

**Phototoxikologie der
Kaliumkanal-Blocker Psora-3 und Psora-4:
In vitro-Untersuchungen zur Photoirritation,
Photokarzinogenität und Photoallergenität**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Carsten Wilhelm Bode

Kiel 2004

Referent:

Prof. Dr. Wolfram Hänsel

Korreferenten:

Prof. Dr. Dieter Heber

Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein, Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung:

10. November 2004

Zum Druck genehmigt:

10. November 2004

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer
(Dekan)

Meinen Eltern

„Mad dogs and Englishmen go out in the midday sun“

Sir Noël Pierce Coward (1899-1973)

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung.....	5
1.2	Untersuchte Verbindungen	6
1.3	Furocumarine	8
1.3.1	Psoralene	9
1.3.1.1	Psoralen	9
1.3.1.2	Bergaptol	9
1.3.1.3	Bergapten	10
1.3.1.4	Xanthotoxol.....	10
1.3.1.5	Xanthotoxin.....	10
1.3.1.6	Trioxsalen	11
1.3.1.7	Isopimpinellin.....	11
1.3.1.8	Imperatorin	11
1.3.1.9	5-Benzylloxypsoralen	12
1.3.1.10	Bergamottin	12
1.3.2	Phytophotodermatitis	12
2	Photosensibilisierung	17
2.1	Klassifizierung der Photosensibilisierung	19
2.2	Vorkommen von Photosensibilisatoren	21
2.3	Mechanismus der Photosensibilisierung	26
2.4	Sonnenstrahlung	29
2.5	Photosensibilisierung als therapeutischer Effekt.....	35
2.5.1	PUVA-Therapie	36
2.5.2	Extrakorporale Photopherese	36
2.5.3	Photodynamische Therapie	37
2.6	Historische Aspekte der Photosensibilisierung	41

3	Arzneistoffentwicklung und Photosensibilisierung	43
3.1	Regulatorische Anforderungen	43
3.1.1	Europäische Richtlinie	44
3.1.2	Amerikanische Richtlinie	46
3.2	Sonstige Empfehlungen	48
4	Materialien	51
4.1	Chemikalien	51
4.2	Verbrauchsgegenstände	52
4.3	Geräte	53
4.3.1	Zentrifugation.....	53
4.3.2	UV-Vis-Spektroskopie	53
4.3.3	Fluoreszenz-Spektroskopie	53
4.3.4	Strahlungsquellen.....	53
4.3.4.1	Heraeus Original Hanau Fluotest	53
4.3.4.2	Philips Sunlamp TL 36 D 25/09N.....	53
4.3.4.3	Dr. Hönle Sonnensimulator SOL-500	54
4.3.4.4	Atlas MTS Suntest CPS ⁺	55
4.3.5	Sonstige Geräte.....	56
5	Photophysikalische Untersuchungen.....	57
5.1	Photophysikalische Eigenschaften der Psoralene	57
5.2	Absorptionseigenschaften	60
5.2.1	Methode	60
5.2.2	Ergebnisse	60
5.3	Fluoreszenzeigenschaften	62
5.3.1	Methode	62
5.3.2	Ergebnisse	62
5.4	Diskussion.....	64

6	Photochemische Untersuchungen.....	65
6.1	Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff.....	65
6.1.1	Eigenschaften des Singulett-Sauerstoffs.....	65
6.1.2	Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit biologischen Molekülen	67
6.1.2.1	Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen	68
6.1.2.2	Reaktionen mit Nukleosiden und DNA	74
6.1.2.3	Reaktionen mit Lipiden	76
6.1.2	Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff durch Psoralene	84
6.1.2.1	Methode	84
6.1.2.2	Ergebnisse.....	86
6.1.2.3	Diskussion	88
6.2	Photoproduktion von Superoxidradikalanionen.....	89
6.2.1	Eigenschaften von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS)	90
6.2.2	Reaktionen von ROS mit biologischen Molekülen	92
6.2.2.1	Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen	92
6.2.2.2	Reaktionen mit Nukleosiden und DNA	94
6.2.2.3	Reaktionen mit Lipiden	98
6.2.2	Photoproduktion von Superoxidradikalanionen durch Psoralene	102
6.2.2.1	Methode	102
6.2.2.2	Ergebnisse.....	105
6.2.2.3	Diskussion	107
6.3	Quervernetzung von DNA.....	109
6.3.1	Photoaddition von Psoralenen an DNA	110
6.3.2	Phasenübergangsverhalten von DNA	113
6.3.3	Quervernetzung von DNA durch Psoralene	115
6.3.3.1	Methode	115
6.3.3.2	Ergebnisse.....	117
6.3.3.3	Diskussion	120

