposition (Annexin-V-Bindung)

Um zu überprüfen, ob Erythrozyten nach Behandlung mit dem Ionophor-Antimykotikum Nystatin in einen suizidalen Erythrozytentod übergehen, wurde diese Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 15 µg/ml) mit Erythrozyten für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten untersucht. Nach 48 stündiger Inkubation der Proben mit Nystatin zeigte sich ein prozentualer Anstieg der Annexin-V-bindenden Erythrozyten, der bereits bei einer Konzentration von 10 µg/ml eine statistische Signifikanz erreichte ($p < 0,01$). Bei einer Konzentration von 15 µg/ml Nystatin stieg die Annexin-V-Bindung weiter an und erreichte die höchste statistische Signifikanz ($p < 0,001$) (Abb. 13 B).

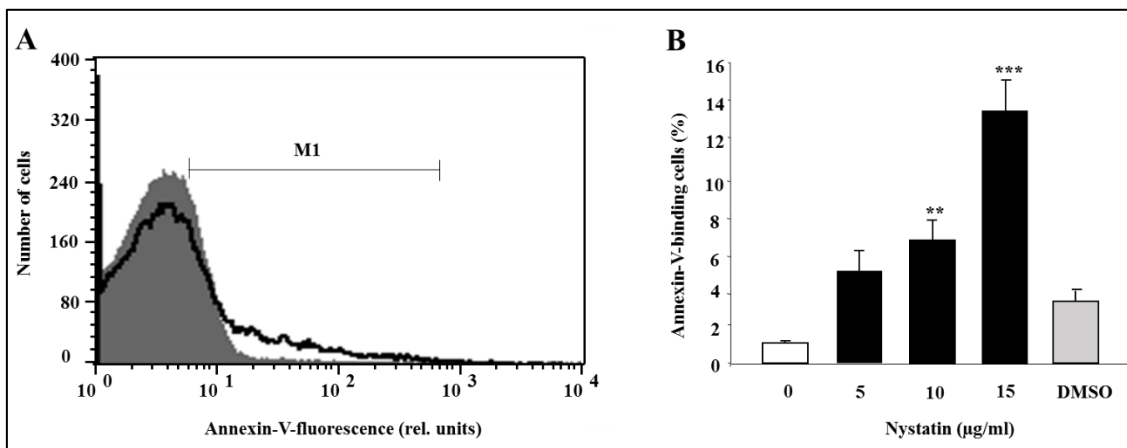


Abbildung 13: Effekt von Nystatin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) Effekt von 15 µg/ml Nystatin. M1 zeigt den Bereich der Annexin-V-positiven Zellen (%) an.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=12) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 5, 10, 15 µg/ml Nystatin. Als Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO auf die Erythrozyten gezeigt (grauer Balken). ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Nystatin (weißer Balken) (ANOVA) [185].

ERGEBNISSE

3.2.2 Erythrozytäre Zellgröße (Forward Scatter (FSC))

Da der suizidale Erythrozytentod oft mit einer Zellschrumpfung einhergeht, wurde der Effekt von Nystatin in unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 15 µg/ml) auf eine Veränderung der Zellgröße der Erythrozyten hin untersucht. Nach 48 stündiger Inkubation der Proben mit Nystatin zeigte sich bereits bei einer Nystatin-Konzentration von 5 µg/ml ($p < 0,001$) eine statistisch signifikante Abnahme der Zellgröße der Erythrozyten, welche mit steigender Nystatin-Konzentration weiterhin abnahm (Abb. 14 B).

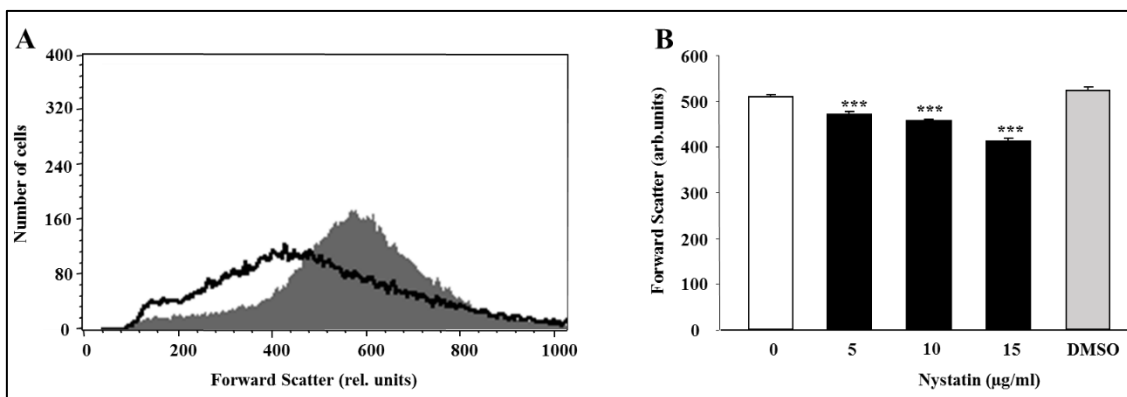


Abbildung 14: Effekt von Nystatin auf das erythrozytäre Forward Scatter (FSC)

A: Original-Histogramm des erythrozytären Forward Scatters (FSC) nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) Effekt von 15 µg/ml Nystatin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=12$) des erythrozytären Forward Scatters nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 5, 10, und 15 µg/ml Nystatin. Als Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO auf die Erythrozyten gezeigt (grauer Balken). *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Nystatin (weißer Balken) (ANOVA) [185].

3.2.3 Intrazelluläre Calciumkonzentration (Fluo-3-Fluoreszenz)

Um zu testen, ob der Nystatin-induzierte suizidale Erythrozytentod mit einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration einhergeht, wurde überprüft, ob die Behandlung der Erythrozyten mit unterschiedlichen Nystatin-Konzentrationen (5 - 15 µg/ml) zu einer Erhöhung der Fluo-3-Fluoreszenz führt. Um dies zu untersuchen, wurden die Erythrozyten für 48 h inkubiert und mit Fluo-3-AM markiert. Anschließend wurde die Fluo-3-Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert.

ERGEBNISSE

Nach 48 stündiger Inkubation der Proben mit Nystatin zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der Fluo-3-Fluoreszenz erst bei einer Nystatin-Konzentration von 15 µg/ml ($p < 0,001$) (Abb. 15 A & B).

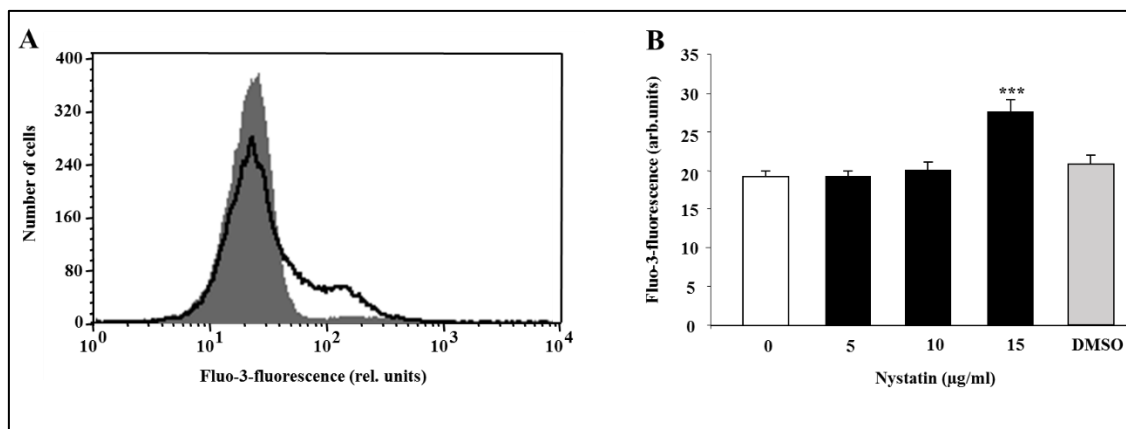


Abbildung 15: Effekt von Nystatin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) Effekt von 15 µg/ml Nystatin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=12$) der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 5, 10, und 15 µg/ml Nystatin. Als Vergleich ist der Effekt des Lösungsmittels DMSO auf die Erythrozyten gezeigt (grauer Balken). *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Nystatin (weißer Balken) (ANOVA) [185].

3.2.4 Calciumfreie Ringer-Lösung

In einer weiteren Sequenz von Experimenten wurde untersucht, ob der Nystatin-induzierte suizidale Erythrozytentod von einem extrazellulären Calciumeinstrom abhängig ist. Aus diesem Grund wurden die Erythrozyten für 48 Stunden in einer calciumhaltigen und einer calciumfreien Ringer-Lösung mit einer Nystatin-Konzentration von 15 µg/ml inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Phosphatidylserinexposition mittels Annexin-V-Bindung bestimmt. Wie in der Abbildung 16 zu erkennen ist, ging der Nystatin-induzierte Effekt auf die Phosphatidylserinexposition in der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} signifikant zurück. Folglich ist ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration teilweise für die durch Nystatin ausgelöste Eryptose verantwortlich.

ERGEBNISSE

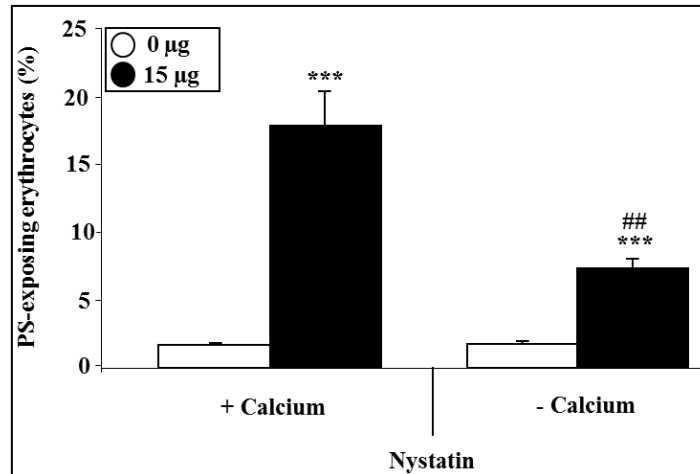


Abbildung 16: Effekt des Calciumentzugs auf die Nystatin-induzierte Annexin-V-Bindung in Erythrozyten

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=9) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 15 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin. Linke Balken: Effekt von Nystatin auf die Annexin-V-Bindung mit Ca^{2+} ; Rechte Balken: Effekt von Nystatin auf die Phosphatidylserinexposition ohne Ca^{2+} . *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten ohne Nystatin (ANOVA); ## ($p < 0,01$) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten in der Anwesenheit von Ca^{2+} (ANOVA) [185].

3.2.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Um eine mögliche Beteiligung von oxidativem Stress am Nystatin-induzierten Zelltod zu überprüfen, wurden die Erythrozyten für 48 h mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin inkubiert. Anschließend wurde ROS mit Hilfe der DCFDA-Fluoreszenz gemessen. Eine Inkubation der Erythrozyten für 48 h mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin ($22,47 \pm 3,49$ arb. units, n=5) zeigte im Vergleich zur Ringer-Kontrolle ohne Nystatin ($19,61 \pm 2,72$ arb. units, n=5) eine geringere, jedoch nicht signifikant niedrigere DCFDA-abhängige Fluoreszenz (Abb. 17 A & B). Dies legt die Vermutung nahe, dass Nystatin möglicherweise selbst antioxidative Eigenschaften aufweist [186].

ERGEBNISSE

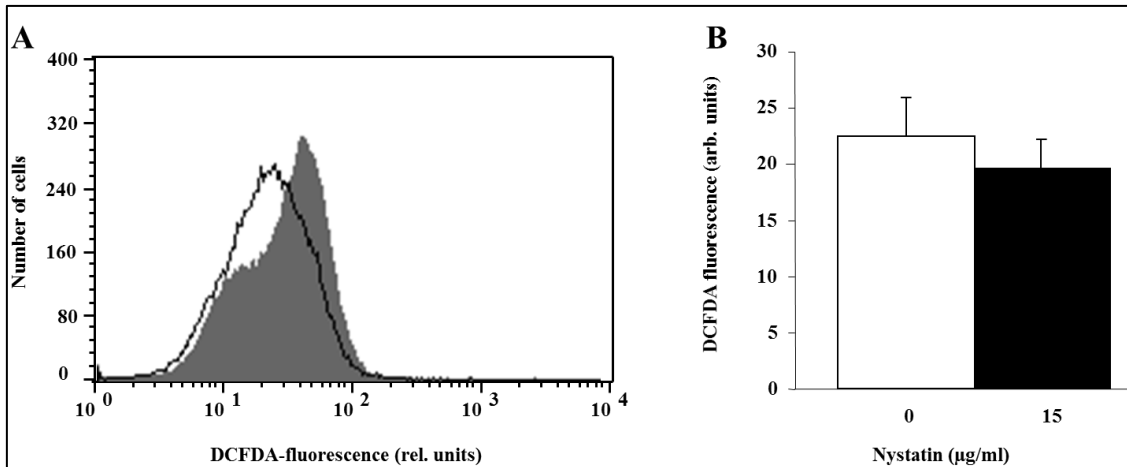


Abbildung 17: Effekt von Nystatin auf die erythrozytäre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

A: Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz in Erythrozyten nach Exposition für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) 15 µg/ml Nystatin.