6.4	Photolyse von Membranen	122
6.4.1	Aufbau von Biomembranen	122
6.4.2	Photoreaktionen von Psoralenen mit Membrankomponenten	124
6.4.3	Photohämolyse von porcinen Erythrozyten	126
6.4.3.1	Methode	128
6.4.3.2	Ergebnisse.....	132
6.4.3.3	Diskussion	135
6.5	Photoproteinbindung.....	137
6.5.1	Bekannte Photokonjugationen von Psoralenen mit Proteinen.....	137
6.5.2	Photoallergische Reaktionen.....	138
6.5.3	Photoproteinbindung der Psoralene an humanem Serumalbumin	140
6.5.3.1	Methode	140
6.5.3.2	Ergebnisse.....	141
6.5.3.3	Diskussion	142
7	Photobiologische Untersuchungen	145
7.1	Photozytotoxizität.....	145
7.1.1	Testprinzip	145
7.1.2	Ergebnisse	146
7.1.3	Diskussion	149
7.2	Photogenotoxizität.....	150
7.2.1	Photomikrokerntest.....	150
7.2.1.1	Testprinzip	150
7.2.1.2	Ergebnisse.....	151
7.2.1.3	Diskussion	153
7.2.2	Photocometassay	154
7.2.2.1	Testprinzip	154
7.2.2.2	Ergebnisse.....	155
7.2.2.3	Diskussion	156

8	Zusammenfassung und Ausblick.....	159
----------	--	------------

9	Literaturverzeichnis.....	163
----------	----------------------------------	------------

Anhang

Eigene Veröffentlichungen

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung zu § 9 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Kurzfassung (deutsch)

Abstract (englisch)

1 Einleitung

Die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 (Abbildung 1.1) sind hochpotente Wirkstoffe, die den lymphozytären Kaliumkanal Kv1.3 im unteren nanomolaren Bereich blockieren. Psora-4 ist der bislang potenteste niedermolekulare Kv1.3-Blocker mit einem EC_{50} -Wert von 3 nmol/l (Vennekamp et al. 2004).

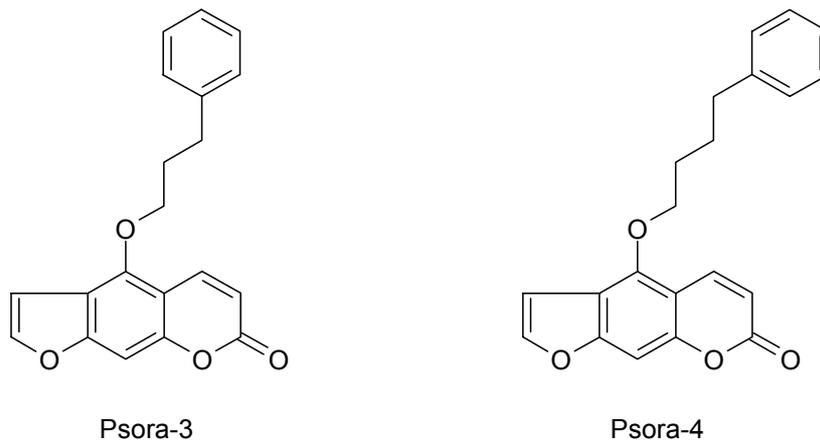


Abbildung 1.1 Psora-3 (5-(3-Phenylpropoxy)psoralen) und Psora-4 (5-(4-Phenylbutoxy)psoralen)

Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.3 und der kalziumabhängige Kaliumkanal IKCa1 („Intermediate-Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel“) steuern die durch Kalziumionen modulierte Hyperpolarisierung der Membran von humanen T-Zellen. Beide Kanäle sind für die Funktionstüchtigkeit von T-Zellen essenziell. Eine von T-Zellen vermittelte Immunreaktion beginnt mit der Erkennung von Antigenen durch den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex (Abbildung 1.2). Die Antigene sind dabei an MHC-Proteine („Major Histocompatibility Complex“) von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) gebunden. Die Erkennung löst die Aktivierung der Tyrosinkinase $p56^{lck}$ und der Phospholipase C (PLC) aus. Dies führt zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol, die die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern fördern. Sind die intrazellulären Kalziumspeicher erschöpft, erhält der spannungsunabhängige CRAC-Kanal („ Ca^{2+} Release-activated Ca^{2+} Channel“) die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration durch Einstrom von extrazellulärem Kalzium aufrecht.

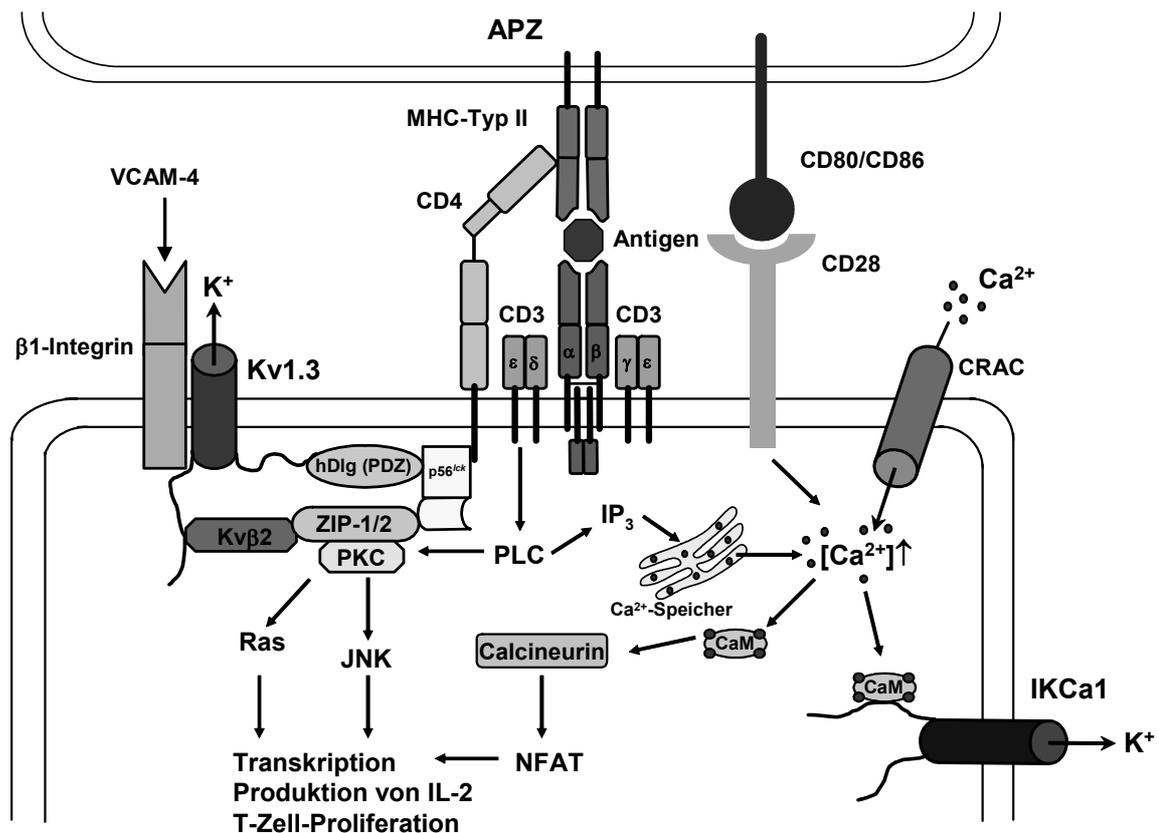


Abbildung 1.2

Beteiligung der Kaliumkanäle Kv1.3 und IKCa1 an der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen (nicht im Text erklärte Abkürzungen: CaM = Calmodulin, VCAM-4 = „Vascular Cell Adhesion Molecule 4“, modifiziert nach Chandy et al. 2004)