B: Arithmetisches Mittel ± SEM (n=5) der DCFDA-Fluoreszenz in Erythrozyten nach 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) 15 µg/ml Nystatin.

3.2.6 Hämolyse

Um den Einfluss von Nystatin auf die Hämolyse der Erythrozyten zu bestimmen, wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt. Es wurden für die Nystatin-Konzentrationen 5 - 15 µg/ml jeweils verschiedene Spender (n = 5) verwendet. Für die jeweiligen Nystatin-Konzentrationen wurden folgende prozentuale Mittelwerte für die Hämolyse ermittelt: $1,2 \pm 0,3$ % (Ringer-Kontrolle); $2,8 \pm 0,5$ % (5 µg/ml); $8,5 \pm 4,7$ % (10 µg/ml) und $9,3 \pm 3,1$ % (15 µg/ml). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

3.2.7 Ceramid

Ceramid ist ein weiterer Mechanismus, der die Erythrozyten zum einen für die Effekte einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration sensibilisiert und zum anderen auch unabhängig von Ca^{2+} eine Eryptose auslösen kann. Um zu testen, ob Ceramid an der durch Nystatin-induzierten Eryptose beteiligt ist, wurde die Ceramidbildung mit Hilfe von Ceramid bindenden Antikörpern nach 48 h gemessen. Nach 48 stündiger Behandlung der Erythrozyten mit 15 µg/ml Nystatin ($12,0 \pm 0,8$ arb. units, n=5) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Ceramid-Anreicherung im Vergleich zur Ringer-Kontrolle

ERGEBNISSE

($12,2 \pm 0,5$ arb. units, $n = 5$) (Abb. 18 A & B). Somit ist eine Beteiligung von Ceramid am Nystatin-induzierten Zellmembran-Scrambling sehr unwahrscheinlich.

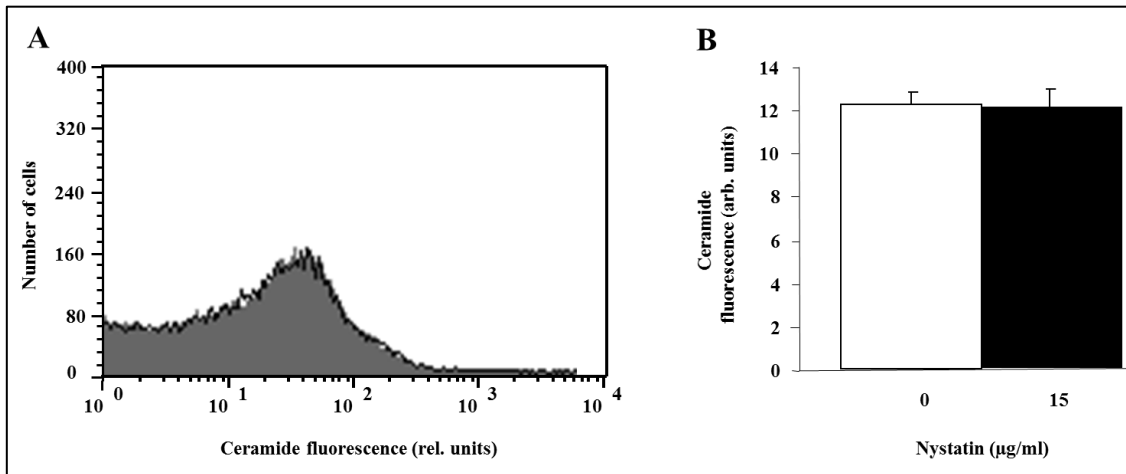


Abbildung 18: Effekt von Nystatin auf die Ceramidbildung in Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) 15 µg/ml Nystatin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM ($n=5$) der Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) Effekt von 15 µg/ml Nystatin.

3.3 Einfluss von Nigericin auf die Eryptose

3.3.1 Erythrozytäre Phosphatidylserinexposition (Annexin-V-Bindung)

Da die Phosphatidylserinexposition ein bedeutendes Merkmal der Eryptose darstellt, wurde im folgenden Experiment der Einfluss von Nigericin in verschiedenen Konzentrationen (0,1 – 10 nM) auf die Annexin-V-Bindung der Erythrozyten hin untersucht. Eine 48 stündige Inkubation mit 0,1 – 10 nM Nigericin zeigte einen prozentualen Anstieg der Annexin-V-bindenden Zellen. Dieser Effekt erreichte bei 0,1 nM Nigericin eine statistische Signifikanz ($p < 0,001$) und stieg bis zu einer Konzentration von 1 nM kontinuierlich an. Bei den Nigericin-Konzentrationen 2,5; 5 und 10 nM konnte, im Vergleich zu 1 nM Nigericin, eine signifikante Erniedrigung der Annexin-V-bindenden Zellen festgestellt werden (Abb. 19 B).

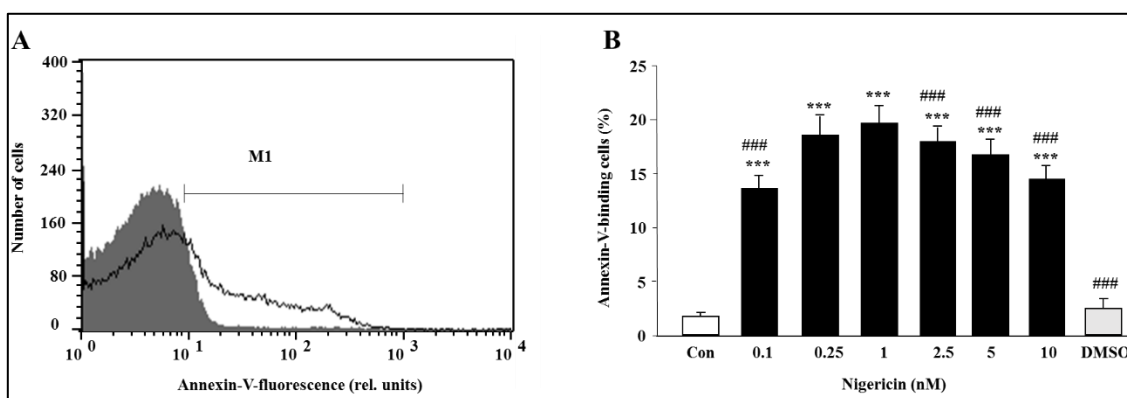


Abbildung 19: Effekt von Nigericin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) Effekt von 1 nM Nigericin. M1 zeigt den Bereich der Annexin-V-positiven Zellen (%) an.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=10) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 0,1 – 10 nM Nigericin. Als Vergleich ist der Effekt von 1 μ l DMSO/ml Ringer-Lösung gezeigt (grauer Balken). *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Nigericin (weißer Balken) (ANOVA); ### ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zu 1 nM Nigericin (paired t-test) [187].

3.3.2 Erythrozytäre Zellgröße (Forward Scatter (FSC))

Um zu überprüfen, ob eine Exposition der Erythrozyten mit Nigericin eine Zellschrumpfung zur Folge hat, wurde der Effekt von Nigericin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 – 10 nM) auf die Zellgröße der Erythrozyten getestet. Nach 48

ERGEBNISSE

stündiger Inkubation der Proben mit 0,1; 0,25 und 1 nM Nigericin konnte eine signifikante Abnahme des FSC festgestellt werden. Bei den mit den Nigericin-Konzentrationen 2,5-10 nM behandelten Proben war das FSC ähnlich wie bei der Ringer-Kontrolle (Abb. 20 B).

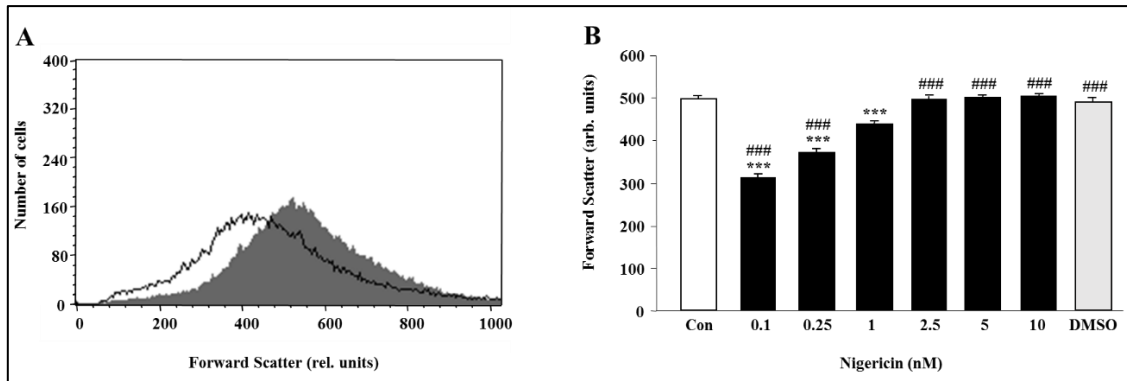


Abbildung 20: Effekt von Nigericin auf das erythrozytäre Forward Scatter (FSC)

A: Original-Histogramm des erythrozytären Forward Scatters nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) Effekt von 1 nM Nigericin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=10) aus dem erythrozytären Forward Scatter nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 0,1 – 10 nM Nigericin. Als Vergleich ist der Effekt von 1 μ l DMSO/ml Ringer-Lösung gezeigt (grauer Balken). *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle (weißer Balken) (ANOVA); ### (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zu 1 nM Nigericin (paired t-test) [187].

3.3.3 Intrazelluläre Calciumkonzentration (Fluo-3-Fluoreszenz)

Bei diesem Experiment wurde der Effekt von Nigericin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 – 10 nM) auf eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration hin in Erythrozyten untersucht. Hierfür wurden die Erythrozyten für 48 h inkubiert und mit Fluo-3-AM markiert. Anschließend wurde die Fluo-3-Fluoreszenz mit Hilfe des FACS gemessen. Nach 48 stündiger Inkubation der Proben mit Nigericin zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der Fluo-3-Fluoreszenz bis zu einer Nigericin-Konzentration von 1 nM, die bereits bei 0,1 nM eine statistische Signifikanz erreichte (p<0,01). Im Vergleich zu 1 nM Nigericin zeigte sich bei 2,5 nM Nigericin eine signifikante Abnahme der Fluo-3-Fluoreszenz (p<0,05). Bei den Nigericin-Konzentrationen 5 und 10 nM war die Fluo-3-Fluoreszenz im Gegensatz zu 1

ERGEBNISSE

nM Nigericin leicht erniedrigt, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 21 B).

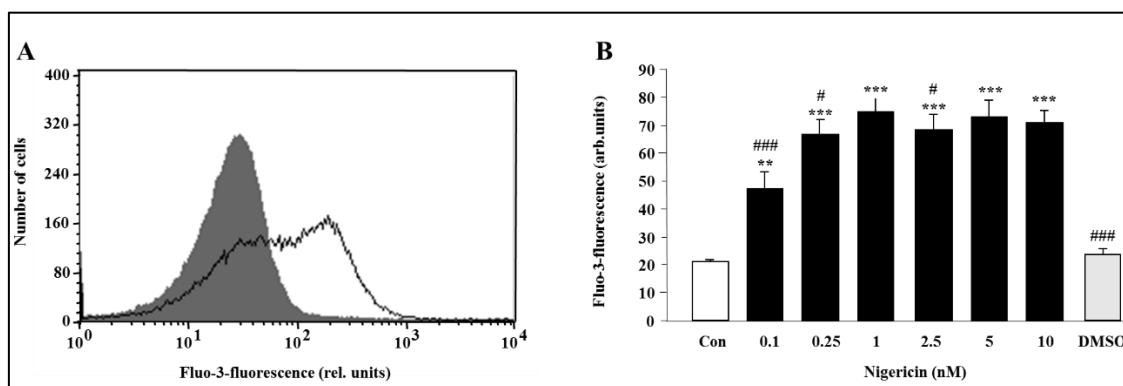


Abbildung 21: Effekt von Nigericin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Fluo3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) Effekt von 1 nM Nigericin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=10) der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 0,1 – 10 nM Nigericin. Als Vergleich ist der Effekt von 1 μ l DMSO/ml Ringer-Lösung gezeigt (grauer Balken). ** (p<0,01) und *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Nigericin (weißer Balken) (ANOVA); # (p<0,05) und ### (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zu 1 nM Nigericin (paired t-test) [187].

3.3.4 Calciumfreie Ringer-Lösung

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Nigericin-induzierte Zellschrumpfung von einem extrazellulären Calciumeinstrom abhängig ist. Aus diesem Grund wurden die Erythrozyten für 48 h in einer calciumfreien Ringer-Lösung und in normaler Ringer-Lösung mit einer Nigericin-Konzentration von 1 nM inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Phosphatidylserinexposition mittels Annexin-V-Bindung bestimmt. In der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} ging der Nigericin-induzierte Effekt auf die Phosphatidylserinexposition signifikant zurück (p<0,01). Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass selbst unter einer calciumfreien Ringer-Lösung die Phosphatidylserinexposition in Gegensatz zur Kontrolle signifikant höher war (p<0,01) (Abb. 22). Daher ist anzunehmen, dass die Nigericin-induzierte Phosphatidylserinexposition nicht nur auf einen extrazellulären Calciumeinstrom zurückzuführen ist.

ERGEBNISSE

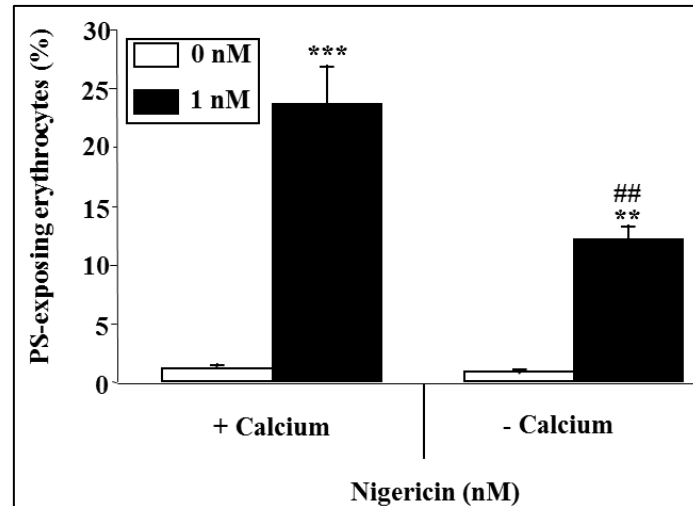


Abbildung 22: Effekt des Calciumentzugs auf die Nigericin-induzierte Annexin-V-Bindung in Erythrozyten

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=6) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 1 nM Nigericin. Linke Balken: Effekt von Nigericin auf die Annexin-V-Bindung mit Ca^{2+} ; Rechte Balken: Effekt von Nigericin auf die Phosphatidylserinexposition ohne Ca^{2+} . ** (p<0,01) und *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten ohne Nigericin; ## (p<0,01) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten in der Anwesenheit von Ca^{2+} (ANOVA) [187].

3.3.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Um eine mögliche Beteiligung von oxidativem Stress an der Nigericin-induzierten Eryptose zu untersuchen, wurde die DCFDA-abhängige Fluoreszenz unter dem Einfluss der Substanz ermittelt. Nach einer 48 stündigen Inkubation der Erythrozyten mit 1 nM Nigericin ($19,2 \pm 0,8$ arb. units, n=9) wurde im Vergleich zur Ringer-Kontrolle ($16,7 \pm 0,3$ arb. units, n=9) ein signifikanter Anstieg der DCFDA-abhängige Fluoreszenz beobachtet (p<0,05) (Abb. 23 A & B). Dies deutet daraufhin, dass Nigericin einen oxidativen Stress in Erythrozyten induziert.

ERGEBNISSE

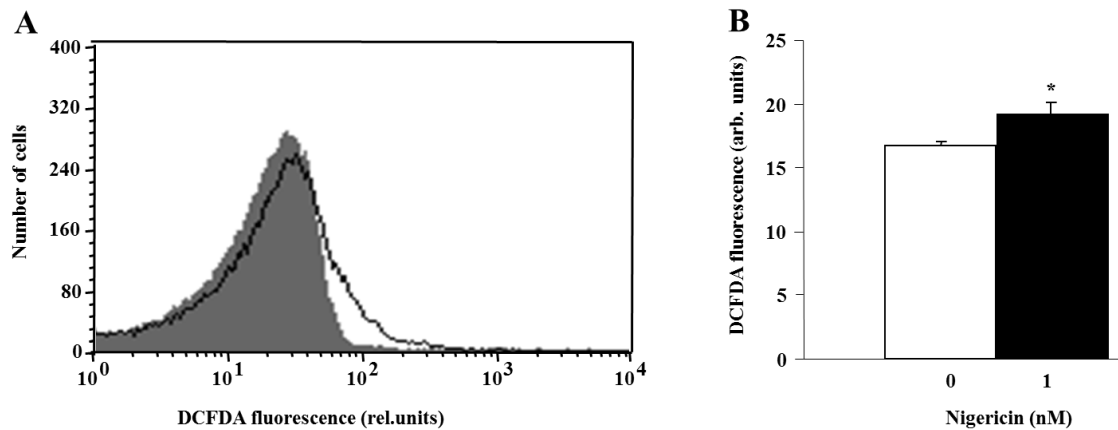


Abbildung 23: Effekt von Nigericin auf die erythrozytäre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

A: Original-Histogramm der DCFDA-Fluoreszenz in Erythrozyten nach Exposition für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) 1 nM Nigericin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=5) der DCFDA-Fluoreszenz in Erythrozyten nach 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) 1 nM Nigericin. * (p<0,05) zeigt den signifikanten Unterschied zur Ringer-Kontrolle ohne Nigericin (unpaired t-test).

3.3.6 Hämolyse

Für die Bestimmung der Nigericin-induzierten Hämolyse wurden die Nigericin-Konzentrationen 0,1-10 nM bei jeweils (n=4) verschiedenen Spendern getestet. Für die jeweiligen Nigericin-Konzentrationen wurden folgende Mittelwerte der Prozentsätze ermittelt: $2,52 \pm 0,23$ % (Ringer-Kontrolle); $3,14 \pm 0,34$ % (0.1 nM); $2,87 \pm 0,45$ % (0.25 nM); $6,10 \pm 2,32$ % (1 nM); $3,71 \pm 0,38$ % (2.5 nM); $4,49 \pm 0,74$ % (5 nM); $4,33 \pm 0,32$ % (10 nM) und $2,93 \pm 1,02$ % (DMSO-Kontrolle). Der Unterschied war im Vergleich zur Ringer-Kontrolle statistisch nicht signifikant.

3.3.7 Ceramid

Um die Beteiligung von Ceramid als möglichen Mechanismus an der durch Nigericin ausgelösten Eryptose zu erforschen, wurde die Ceramidbildung unter Nigericineinfluss gemessen. Nach 48 stündiger Behandlung der Erythrozyten mit 1 nM Nigericin ($16,3 \pm 1,5$ arb. units, n=10) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Ceramid-Anreicherung im Vergleich zur Ringer-Kontrolle ($16,6 \pm 1,4$ arb. units, n=10) (Abb. 24 A

ERGEBNISSE

& B). Somit ist eine mögliche Beteiligung von Ceramid am Zellmembran-Scrambling unter der Wirkung von Nigericin unwahrscheinlich.

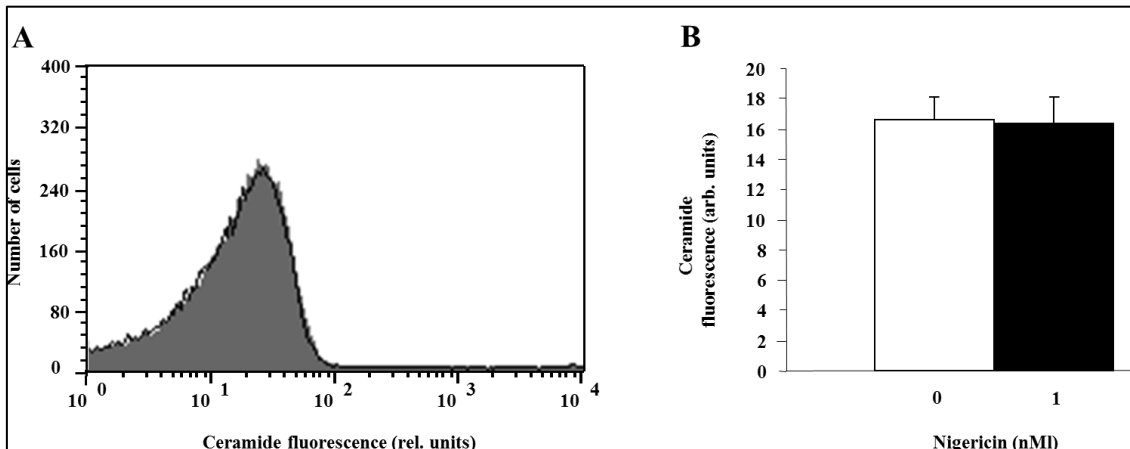


Abbildung 24: Effekt von Nigericin auf die Ceramidbildung in Erythrozyten

A: Original-Histogramm der Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linie) 1 nM Nigericin.

B: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=5) der Ceramid-Anreicherung auf der Oberfläche der Erythrozyten nach Inkubation für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarzer Balken) Effekt von 1 nM Nigericin [187].

3.3.8 Intrazelluläre pH-Messung (pH_i)

Das Ionophor Nigericin erhöht die Permeabilität der Zellmembranen für H⁺-Ionen und führt auf diese Weise zu einem Anstieg der intrazellulären Azidität der Zellen. Um unter Nigericin eine Veränderung der intrazellulären Azidität der Erythrozyten zu überprüfen, wurden die Proben zunächst ohne und mit Nigericin (0,1 – 10 nM) für 24 Stunden inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben mit BCECF-AM gefärbt und die BCECF-Fluoreszenz mit Hilfe des FACS gemessen. Hierbei zeigte sich unter 0,1; 0,25 und 1 nM Nigericin eine signifikante Abnahme des intrazellulären pH-Wertes. Unter den Nigericin-Konzentrationen 5 und 10 nM konnte jedoch im Vergleich zur Ringer-Kontrolle eine leichte Zunahme des intrazellulären pH-Wertes beobachtet werden (Abb. 25).

ERGEBNISSE

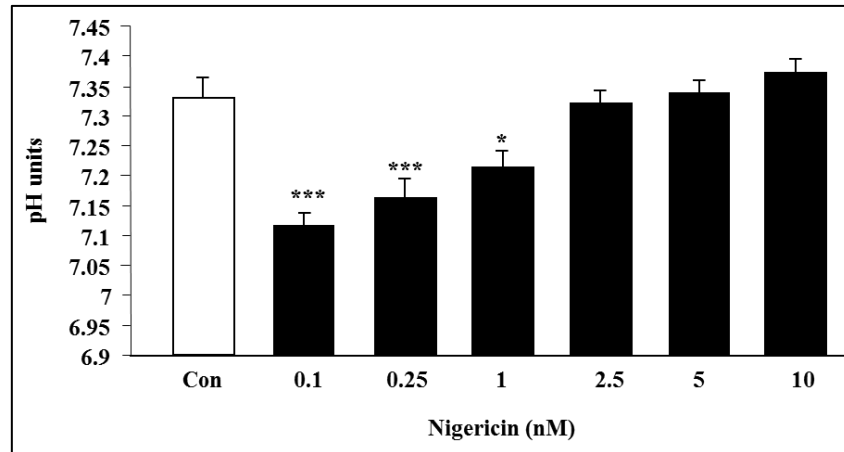


Abbildung 25: Effekt von Nigericin auf den intrazellulären pH-Wert der Erythrozyten

Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=12) des intrazellulären pH (pH_i) nach Inkubation der Erythrozyten für 24 h in Ringer-Lösung ohne (weißer Balken) und mit (schwarze Balken) Nigericin. * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$) zeigt den signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Werten der Ringer-Kontrolle ohne Nigericin (ANOVA) [187].