Die Kanäle Kv1.3 und IKCa1 regulieren diesen Vorgang über die Kontrolle des Membranpotenzials. Der zu einer Depolarisation führende Kalziumeinstrom durch den CRAC-Kanal läuft auf einer depolarisierten Membran nur reduziert ab und dementsprechend nimmt die Konzentration der Kalziumionen zunächst nicht zu. Der Kalziumeinstrom wird aber durch Hyperpolarisation der Membran nach Öffnung spannungsabhängiger Kv1.3-Kanäle, als Reaktion auf die Depolarisation, und kalziumabhängiger IKCa1-Kanäle aufrechterhalten. Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors CD28 durch die Proteine CD80 oder CD86 verstärkt zusätzlich diese Effekte. Die erhöhte Kalziumkonzentration regt die Phosphatase Calcineurin an, die den Transkriptionsfaktor NFAT („Nuclear Factor of activated T Cells“) dephosphoryliert, der somit im Zellkern akkumulieren und an den Promoter binden kann, der Interleukin 2 (IL-2) kodiert. Die Aktivierung der JNK („c-JUN N-terminal Kinase“) und einiger Ras-Proteine durch die Proteinkinase C führt ebenfalls zur

Stimulierung von Transkriptionsfaktoren und letztendlich zur T-Zell-Proliferation. Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung ist der an $\beta 1$ -Integrin gebundene Kanal Kv1.3 Teil eines komplexen Signalprozesses, der die Tyrosinkinase p56^{lck}, die Proteinkinase C, die Proteine Kv β 2, hDlg („Human Homolog of the Drosophila Discs large Tumor Suppressor Protein“), ZIP-1, ZIP-2 („Zrt/Irt-like Protein“) und CD4 umfasst (Chandy et al. 2004).

Eine selektive Blockade der Kaliumkanäle Kv1.3 und IKCa1 bewirkt eine Membran-Depolarisation, einen geringeren Kalziumeinstrom, eine verminderte Zytokin-Produktion und eine Abnahme der Proliferation. Die Immunmodulation durch Kaliumkanal-Blocker hängt stark von der Expression der Kv1.3- und IKCa1-Kanäle ab. Die Anzahl beider Kanäle ändert sich mit dem Übergang von ruhenden zu aktivierten Zellen und der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Gedächtniszellen. Entsprechend des Vorkommens des Chemokin-Rezeptors CCR7 und der Phosphatase CD45RA unterteilt man in verschiedene T-Zell-Subtypen (Abbildung 1.3).

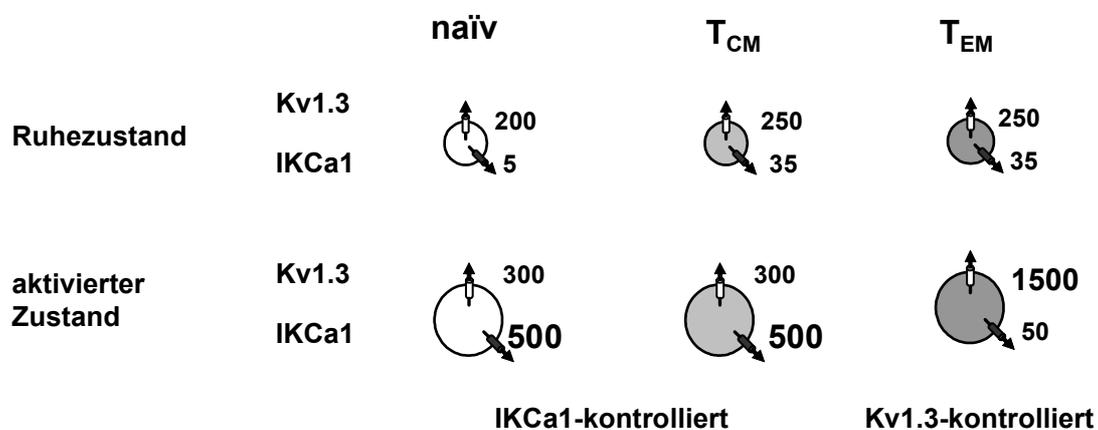


Abbildung 1.3

Durchschnittliche Anzahl der Kanäle Kv1.3 und IKCa1 pro Zelle auf naiven T-Zellen (CCR7⁺CD45RA⁺), „Central Memory“ T-Zellen (T_{CM}, CCR7⁺CD45RA⁻) und „Effector Memory“ T-Zellen (T_{EM}, CCR7⁻CD45RA⁻) vor und nach Aktivierung (modifiziert nach Chandy et al. 2004)

Im Ruhezustand liegen auf T-Zellen der drei Subtypen ca. 250 Kv1.3-Kanäle und 5 bis 35 IKCa1-Kanäle vor. Aufgrund der Dominanz von Kv1.3-Kanälen kann die Aktivierung wirkungsvoll durch Blockade dieses Kanals unterdrückt werden. Nach Übergang in den aktivierten Zustand verändert sich die Anzahl der Kaliumkanäle.

In Folge der Vorherrschaft der IKCa1-Kanäle können naive T-Zellen und T_{CM}-Zellen nur geringfügig durch eine Kv1.3- und stärker durch eine IKCa1-Blockade inhibiert werden. Im Gegensatz dazu können Kv1.3-Blocker lang anhaltend die Proliferation von aktivierten T_{EM}-Zellen, die eine große Anzahl von Kv1.3-Kanälen aufweisen und eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielen, unterdrücken (Chandy et al. 2004).

Die Mehrzahl der pathogenen, Myelin-reaktiven T-Zellen von Patienten mit Multipler Sklerose gehört dem T_{EM}-Typ an. Diese Zellen werden im Rahmen der Krankheit durch wiederholte Exposition gegenüber Myelin-Antigenen gebildet. Die aktivierten autoreaktiven T_{EM}-Zellen leisten wahrscheinlich einen Beitrag an der Entwicklung der Multiplen Sklerose, indem sie in entzündete Gewebe wandern und Interferon γ und Tumornekrosefaktor α sezernieren. In einem Tiermodell zur Simulation der Multiplen Sklerose, der sogenannten Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), konnte durch die Behandlung mit Kv1.3-Blockern sowohl die Entstehung von Symptomen verhindert als auch die Rückbildung der Symptomatik erreicht werden (Chandy et al. 2004).

Kv1.3-Blocker wie Psora-3 oder Psora-4 könnten daher als Immunmodulatoren zur Therapie der Autoimmunerkrankungen Multipler Sklerose und Typ I-Diabetes, bei denen T_{EM}-Zellen beteiligt sind, eingesetzt werden (Vennekamp et al. 2004).

1.1 Zielsetzung

Die Phototoxikologie erscheint derzeit als ein neues und aufstrebendes Teilgebiet der Toxikologie. Verglichen mit anderen toxikologischen Bereichen, die für die Arzneistoffentwicklung von Bedeutung sind, existieren bisher nur wenige Richtlinien und Empfehlungen der Arzneimittelbehörden und sonstiger relevanter Institutionen wie WHO, ICH oder OECD. Die Entwicklung von *in vitro*-Methoden als Alternative zum Tierversuch schreitet jedoch voran, weil die Haut durch künstliche Modelle hervorragend simuliert werden kann (Meunier et al. 2002).