3.3.9 Cariporid (Na^+/H^+ -Austauscher-Inhibitor)

Nachdem die Messungen einen Nigericin-induzierten Anstieg der intrazellulären Azidität und eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration zeigten, stellte sich die Frage, ob hier ein kausaler Zusammenhang bestand. Um einem Anstieg der intrazellulären Azidität entgegenzuwirken, wird ein in der Zellmembran lokalisierter Na^+/H^+ -Austauscher (NHE1) stimuliert. Dieser bewirkt einen Ausstrom von H^+ -Ionen, sowie einen gleichzeitigen Einstrom von Na^+ -Ionen. Der Einstrom von Na^+ -Ionen stimuliert wiederum den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX1), der letztendlich eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt. Um den besagten kausalen Zusammenhang zu klären, wurde der selektive Na^+/H^+ -Austauscher-Inhibitor Cariporid verwendet. Hierfür wurden Versuche in der Anwesenheit von 10 μM Cariporid und ohne Cariporid (Ringer-Kontrolle) durchgeführt. Hierbei zeigte sich unter Cariporid eine signifikante Abnahme des Nigericin-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration (Abb. 26 A, B & C).

ERGEBNISSE

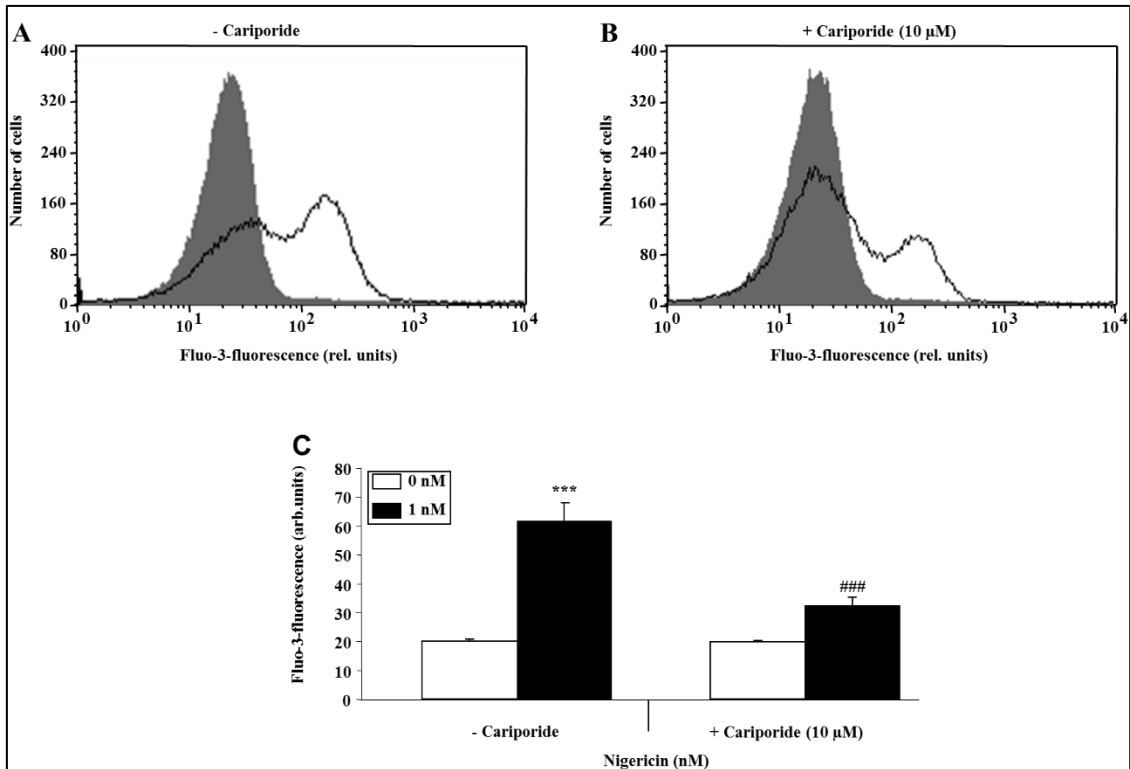


Abbildung 26: Effekt von Nigericin auf den intrazellulären Calciumgehalt der Erythrozyten in Anwesenheit und Abwesenheit von Cariporid

A+B: Original-Histogramme der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linien) Effekt von 1 nM Nigericin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 μ M Cariporid.

C: Arithmetisches Mittel \pm SEM (n=10) der Fluo-3-Fluoreszenz nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 1 nM Nigericin. Linke Balken: Effekt von Nigericin auf die Fluo-3-Fluoreszenz ohne Cariporid; Rechte Balken: Effekt von Nigericin auf die Fluo-3-Fluoreszenz mit Cariporid (10 μ M). *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von 1 nM Nigericin (weiße Balken) (ANOVA). ### (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von 10 μ M Cariporid (ANOVA) [187].

Um zu überprüfen, ob der durch den Einfluss von Cariporid verminderte Calciumeinstrom auch eine Auswirkung auf die Phosphatidylserinexposition unter dem Einfluss von Nigericin hat, wurde die Phosphatidylserinexposition ebenfalls nach 48 stündiger Inkubation mit Cariporid gemessen. Die Messung ergab, analog zum erniedrigten Calciumeinstrom unter dem Einfluss von Cariporid, auch eine verminderte Annexin-V-Bindung, die in Abb. 27 A, B & C dargestellt ist.

ERGEBNISSE

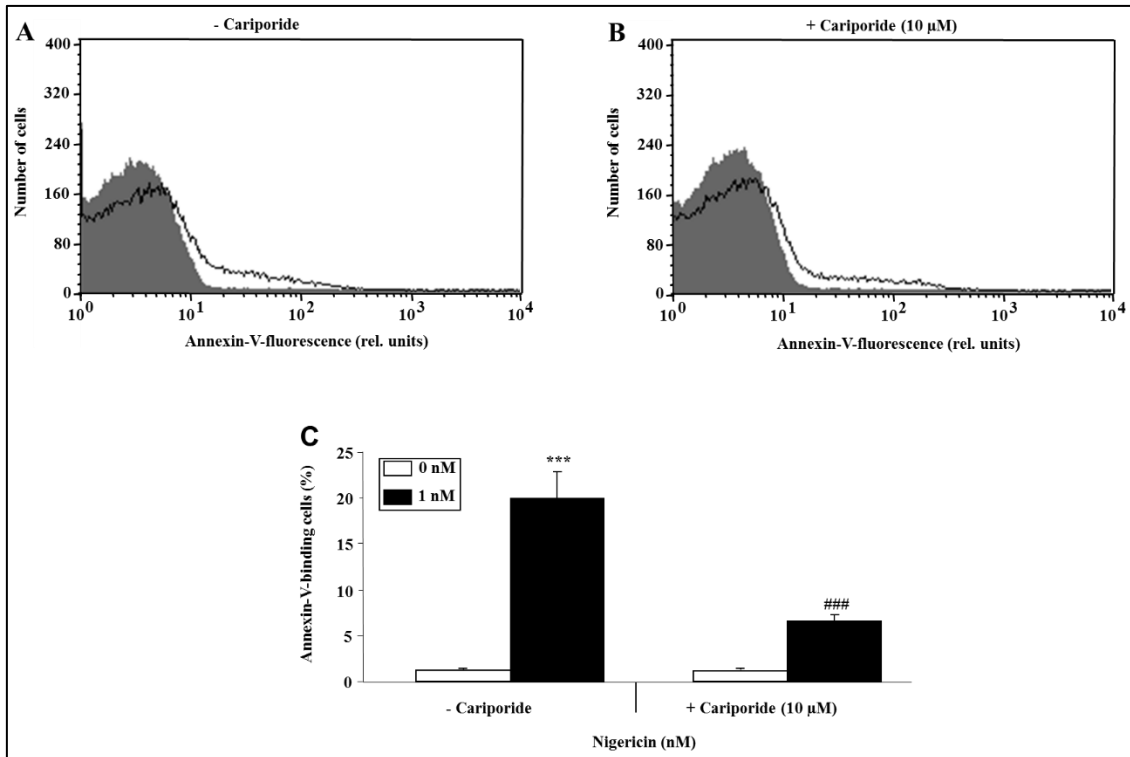


Abbildung 27: Effekt von Nigericin auf die Phosphatidylserinexposition der Erythrozyten in Anwesenheit und Abwesenheit von Cariporid

A+B: Original-Histogramme der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (grauschattierte Fläche) und mit (schwarze Linien) Effekt von 1 nM Nigericin in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 μM Cariporid.

C: Arithmetisches Mittel ± SEM (n=10) aus dem Prozentsatz der Annexin-V-Bindung nach Inkubation der Erythrozyten für 48 h in Ringer-Lösung ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Effekt von 1 nM Nigericin. Linke Balken: Effekt von Nigericin auf die Annexin-V-Bindung unter Abwesenheit von Cariporid; Rechte Balken: Effekt von Nigericin auf die Phosphatidylserinexposition mit Cariporid (10 μM). *** (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von Nigericin (weiße Balken) (ANOVA); ### (p<0,001) zeigt den signifikanten Unterschied zur Abwesenheit von 10 μM Cariporid (ANOVA) [187].

4 DISKUSSION

Im Zeitalter zunehmender Antibiotikaresistenzen muss nicht nur die Forschung an neuen Antibiotika vorangetrieben werden, sondern auch die Effektivität bereits existierender Antibiotika verbessert werden. Hierfür ist es unerlässlich, das Nebenwirkungsprofil dieser Antibiotika zu erforschen [159, 160]. Daher wurde der Effekt der Ionophor-Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin auf die Erythrozyten in dieser Arbeit untersucht.

4.1 Salinomycin-induzierte Eryptose

Die vorliegenden Messergebnisse an humanen Erythrozyten zeigen, dass Salinomycin ein einflussreicher Stimulator des Zellmembran-Scramblings ist und in der Folge zu einer vermehrten Phosphatidylserinexposition führt. Des Weiteren zeigen die Messergebnisse eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration, was in der Konsequenz zu einer Zellschrumpfung führt. Es ist anzunehmen, dass die signifikante Schrumpfung der Erythrozyten zum Teil auf den erhöhten Einstrom von Ca^{2+} zurückzuführen ist, denn durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration werden calciumsensitive Kaliumkanäle aktiviert, die zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle und zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führen. Bei dem hierdurch erzeugten elektrischen Gradienten kommt es ferner zu einem Ausstrom von Cl^- , das zusammen mit dem Kaliumausstrom das Wasser aus der Zelle treibt und zur Schrumpfung dieser führt [49]. Die für die Auslösung der Eryptose und den Einstrom von Ca^{2+} benötigten Salinomycin-Konzentrationen sind mit den *in vivo* verwendeten Konzentrationen vergleichbar. In einer Studie beim Menschen wurde Salinomycin in intravenösen Konzentrationen von 200 – 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ angewandt [108]. In einer weiteren Studie konnte beim Menschen eine Salinomycin Plasmakonzentration von 46,5 pg/ml nachgewiesen werden [188], was einer Konzentration von etwa 61,25 nM entspricht. In Mäusen konnten Plasmakonzentrationen bis zu 1392 ng/ml nachgewiesen werden [189], was in etwa einer Konzentration von 1,85 μM entspricht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits 5 nM Salinomycin

DISKUSSION

einen Effekt auf humane Erythrozyten haben, eine Konzentration, die weit unterhalb der angegebenen humanen Plasmakonzentration von 46,5 pg/ml liegt.

Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, dass Salinomycin direkt den Kaliumausstrom erhöht [108, 121]. Salinomycin soll ebenfalls den Natriumeinfluss verstärken, was eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt und eine Schwellung der Zelle zur Folge hat [117]. In Trypanosomen konnte dieser Effekt der Zellschwellung bereits nachgewiesen werden [117]. Das legt die Vermutung nahe, dass höhere Salinomycin-Konzentrationen benötigt werden um einen Natriumeinstrom zu bewirken, da unter höheren Salinomycin-Konzentrationen in den vorliegenden Ergebnissen eine Zellschwellung der Erythrozyten zu beobachten ist. Bei niedrigeren Salinomycin-Konzentrationen kommt es jedoch überwiegend zu einem Kaliumausstrom, was eine Schrumpfung der Erythrozyten zur Folge hat, was auch die Beobachtungen in dieser Arbeit nahelegen.

Die calciumpermeablen Kationenkanäle in Erythrozyten erlauben nicht nur den Einstrom von Ca^{2+} , sondern sind auch für Na^+ durchlässig [46]. Zumindest theoretisch könnte eine moderate Öffnung der calciumpermeablen Kationenkanäle ausreichend Ca^{2+} einströmen lassen, sodass Kaliumkanäle aktiviert werden, die ihrerseits den Austritt von K^+ bewirken und gleichzeitig den Einstrom von Na^+ vorantreiben. Bei einer vollständigen Aktivierung der Kanäle übersteigt der Einstrom von Na^+ den Ausstrom von K^+ . Ein exzessiver Natriumeinstrom könnte zur Schwellung der Erythrozyten führen und demzufolge zur Schädigung der Erythrozytenmembran beitragen. In der Folge könnte es zum Austritt von Hämoglobin kommen, welches als freies Hämoglobin durch die glomeruläre Filtration intraluminal ausfallen und zur Okklusion der Nierentubuli führen könnte [190]. In den vorliegenden Experimenten konnte allerdings keine signifikante Hämolyse der Erythrozyten unter der Einwirkung von Salinomycin festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass die Zellmembran der Erythrozyten trotz des Salinomycin-bedingten Zellmembran-Scramblings intakt geblieben ist. Deshalb kann a priori nicht davon ausgegangen werden, dass eine Salinomycin-induzierte Eryptose auch zu einer Schädigung der Zellmembran führt.

DISKUSSION

Die vorliegenden Experimente zeigen auch eine Erhöhung des oxidativen Stresses (ROS) unter dem Einfluss von Salinomycin. Es ist bekannt, dass eine Erhöhung des oxidativen Stresses die calciumpermeablen Kationenkanäle in Erythrozyten aktiviert [46]. Eine Anreicherung von Ceramid an der Zelloberfläche der Erythrozyten konnte ebenfalls unter dem Effekt von Salinomycin festgestellt werden. Neben einer calciumabhängigen Auslösung des Zellmembran-Scramblings und der daraus folgenden Phosphatidylserinexposition gibt es einen zweiten Weg über das Ceramid, welcher auch calciumunabhängig sein kann [52]. Eine signifikante Anreicherung von Ceramid an der Zelloberfläche der Erythrozyten deutet daraufhin, dass das Salinomycin-induzierte Zellmembran-Scrambling u.a. auch auf die Bildung von Ceramid zurückzuführen ist.

Zudem ist bekannt, dass Salinomycin eine Apoptose in Tumorzellen auslösen kann [108, 120, 123, 191]. Außerdem konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass Salinomycin eine Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt [123, 124, 192] und darüber hinaus zu einem Ausstrom von K^+ führt [121]. In kernhaltigen Zellen zeigt Salinomycin einen Effekt auf die Funktion von Mitochondrien [121, 122]. Da reife Erythrozyten weder Zellkerne noch Mitochondrien besitzen, ist der beschriebene Effekt von Salinomycin in Erythrozyten unerheblich. Neben den Effekten auf Erythrozyten sind bei Salinomycin andere toxische Wirkungen bekannt. Zu diesen zählen Übelkeit [108, 193], Photophobie [108, 193], Verlust von Myelin [194], axonale Degeneration [194], Kreatinkinase-Erhöhung [195], Myoglobinurie [196], Abschwächung der Gliedmaßen [194], Myalgie [108, 193], milde Rhabdomyolyse [195], Hypertonus [108, 193] und Infertilität [197]. Es sind auch Effekte von Salinomycin auf das Herz bekannt. So weist Salinomycin auf das Herz positiv inotrope und chronotrope Effekte auf [198]. Ferner bewirkt Salinomycin eine verbesserte Auswurfleistung des Herzens sowie eine Erhöhung des linksventikulären Drucks, der Herzfrequenz, des mittleren arteriellen Drucks, des Blutflusses in den Koronararterien und eine Erhöhung des Katecholaminspiegels im Blut [198]. Einige der genannten Effekte könnten auf eine Salinomycin-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zurückzuführen sein.

4.2 Nystatin-induzierte Eryptose

Bei der Behandlung der humanen Erythrozyten mit dem Ionophor Nystatin kommt es neben einer Durchlässigkeit der erythrozytären Membran für monovalente Ionen, auch zu einer Stimulation des Zellmembran-Scramblings. Das Zellmembran-Scrambling führt seinerseits zu einer Translokation von Phosphatidylserin an die Oberfläche der erythrozytären Membran. Außerdem führte die Behandlung der Erythrozyten mit 15 µg/ml Nystatin zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumaktivität, was auf eine Aktivierung der calciumsensitiven Kaliumkanäle zurückzuführen ist [49]. Diese Aktivierung bewirkt u.a. einen Kaliumausstrom, eine Hyperpolarisation der Zellmembran, einen Ausstrom von Cl⁻ und eine Zellschrumpfung [49]. Eine Abnahme des erythrozytären Zellvolumens unter dem Einfluss von Nystatin konnte anhand der Abnahme des Forward Scatters bestätigt werden.

Obwohl Nystatin vorwiegend lokal angewandt wird [129-131], findet es auch seinen Einsatz bei schweren Infektionen, die gegenüber anderen Antimykotika wie beispielsweise Amphotericin B, resistent sind [136]. In einigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Nystatin in seiner liposomalen Form weniger toxisch ist als in seiner freien Form [133, 134]. Daher beziehen sich die Plasmakonzentrationen von Nystatin in den meisten Studien auf liposomales Nystatin [136, 199].

Die in dieser Arbeit verwendeten Nystatin-Konzentrationen waren leicht höher als die in einer Studie erreichten Konzentrationen von $9,0 \pm 0,6$ µg/ml bei einer Applikation von 1,0 mg/kg Nystatin [199]. Die in Tierversuchen erreichten Plasmakonzentrationen von Nystatin sind höher als humane Plasmakonzentrationen und erreichen Werte von 33,6 µg/ml in Mäusen [200] und 56 µg/ml in Kaninchen [201]. Wird Nystatin systemisch angewandt, können Nebenwirkungen wie beispielsweise Fieber, Übelkeit, Erbrechen, arterielle Hypertonie, Tachykardie, Störungen im Elektrolythaushalt, Schüttelfrost und schwere Dyspnoe auftreten [136].

4.3 Nigericin-induzierte Eryptose

Die Experimente mit dem K^+ , H^+ -Ionophor Nigericin zeigen einen neuartigen Effekt von Nigericin auf Erythrozyten. Die Nigericin-induzierte Eryptose war gekennzeichnet durch eine Zellschrumpfung unter niedrigeren Nigericin-Konzentrationen (0,1 - 1 nM) und einem Zellmembran-Scrambling (Translokation von Phosphatidylserin) der Erythrozyten. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Nigericin in einer höheren Konzentration (2,5 - 10 nM) die Zellschrumpfung umkehrte. Der Effekt von Nigericin auf das Zellmembran-Scrambling war unter höheren Nigericin-Konzentrationen (2,5 - 10 nM) abgeschwächt. Diese Beobachtungen weisen auf einen dualen Effekt von Nigericin hin. Des Weiteren bewirkte Nigericin eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration bis zu einer Konzentration von 1 nM. Durch diese Zunahme werden calciumsensitive Kaliumkanäle aktiviert, die zu einem Kaliumausstrom und zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen. Aufgrund des hierdurch erzeugten elektrischen Gradienten kommt es zu einem Ausstrom von Cl^- , das zusammen mit einem Kaliumausstrom das Wasser aus der Zelle treibt und zur Schrumpfung dieser führt [49].

Trotz einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration unter dem Einfluss von Nigericin nahm das Zellvolumen zwischen 2,5 und 10 nM Nigericin zu. Diese Zunahme ist wahrscheinlich auf die Eigenschaft des Nigericins als K^+ und H^+ -Ionophor zurückzuführen, was zu einer erhöhten Permeabilität der Erythrozytenmembran für H^+ und K^+ -Ionen führt und zur Folge hat, dass H^+ -Ionen in die Erythrozyten hinein und K^+ -Ionen aus diesen hinaus wandern. Des Weiteren führt die hohe Nigericin-induzierte Leitfähigkeit für K^+ -Ionen zu einer Hyperpolarisation der Erythrozyten. Diese Hyperpolarisation ist wiederum der Antrieb für einen weiteren Einstrom von H^+ -Ionen in die Zelle. Dieser Einstrom von H^+ -Ionen bedingt eine Erhöhung der intrazellulären Azidität und stimuliert dadurch den in der Erythrozytenmembran lokalisierten Na^+/H^+ -Austauscher (NHE1) [36, 202]. Die Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers führt zu einem Einstrom von Na^+ -Ionen und bedingt deshalb eine Zunahme des Zellvolumens [203]. Es wird angenommen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Ionen die Wirkung des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers (NCX1) umkehrt, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Dementsprechend konnte durch den Na^+/H^+ -Austauscher-

DISKUSSION

Inhibitor Cariporid [204, 205] der Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} und die Annexin-V-Bindung abgeschwächt werden. Ferner soll Cariporid durch eine intrazelluläre Azidität eine Apoptose in Tumorzellen begünstigen [206].

Der Effekt von Nigericin auf das Zellmembran-Scrambling könnte teilweise auf einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration beruhen und in der Folge zur Aktivierung einer noch nicht näher definierten Scramblase führen. Demzufolge konnte der Nigericin-induzierte Effekt auf das Zellmembran-Scrambling in einer calciumfreien Lösung signifikant abgeschwächt werden. Der Einstrom von Ca^{2+} könnte auf einer Umkehrung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Ausstauschers und / oder auf der Aktivität von calciumpermeablen Kanälen beruhen. Diese Kanäle werden durch oxidativen Stress aktiviert [44, 49]. Die DCFDA-Fluoreszenz zeigte einen geringen, aber dennoch statistisch signifikanten Effekt von Nigericin auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Obwohl dieser Effekt signifikant war, wird er dennoch kaum für die Nigericin-induzierte Eryptose verantwortlich sein.

Die Experimente in einer calciumfreien Ringer-Lösung schwächten den Nigericin-induzierten Effekt auf das Zellmembran-Scrambling ab. Allerdings gab es auch in einer calciumfreien Ringer-Lösung noch einen gewissen signifikanten Prozentsatz an Annexin-V-bindenden Zellen. Dieser Umstand deutet daraufhin, dass es noch zusätzliche Mechanismen gibt, die nach einer Exposition von Nigericin zum Zellmembran-Scrambling führen. Theoretisch könnte das Nigericin-induzierte Zellmembran-Scrambling teilweise auch auf einen intrazellulären Verlust von K^+ -Ionen und auf eine Zellschrumpfung, die allgemein als Auslöser einer Eryptose bekannt sind, zurückzuführen sein [37].

In einer Studie bei Mäusen wurde Nigericin *in vivo* mit einer Dosis von 0,005 mg/g Körpergewicht angewandt [207]. In anderen Zellen, wie beispielsweise in Nasopharynxkarzinomzellen liegt die IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) von Nigericin bei $2,03 \pm 0,55 \mu\text{M}$ [145], die IC_{50} von Nigericin gegen das Vacciniavirus in HeLa-Zellen liegt bei 7,9 nM [208]. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sind weitaus geringere Nigericin-Konzentrationen (0,1 nM) notwendig, um eine Eryptose auszulösen.

DISKUSSION

Überdies könnte die Toxizität der in dieser Arbeit verwendeten Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin verstärkt in Patienten auftreten, die an Krankheiten leiden, in denen eine verstärkte Eryptose vorkommt [53], wie beispielsweise Diabetes [209, 210], Niereninsuffizienz [211], Hämolytisch-urämisches Syndrom [212], Sepsis [213], Malaria [77], Sichelzellanämie [214], Morbus Wilson [215], Eisenmangelanämie [216], Tumorerkrankungen [217], Hyperphosphatämie [218] und metabolisches Syndrom [219].

5 ZUSAMMENFASSUNG

In Analogie zu kernhaltigen Zellen sind auch Erythrozyten zur Apoptose (Eryptose) befähigt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Ionophor-Antiinfektiva Salinomycin, Nystatin und Nigericin auf die Eryptose untersucht. Die Phosphatidylserinexposition wurde anhand der Annexin-V-Bindung, die Zellgröße mittels des Forward Scatters, die intrazelluläre Calciumkonzentration anhand der Fluo-3-Fluoreszenz, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies anhand der DCFDA-Fluoreszenz und die Ceramidbildung mit Hilfe von Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert. Weiterhin wurde die Eryptose auch unter dem Einfluss von NAC sowie ohne extrazelluläres Calcium gemessen. Ferner wurde überprüft, ob die Antiinfektiva eine Hämolyse der Erythrozyten bewirken. Eine Exposition der Erythrozyten mit Salinomycin zeigte eine signifikante Erhöhung der PS-Exposition und der intrazellulären Calciumkonzentration. Der Effekt der Zellschrumpfung konnte nur bei niedrigeren Konzentrationen von Salinomycin beobachtet werden. Der oxidative Stress und die Bildung von Ceramid waren nach Exposition der Zellen mit Salinomycin signifikant erhöht. Nach Zugabe von N-Acetylcystein war die Phosphatidylserinexposition signifikant erniedrigt. Nach Exposition der Erythrozyten mit verschiedenen Salinomycin-Konzentrationen war keine signifikante Hämolyse zu beobachten. Die Ergebnisse einer Exposition der Erythrozyten mit Nystatin zeigten eine signifikante Erhöhung der Phosphatidylserinexposition, eine Zellschrumpfung der Erythrozyten und eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration. Eine Exposition der Erythrozyten in einer calciumfreien Ringer-Lösung zeigte eine verminderte Eryptose. Oxidativer Stress und Ceramid spielen bei der Nystatin-induzierten Eryptose keine Rolle, da diese Parameter nicht erhöht waren. Die Nystatin-Konzentrationen 10 und 15 µg/ml führten zu einer leichten, jedoch nicht statistisch relevanten Hämolyse. Die Exposition der Erythrozyten mit Nigericin zeigte eine Erhöhung der Phosphatidylserinexposition und der intrazellulären Calciumkonzentration. Eine Zellschrumpfung der Erythrozyten fand im niedrigen Konzentrationsbereich statt. Eine Inkubation der Erythrozyten in einer calciumfreien Ringer-Lösung zeigte eine Abnahme der Phosphatidylserinexposition. Ceramid und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) scheinen am Auslösen der Nigericin-induzierten Eryptose beteiligt zu sein. Nigericin führte im niedrigen Konzentrationsbereich zu einer

ZUSAMMENFASSUNG

signifikanten Erhöhung der Azidität der Erythrozyten. Sowohl die Annexin-Bindung als auch die Fluo-3-Fluoreszenz unter Nigericin waren in der Anwesenheit von Cariporid signifikant erniedrigt. Bei 1 nM Nigericin war die höchste, jedoch statistisch nicht relevante Hämolyse zu beobachten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dupire, J., M. Socol, and A. Viallat, *Full dynamics of a red blood cell in shear flow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(51): p. 20808-13.
2. Svetina, S., *Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure*. Cell Mol Biol Lett, 2012. **17**(2): p. 171-81.
3. Hamasaki, N. and M. Yamamoto, *Red blood cell function and blood storage*. Vox Sang, 2000. **79**(4): p. 191-7.
4. Diez-Silva, M., et al., *Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease*. MRS Bull, 2010. **35**(5): p. 382-388.
5. Marengo-Rowe, A.J., *Structure-function relations of human hemoglobins*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2006. **19**(3): p. 239-45.
6. Jensen, F.B., *Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport*. Acta Physiol Scand, 2004. **182**(3): p. 215-27.
7. Migliaccio, A.R., *Erythroblast enucleation*. Haematologica, 2010. **95**(12): p. 1985-8.
8. de Back, D.Z., et al., *Of macrophages and red blood cells; a complex love story*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 9.
9. 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.
10. Loken, M.R., et al., *Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development*. Blood, 1987. **69**(1): p. 255-63.
11. Dzierzak, E. and S. Philipsen, *Erythropoiesis: development and differentiation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(4): p. a011601.
12. Sharkis, S.J., *The role of the thymus in erythropoiesis*. Blood Cells, 1984. **10**(2-3): p. 223-31.
13. Cooper, B., *The origins of bone marrow as the seedbed of our blood: from antiquity to the time of Osler*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2011. **24**(2): p. 115-8.
14. Wu, H., et al., *Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 242-6.

LITERATURVERZEICHNIS

15. Alfonso, I. and R. Quesada, *Biological activity of synthetic ionophores: ion transporters as prospective drugs?* Chemical Science, 2013. **4**(8): p. 3009-3019.
16. Jones, C.M., et al., *Measurement science in the circulatory system.* Cell Mol Bioeng, 2014. **7**(1): p. 1-14.
17. Yazdanbakhsh, K., C. Lomas-Francis, and M.E. Reid, *Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane.* Transfus Med Rev, 2000. **14**(4): p. 364-74.
18. Mohandas, N. and P.G. Gallagher, *Red cell membrane: past, present, and future.* Blood, 2008. **112**(10): p. 3939-48.
19. Blau, L. and R. Bittman, *Cholesterol distribution between the two halves of the lipid bilayer of human erythrocyte ghost membranes.* J Biol Chem, 1978. **253**(23): p. 8366-8.
20. Verkleij, A.J., et al., *The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy.* Biochim Biophys Acta, 1973. **323**(2): p. 178-93.
21. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.* Blood, 1997. **89**(4): p. 1121-32.
22. Cooper, R.A., *Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells.* J Supramol Struct, 1978. **8**(4): p. 413-30.
23. Frame, T., et al., *Synthetic glycolipid modification of red blood cell membranes.* Transfusion, 2007. **47**(5): p. 876-82.
24. Westhoff, C.M., *The Rh blood group system in review: a new face for the next decade.* Transfusion, 2004. **44**(11): p. 1663-73.
25. Speicher, D.W. and V.T. Marchesi, *Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments.* Nature, 1984. **311**(5982): p. 177-80.
26. Bennett, V. and A.J. Baines, *Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues.* Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1353-92.
27. Svetina, S., et al., *The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells.* Bioelectrochemistry, 2004. **62**(2): p. 107-13.
28. Rothstein, A., Z.I. Cabantchik, and P. Knauf, *Mechanism of anion transport in red blood cells: role of membrane proteins.* Fed Proc, 1976. **35**(1): p. 3-10.

LITERATURVERZEICHNIS

29. Endeward, V., et al., *Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane*. *Faseb j*, 2006. **20**(12): p. 1974-81.
30. Zhang, J.Z. and F. Ismail-Beigi, *Activation of Glut1 glucose transporter in human erythrocytes*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **356**(1): p. 86-92.
31. Olives, B., et al., *Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(26): p. 15607-10.
32. Ringel, R. *Red blood cell Na⁺ K⁺ ATPase in men with newly diagnosed OR previously treated essential hypertension*. 1987 [cited 2016 26 July]; Available from: <http://hyper.ahajournals.org/content/9/5/437.full.pdf>.
33. Oviedo, N.J., et al., *The plasma membrane Ca²⁺-ATPase protein from red blood cells is not modified in preeclampsia*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(3): p. 381-5.
34. Kahle, K.T., J. Rinehart, and R.P. Lifton, *Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1802**(12): p. 1150-8.
35. Weder, A. *Red blood cell Li⁺ Na⁺ countertransport, Na⁺ K⁺ cotransport, and the hemodynamics of hypertension*. 1987 [cited 2016 26 July]; Available from: <http://hyper.ahajournals.org/content/9/5/459.full.pdf>.
36. Aharonovitz, O., et al., *ATP dependence is not an intrinsic property of Na⁺/H⁺ exchanger NHE1: requirement for an ancillary factor*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 1): p. C1303-11.
37. 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.
38. Wlodkowic, D., et al., *Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death*. *Methods Cell Biol*, 2011. **103**: p. 55-98.
39. Lang, F., et al., *Ceramide in suicidal death of erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **26**(1): p. 21-8.
40. 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.
41. Lang, E. and F. Lang, *Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 513518.

LITERATURVERZEICHNIS

42. Lang, F., E. Lang, and M. Foller, *Physiology and pathophysiology of eryptosis*. *Transfus Med Hemother*, 2012. **39**(5): p. 308-14.
43. Foller, M., et al., *TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. **21**(1-3): p. 183-92.
44. Lang, K.S., et al., *Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(2): p. 249-56.
45. Lang, P.A., et al., *PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death*. *Cell Death Differ*, 2005. **12**(5): p. 415-28.
46. 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.
47. Huber, S.M., N. Gamper, and F. Lang, *Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts*. *Pflugers Arch*, 2001. **441**(4): p. 551-8.
48. 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.
49. 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.
50. Pompeo, G., et al., *Erythrocyte death in vitro induced by starvation in the absence of Ca(2+)*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1798**(6): p. 1047-55.
51. Connor, J., C.C. Pak, and A.J. Schroit, *Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(4): p. 2399-404.
52. Lang, K.S., et al., *Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(2): p. 231-43.
53. 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.
54. Lang, P.A., et al., *Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 6): p. 1233-43.
55. Gatidis, S., et al., *p38 MAPK activation and function following osmotic shock of erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **28**(6): p. 1279-86.

LITERATURVERZEICHNIS

56. 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.
57. Zelenak, C., et al., *Protein kinase CK1 α regulates erythrocyte survival*. Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(1-2): p. 171-80.
58. 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.
59. Foller, M., et al., *Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase*. Faseb j, 2009. **23**(4): p. 1072-80.
60. Foller, M., et al., *Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(18): p. 6771-6.
61. Mandal, D., et al., *Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes*. FEBS Lett, 2002. **513**(2-3): p. 184-8.
62. Lang, F., K. Jilani, and E. Lang, *Therapeutic potential of manipulating suicidal erythrocyte death*. Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(9): p. 1219-27.
63. Lang, F., et al., *Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria*. Pflugers Arch, 2004. **448**(3): p. 319-24.
64. Brugnara, C., L. De Franceschi, and S.L. Alper, *Ca²⁺-activated K⁺ transport in erythrocytes. Comparison of binding and transport inhibition by scorpion toxins*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8760-8.
65. Lew, V.L., S. Muallem, and C.A. Seymour, *Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in one-step inside-out vesicles from human red cell membranes*. Nature, 1982. **296**(5859): p. 742-4.
66. Maher, A.D. and P.W. Kuchel, *The Gardos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1182-97.
67. Grygorczyk, R., *Temperature dependence of Ca²⁺-activated K⁺ currents in the membrane of human erythrocytes*. Biochim Biophys Acta, 1987. **902**(2): p. 159-68.
68. Heinz, A. and J.F. Hoffman, *Membrane sidedness and the interaction of H⁺ and K⁺ on Ca²⁺-activated K⁺ transport in human red blood cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1998-2002.

LITERATURVERZEICHNIS

69. Brugnara, C., *Erythrocyte membrane transport physiology*. Curr Opin Hematol, 1997. **4**(2): p. 122-7.
70. Khalighi, M.A., et al., *Intratubular hemoglobin casts in hemolysis-associated acute kidney injury*. Am J Kidney Dis, 2015. **65**(2): p. 337-41.
71. 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.
72. Andrews, D.A. and P.S. Low, *Role of red blood cells in thrombosis*. Curr Opin Hematol, 1999. **6**(2): p. 76-82.
73. Closse, C., J. Dachary-Prigent, and M.R. Boisseau, *Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 300-2.
74. Gallagher, P.G., et al., *Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4625-7.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Kirk, K., *Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 495-537.
79. Ayi, K., et al., *16alpha-bromoepiandrosterone, an antimalarial analogue of the hormone dehydroepiandrosterone, enhances phagocytosis of ring stage parasitized erythrocytes: a novel mechanism for antimalarial activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(10): p. 3180-4.
80. Ayi, K., et al., *Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3364-71.
81. Cappadoro, M., et al., *Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2527-34.

LITERATURVERZEICHNIS

82. Koka, S., et al., *Lead decreases parasitemia and enhances survival of Plasmodium berghei-infected mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **363**(3): p. 484-9.
83. Koka, S., et al., *Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. **21**(5-6): p. 481-8.
84. Johnson-Wimbley, T.D. and D.Y. Graham, *Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century*. *Therap Adv Gastroenterol*, 2011. **4**(3): p. 177-84.
85. Sobrero, A., et al., *Fatigue: a main component of anemia symptomatology*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 15-8.
86. Hetzel, T.M. and J.D. Losek, *Unrecognized severe anemia in children presenting with respiratory distress*. *Am J Emerg Med*, 1998. **16**(4): p. 386-9.
87. Littlewood, T. and F. Mandelli, *The effects of anemia in hematologic malignancies: more than a symptom*. *Semin Oncol*, 2002. **29**(3 Suppl 8): p. 40-4.
88. Petranovic, D., et al., *Correlation of anaemia and cognitive functions measured by the complex reactiometer Drenovac*. *Coll Antropol*, 2008. **32**(1): p. 47-51.
89. Papagiannis, A., A.P. Smith, and M.W. Hebden, *Acute dyspnea, chest tightness, and anemia in a 33-year-old man*. *Chest*, 1995. **107**(3): p. 863-5.
90. Dodd, S.L., et al., *Effects of reduced O2 delivery with anemia, hypoxia, or ischemia on peak VO2 and force in skeletal muscle*. *J Appl Physiol* (1985), 1993. **74**(1): p. 186-91.
91. Silverberg, D.S., D. Wexler, and A. Iaina, *The role of anemia in the progression of congestive heart failure. Is there a place for erythropoietin and intravenous iron?* *J Nephrol*, 2004. **17**(6): p. 749-61.
92. Fernández-Bañares, F., H. Monzón, and M. Forné, *A short review of malabsorption and anemia*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(37): p. 4644-52.
93. Nelson, A.L. and J.J. Ritchie, *Severe anemia from heavy menstrual bleeding requires heightened attention*. *Am J Obstet Gynecol*, 2015. **213**(1): p. 97.e1-6.
94. Marengo-Rowe, A.J., *The thalassemias and related disorders*. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2007. **20**(1): p. 27-31.
95. Liu, K. and A.J. Kaffes, *Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and management*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2012. **24**(2): p. 109-16.

LITERATURVERZEICHNIS

96. Stoltzfus, R.J., *Iron deficiency: global prevalence and consequences*. Food Nutr Bull, 2003. **24**(4 Suppl): p. S99-103.
97. Gangat, N. and A.P. Wolanskyj, *Anemia of chronic disease*. Semin Hematol, 2013. **50**(3): p. 232-8.
98. Dhaliwal, G., P.A. Cornett, and L.M. Tierney, Jr., *Hemolytic anemia*. Am Fam Physician, 2004. **69**(11): p. 2599-606.
99. Tuchscherer, A. and J. Chemnitz, *[Hemolytic anemia]*. Internist (Berl), 2015. **56**(9): p. 1000-8.
100. Malyszko, J., I. Glowinska, and M. Mysliwiec, *Treatment of anemia with erythropoietin-stimulating agents in kidney transplant recipients and chronic kidney disease-another drawback of immunosuppression?* Transplant Proc, 2012. **44**(10): p. 3013-6.
101. Horiguchi, H., *[Anemia induced by cadmium intoxication]*. Nihon Eiseigaku Zasshi, 2007. **62**(3): p. 888-904.
102. Spivak, J.L., *Cancer-related anemia: its causes and characteristics*. Semin Oncol, 1994. **21**(2 Suppl 3): p. 3-8.
103. Fliedner, T.M., W. Nothdurft, and W. Calvo, *The development of radiation late effects to the bone marrow after single and chronic exposure*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1986. **49**(1): p. 35-46.
104. Gallardo-Godoy, A., et al., *Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B*. J Med Chem, 2016. **59**(3): p. 1068-77.
105. Franklin, T.J. and J.M. Cook, *The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid*. Biochem J, 1969. **113**(3): p. 515-24.
106. Ennis, H.L., *Inhibition of protein synthesis by polypeptide antibiotics. I. Inhibition in intact bacteria*. J Bacteriol, 1965. **90**(4): p. 1102-8.
107. Bush, K., *Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes*. Rev Sci Tech, 2012. **31**(1): p. 43-56.
108. Naujokat, C. and R. Steinhart, *Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 950658.
109. Freedman, J.C. and J.F. Hoffman, *Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells treated with nystatin*. J Gen Physiol, 1979. **74**(2): p. 157-85.

LITERATURVERZEICHNIS

110. Bevensee, M.O., E. Bashi, and W.F. Boron, *Effect of trace levels of nigericin on intracellular pH and acid-base transport in rat renal mesangial cells*. J Membr Biol, 1999. **169**(2): p. 131-9.
111. Buhlmann, P., E. Pretsch, and E. Bakker, *Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors*. Chem Rev, 1998. **98**(4): p. 1593-1688.
112. Gumila, C., et al., *Differential in vitro activities of ionophore compounds against Plasmodium falciparum and mammalian cells*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(3): p. 602-8.
113. Bahrami, F. and M. Janahmadi, *Antibiotic supplements affect electrophysiological properties and excitability of rat hippocampal pyramidal neurons in primary culture*. Iran Biomed J, 2013. **17**(2): p. 101-6.
114. Ronquist, G. and A. Waldenstrom, *Imbalance of plasma membrane ion leak and pump relationship as a new aetiological basis of certain disease states*. J Intern Med, 2003. **254**(6): p. 517-26.
115. Jiang, C., et al., *Cloning and characterization of the polyether salinomycin biosynthesis gene cluster of Streptomyces albus XM211*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(4): p. 994-1003.
116. McAllister, T.A., et al., *Effect of salinomycin on giardiasis and coccidiosis in growing lambs*. J Anim Sci, 1996. **74**(12): p. 2896-903.
117. Steverding, D. and D.W. Sexton, *Trypanocidal activity of salinomycin is due to sodium influx followed by cell swelling*. Parasit Vectors, 2013. **6**: p. 78.
118. Miyazaki, Y., et al., *Salinomycin, a new polyether antibiotic*. J Antibiot (Tokyo), 1974. **27**(11): p. 814-21.
119. Gupta, P.B., et al., *Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening*. Cell, 2009. **138**(4): p. 645-59.
120. Arafat, K., et al., *Inhibitory Effects of Salinomycin on Cell Survival, Colony Growth, Migration, and Invasion of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66931.
121. Mitani, M., T. Yamanishi, and Y. Miyazaki, *Salinomycin: a new monovalent cation ionophore*. Biochem Biophys Res Commun, 1975. **66**(4): p. 1231-6.
122. Jangamreddy, J.R., et al., *Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(9): p. 2057-69.

LITERATURVERZEICHNIS

123. Kim, K.Y., et al., *Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **413**(1): p. 80-6.
124. Ketola, K., et al., *Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress*. *Br J Cancer*, 2012. **106**(1): p. 99-106.
125. Yue, W., et al., *Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance*. *Autophagy*, 2013. **9**(5): p. 714-29.
126. Zhang, B., et al., *Antitumor properties of salinomycin on cisplatin-resistant human ovarian cancer cells in vitro and in vivo: involvement of p38 MAPK activation*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(4): p. 1371-8.
127. PubChem. *Fluo 3-AM*. 2016 [cited 2016 July 2]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16213075>.
128. Fjaervik, E. and S.B. Zotchev, *Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in Streptomyces noursei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005. **67**(4): p. 436-43.
129. Lye, W.C., *Nystatin prophylaxis for fungal peritonitis: to be or not to be?* *Perit Dial Int*, 2007. **27**(5): p. 511-3.
130. Austin, N., B.A. Darlow, and W. McGuire, *Prophylactic oral/topical non-absorbed antifungal agents to prevent invasive fungal infection in very low birth weight infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(3): p. Cd003478.
131. MacPhail, L.A., et al., *Prophylaxis with nystatin pastilles for HIV-associated oral candidiasis*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996. **12**(5): p. 470-6.
132. Carrillo-Munoz, A.J., et al., *In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole*. *J Antimicrob Chemother*, 1999. **44**(3): p. 397-401.
133. Wallace, T.L., et al., *Activity of liposomal nystatin against disseminated Aspergillus fumigatus infection in neutropenic mice*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. **41**(10): p. 2238-43.
134. Lopez-Berestein, G., et al., *Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study*. *J Infect Dis*, 1985. **151**(4): p. 704-10.

LITERATURVERZEICHNIS

135. Arikan, S., et al., *In vitro activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical Candida isolates*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1406-12.
136. Offner, F., et al., *Liposomal Nystatin in Patients with Invasive Aspergillosis Refractory to or Intolerant of Amphotericin B*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4808-12.
137. PubChem. *Nystatin*. 2016 [cited 2016 June 28]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6433272>.
138. Graven, S.N., O.S. Estrada, and H.A. Lardy, *Alkali metal cation release and respiratory inhibition induced by nigericin in rat liver mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **56**(2): p. 654-8.
139. Boyarsky, G., C. Hanssen, and L.A. Clyne, *Inadequacy of high K⁺/nigericin for calibrating BCECF. II. Intracellular pH dependence of the correction*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 1): p. C1146-56.
140. Harvey, B.M., et al., *Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in Streptomyces sp. DSM4137*. Chem Biol, 2007. **14**(6): p. 703-14.
141. Irurzun, A., J.L. Nieva, and L. Carrasco, *Entry of Semliki forest virus into cells: effects of concanamycin A and nigericin on viral membrane fusion and infection*. Virology, 1997. **227**(2): p. 488-92.
142. Adovelande, J. and J. Schrevel, *Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on Plasmodium falciparum in vitro and Plasmodium vinckei petteri in vivo*. Life Sci, 1996. **59**(20): p. P1309-15.
143. Couzinet, S., et al., *Toxoplasma gondii: activity of the polyether ionophorous antibiotic nigericin on tachyzoites in cell culture*. Exp Parasitol, 1994. **78**(4): p. 341-51.
144. Hasuda, K., C. Lee, and I.F. Tannock, *Antitumor activity of nigericin and 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride: an approach to therapy based on cellular acidification and the inhibition of regulation of intracellular pH*. Oncol Res, 1994. **6**(6): p. 259-68.
145. Deng, C.C., et al., *Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(9): p. 1997-2006.
146. Zhou, H.M., et al., *Suppression of colorectal cancer metastasis by nigericin through inhibition of epithelial-mesenchymal transition*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(21): p. 2640-8.

LITERATURVERZEICHNIS

147. Mashima, T., S. Okabe, and H. Seimiya, *Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormone-refractory prostate cancer cell growth*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(5): p. 846-54.
148. Watanabe, N., M. Kawaguchi, and Y. Kobayashi, *Activation of interleukin-1beta-converting enzyme by nigericin is independent of apoptosis*. Cytokine, 1998. **10**(9): p. 645-53.
149. King, S.R., L.P. Walsh, and D.M. Stocco, *Nigericin inhibits accumulation of the steroidogenic acute regulatory protein but not steroidogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **166**(2): p. 147-53.
150. Hentze, H., et al., *Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin*. Cell Death Differ, 2003. **10**(9): p. 956-68.
151. Lim, J., et al., *Nigericin-induced impairment of autophagic flux in neuronal cells is inhibited by overexpression of Bak*. J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23271-82.
152. Varnes, M.E., et al., *Effect of the K⁺/H⁺ ionophore nigericin on response of A549 cells to photodynamic therapy and tert-butylhydroperoxide*. Free Radic Biol Med, 1993. **15**(4): p. 395-405.
153. O'Rourke, F., et al., *Ca²⁺ release by inositol 1,4,5-trisphosphate is blocked by the K⁽⁺⁾-channel blockers apamin and tetrapentylammonium ion, and a monoclonal antibody to a 63 kDa membrane protein: reversal of blockade by K⁺ ionophores nigericin and valinomycin and purification of the 63 kDa antibody-binding protein*. Biochem J, 1994. **300** (Pt 3): p. 673-83.
154. Erecinska, M., et al., *Relations between intracellular ions and energy metabolism under acidotic conditions: a study with nigericin in synaptosomes, neurons, and C6 glioma cells*. J Neurochem, 1993. **61**(4): p. 1356-68.
155. Perregaux, D. and C.A. Gabel, *Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 15195-203.
156. Parfenova, H., J. Haffner, and C.W. Leffler, *Phosphorylation-dependent stimulation of prostanoid synthesis by nigericin in cerebral endothelial cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 1): p. C728-38.
157. Le Petit-Thevenin, J., et al., *Selective modulation of membrane sphingomyelin fatty acid turnover by nigericin. A study in the rat reticulocyte*. Life Sci, 1996. **59**(19): p. P1289-94.

LITERATURVERZEICHNIS

158. PubChem. *Nigericin*. 2016 [cited 2016 June 28]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/34230>.
159. Harrison, J.W. and T.A. Svec, *The beginning of the end of the antibiotic era? Part I. The problem: abuse of the "miracle drugs"*. Quintessence Int, 1998. **29**(3): p. 151-62.
160. Falagas, M.E., A.P. Grammatikos, and A. Michalopoulos, *Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008. **6**(5): p. 593-600.
161. Falagas, M.E. and P. Kopterides, *Old antibiotics for infections in critically ill patients*. Curr Opin Crit Care, 2007. **13**(5): p. 592-7.
162. Lang, K.S., et al., *Mechanisms of suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(5): p. 195-202.
163. Lang, F., et al., *Oxidative stress and suicidal erythrocyte death*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(1): p. 138-53.
164. Ran, Q., et al., *Eryptosis Indices as a Novel Predictive Parameter for Biocompatibility of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on Erythrocytes*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16209.
165. Sowemimo-Coker, S.O., *Red blood cell hemolysis during processing*. Transfus Med Rev, 2002. **16**(1): p. 46-60.
166. Masereel, B., L. Pochet, and D. Laeckmann, *An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger*. Eur J Med Chem, 2003. **38**(6): p. 547-54.
167. Wong, P., C. Lee, and I.F. Tannock, *Reduction of intracellular pH as a strategy to enhance the pH-dependent cytotoxic effects of melphalan for human breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3553-7.
168. van Wijk, R. and W.W. van Solinge, *The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4034-42.
169. Kellum, J.A., *Determinants of blood pH in health and disease*. Crit Care, 2000. **4**(1): p. 6-14.
170. Lizarbe Mí, A., et al., *Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(2): p. 2652-83.
171. Paredes, R.M., et al., *Chemical Calcium Indicators*. Methods, 2008. **46**(3): p. 143-51.

LITERATURVERZEICHNIS

172. Kao, J.P., A.T. Harootunian, and R.Y. Tsien, *Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 8179-84.
173. Biotium. *Fluo-3, AM ester*. 2016 [cited 2016 July 02]; Available from: <https://biotium.com/product/fluo-3-am-ester/>.
174. Amer, J., A. Goldfarb, and E. Fibach, *Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells*. Eur J Haematol, 2003. **70**(2): p. 84-90.
175. Futerman, A.H. and Y.A. Hannun, *The complex life of simple sphingolipids*. EMBO Rep, 2004. **5**(8): p. 777-82.
176. Liu, J., B.S. Beckman, and M. Foroozesh, *A review of ceramide analogs as potential anticancer agents*. Future Med Chem, 2013. **5**(12): p. 1405-21.
177. Probes, M. *BCECF*. 2016 [cited 2016 16 July, 2016]; Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01150.pdf>.
178. Bernstein, R.L., et al., *Flow cytometric analysis of mature adipocytes*. Cytometry, 1989. **10**(4): p. 469-74.
179. Grinstein, S., S. Cohen, and A. Rothstein, *Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport*. J Gen Physiol, 1984. **83**(3): p. 341-69.
180. Rink, T.J., R.Y. Tsien, and T. Pozzan, *Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 189-96.
181. Lavis, L.D., T.J. Rutkoski, and R.T. Raines, *Tuning the pK(a) of fluorescein to optimize binding assays*. Anal Chem, 2007. **79**(17): p. 6775-82.
182. Graber, M.L., et al., *Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH*. Anal Biochem, 1986. **156**(1): p. 202-12.
183. Teshima, Y., et al., *Cariporide (HOE642), a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway*. Circulation, 2003. **108**(18): p. 2275-81.
184. Bissinger, R., et al., *Triggering of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by Salinomycin*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014.
185. Malik, A., et al., *Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by nystatin*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015. **116**(1): p. 47-52.

LITERATURVERZEICHNIS

186. Ouédraogo, M., et al., *Free radical scavenging capacity, anticandidal effect of bioactive compounds from Sida Cordifolia L., in combination with nystatin and clotrimazole and their effect on specific immune response in rats.* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2012. **11**: p. 33.
187. Bissinger, R., et al., *Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by the Antibiotic Ionophore Nigericin.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2016. **118**(5): p. 381-9.
188. Li, Y., et al., *Identification and quantification of salinomycin in intoxicated human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.* Anal Bioanal Chem, 2010. **398**(2): p. 955-61.
189. Sparidans, R.W., et al., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assays for salinomycin in mouse plasma, liver, brain and small intestinal contents and in OptiMEM cell culture medium.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **855**(2): p. 200-10.
190. Harrison, H.E., et al., *THE PATHOGENESIS OF THE RENAL INJURY PRODUCED IN THE DOG BY HEMOGLOBIN OR METHEMOGLOBIN.* J Exp Med, 1947. **86**(4): p. 339-56.
191. Koo, K.H., et al., *Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2.* Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e693.
192. Zhou, J., et al., *Salinomycin induces apoptosis in cisplatin-resistant colorectal cancer cells by accumulation of reactive oxygen species.* Toxicol Lett, 2013. **222**(2): p. 139-45.
193. Story, P. and A. Doube, *A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic.* N Z Med J, 2004. **117**(1190): p. U799.
194. Dorne, J.L., et al., *Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects.* Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **270**(3): p. 196-208.
195. Kosal, M.E. and D.E. Anderson, *An unaddressed issue of agricultural terrorism: a case study on feed security.* J Anim Sci, 2004. **82**(11): p. 3394-400.
196. Plumlee, K.H., B. Johnson, and F.D. Galey, *Acute salinomycin toxicosis of pigs.* J Vet Diagn Invest, 1995. **7**(3): p. 419-20.
197. Ojo, O.O., S. Bhadauria, and S.K. Rath, *Dose-dependent adverse effects of salinomycin on male reproductive organs and fertility in mice.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69086.

LITERATURVERZEICHNIS

198. Fahim, M., G. del Valle, and B.C. Pressman, *Comparison of the effects of the ionophore salinomycin and adrenaline on the haemodynamics and work efficiency of the dog heart*. Cardiovasc Res, 1986. **20**(2): p. 145-52.
199. Rios, A., et al., *Pharmacokinetics of liposomal nystatin in patients with human immunodeficiency virus infection*. J Infect Dis, 1993. **168**(1): p. 253-4.
200. Khan, M.A., S.M. Faisal, and O. Mohammad, *Safety, efficacy and pharmacokinetics of tuftsin-loaded nystatin liposomes in murine model*. J Drug Target, 2006. **14**(4): p. 233-41.
201. Groll, A.H., et al., *Comparative Drug Disposition, Urinary Pharmacokinetics, and Renal Effects of Multilamellar Liposomal Nystatin and Amphotericin B Deoxycholate in Rabbits*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3917-25.
202. Wooden, J.M., et al., *Comparative proteomics reveals deficiency of SLC9A1 (sodium/hydrogen exchanger NHE1) in beta-adducin null red cells*. Br J Haematol, 2011. **154**(4): p. 492-501.
203. Weaver, Y.R., K. Kiessling, and A.R. Cossins, *Responses of the Na⁺/H⁺ exchanger of European flounder red blood cells to hypertonic, beta-adrenergic and acidotic stimuli*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 1): p. 21-32.
204. Pasham, V., et al., *OSR1-sensitive regulation of Na⁺/H⁺ exchanger activity in dendritic cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(4): p. C416-26.
205. Rotte, A., et al., *Influence of dexamethasone on na⁺/h⁺ exchanger activity in dendritic cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(2): p. 305-14.
206. Harguindey, S., et al., *Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs--an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 282.
207. Stout-Delgado, H.W., et al., *Impaired NLRP3 inflammasome function in elderly mice during influenza infection is rescued by treatment with nigericin*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2815-24.
208. Myskiw, C., et al., *Nigericin is a potent inhibitor of the early stage of vaccinia virus replication*. Antiviral Res, 2010. **88**(3): p. 304-10.
209. 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.

LITERATURVERZEICHNIS

210. 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.
211. Abed, M., et al., *Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 871-9.
212. Lang, P.A., et al., *Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(5): p. 378-88.
213. Kempe, D.S., et al., *Suicidal erythrocyte death in sepsis*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(3): p. 273-81.
214. 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.
215. 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.
216. Kempe, D.S., et al., *Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes*. Faseb j, 2006. **20**(2): p. 368-70.
217. 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.
218. Voelkl, J., et al., *Stimulation of suicidal erythrocyte death by increased extracellular phosphate concentrations*. Kidney Blood Press Res, 2013. **38**(1): p. 42-51.
219. Zappulla, D., *Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO2 increases?* J Cardiometab Syndr, 2008. **3**(1): p. 30-4.

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Die Arbeit wurde am Institut für Physiologie in Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Florian Lang durchgeführt.

Die Konzeption aller unten genannten Studien erfolgte durch Prof. Dr. Lang. Neben einer Betreuung der Studien verfasste und korrigierte Prof. Dr. Lang die Publikationen.

Publikation 1:

Bissinger, R., **A. Malik**, K. Jilani and F. Lang (2014). "Triggering of the erythrocyte cell membrane scrambling by salinomycin." Basic Clin Pharmacol Toxicol **115** (5): 396-402

Frau Bissinger hat einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 7 A & B, 8 A & B, 9 A & B, 10, 11 A, B & C und 12 A & B dargestellt sind, durchgeführt.

Ich habe einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 7 A & B, 8 A & B, 9 A & B, 10, und 11 A, B & C dargestellt sind, durchgeführt. Die statistischen Auswertungen aller Abbildungen erfolgten, nach Anleitung durch Prof. Lang, durch mich. Des Weiteren habe ich alle Abbildungen erstellt. Zusätzlich habe ich die Hämolyse-Experimente durchgeführt.

Herr Jilani hat einen Teil der Versuche durchgeführt, die in den Abbildungen 7 A & B und 8 A & B dargestellt sind.

Publikation 2:

Malik, A., R. Bissinger, K. Jilani and F. Lang (2015). "Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by nystatin." Basic Clin Pharmacol Toxicol **116**(1): 47-52.

Ich habe einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 13 A & B, 14 A & B, 15 A & B, 16, 17 A & B und 18 A & B dargestellt sind, durchgeführt. Die statistischen Auswertungen aller Abbildungen erfolgten, nach Anleitung durch Prof. Lang, durch

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

mich. Des Weiteren habe ich alle Abbildungen erstellt. Zusätzlich habe ich die Hämolyse-Experimente durchgeführt.

Fr. Bissinger hat einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 13 A & B, 14 A & B und 15 A & B dargestellt sind, durchgeführt.

Hr. Jilani hat einen Teil der Versuche durchgeführt, die in den Abbildungen 16, und 17 A & B dargestellt sind.

Publikation 3:

Bissinger, R., **A. Malik**, G. Bouguerra, Y. Zhou, Y. Singh, S. Abbes and F. Lang (2016). „Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by the Antibiotic Ionophore Nigericin.” Basic Clin Pharmacol Toxicol **118** (5): 381-389.

Fr. Bissinger hat einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 19 A & B, 20 A & B und 21 A & B dargestellt sind, durchgeführt.

Ich habe einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 19 A & B, 20 A & B, 21 A & B, 22, 23 A, B & C, 24 A & B, 25, 26 A, B & C und 27 A, B & C dargestellt sind, durchgeführt. Die statistischen Auswertungen aller Abbildungen erfolgten, nach Anleitung durch Prof. Lang, durch mich. Des Weiteren habe ich alle Abbildungen erstellt. Zusätzlich habe ich die Hämolyse-Experimente durchgeführt.

Fr. Bouguerra hat einen Teil der Versuche, die in den Abbildungen 20 A & B und 21 A & B dargestellt sind, durchgeführt.

Hr. Zhou hat einen Teil der Versuche, die in der Abbildung 25 dargestellt ist, durchgeführt.

Hr. Singh hat einen Teil der Versuche, die in der Abbildung 25 dargestellt ist, durchgeführt.

Prof. Dr. Abbes hat die Publikation korrigiert.

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig nach Anleitung durch Prof. Lang verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 05.08.2016

Abaid Malik

8 DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang, Leiter des Instituts für Physiologie der Universität Tübingen, für die gesamte Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit ganz herzlich danken. Er hat mir ermöglicht an ein sehr spannendes Thema der Medizin zu forschen und zu arbeiten. Durch seine große Begeisterung für die Wissenschaft konnte er uns stets motivieren und regte uns an über den Tellerrand hinaus zu schauen.

Weiterhin bin ich Rosi Bissinger sehr zu Dank verpflichtet. Sie hat mich vom ersten Tag an im Labor unterstützt und betreut. Während meiner Zeit im Labor konnte ich mich stets auf sie verlassen.

Ich danke allen Institutsangehörigen und meinen Laborkollegen Dr. Kashif Jilani, Kousi Al Zoubi, Gregor Oswald, Uwe Schüler, Lejla Subasic, Tanja Loch, Ghada Bouguerra, Yuetao Zhou, Yogesh Singh, Salem Abbès für all ihre Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mir alle Möglichkeiten eröffneten und mich stets in allen Lebenslagen liebevoll unterstützt haben.