Neue Wirkstoffe müssen für etwaige Einsätze als Arzneistoffe neben einer sehr guten Potenz und Selektivität eine möglichst geringe, in Hinblick auf ihre Indikation tolerable Toxizität aufweisen. Die Kaliumkanal-Blocker Psora-3 und Psora-4 gehören zu der Substanzgruppe der Psoralene. Für Pflanzenextrakte, die Psoralene enthalten, ist seit Jahrtausenden bekannt, dass sie unter dem Einfluss von Sonnenlicht auf der Haut Reaktion auslösen können (Urbach 1998). Dieser Vorgang wird als Photosensibilisierung bezeichnet und äußert sich akut durch Sonnenbrand-ähnliche Symptome und langfristig durch die Entstehung von Hautkrebs (Averbeck 1989). Für eine Verwendung als Arzneistoff sind solche Nebenwirkungen, gerade bei einer chronischen Anwendung als Immunmodulator, sehr problematisch und müssen als Risiko gegenüber dem Nutzen abgewogen werden (Vennekamp et al. 2004).

In dieser Arbeit werden deshalb die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 *in vitro* auf ihre photosensibilisierenden Eigenschaften untersucht. Dabei werden einerseits Studien zu dem Mechanismus der Photosensibilisierung durch Psora-3 und Psora-4 durchgeführt, andererseits sollen auch Erkenntnisse über die Gesamtreaktivität als Prognose für die Photosensibilisierung *in vivo* gewonnen werden. Die durchzuführenden Experimente orientieren sich an aktuellen Richtlinien und Empfehlungen. Die erzielten Daten sollen eine erste Abschätzung ermöglichen, ob die unter Bestrahlung möglichen Nebenwirkungen die Anwendung am Menschen erlauben oder nicht.

1.2 Untersuchte Verbindungen

Neben Psora-3 und Psora-4 wurden hauptsächlich vier Psoralene untersucht (Abbildung 1.4).

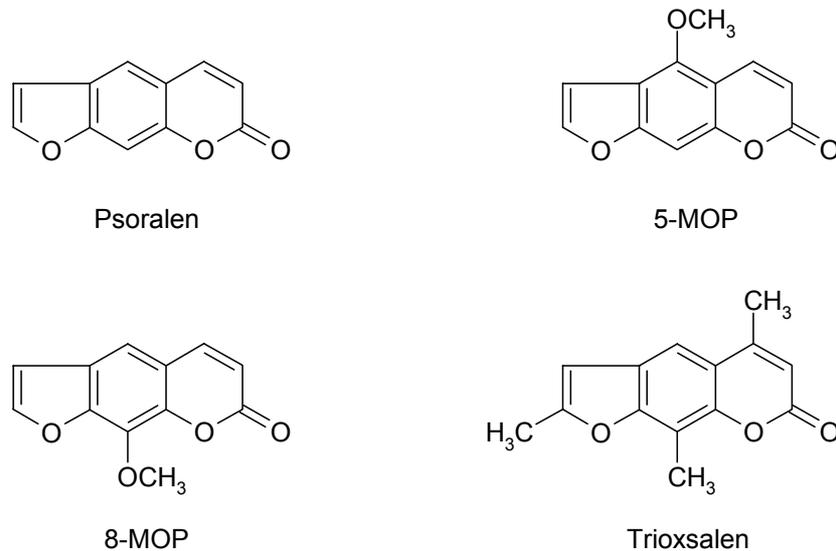
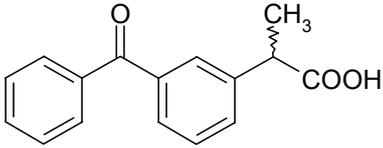


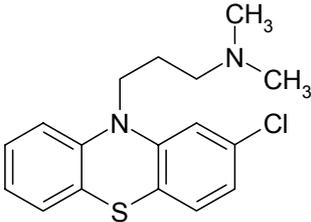
Abbildung 1.4 Weitere Psoralene

Diese vier Verbindungen sind diejenigen Psoralene, die am häufigsten in der PUVA-Therapie (Kapitel 2.5.1) eingesetzt werden (Njoo und Westerhof 2001). Dementsprechend sind *in vitro*- und *in vivo*-Eigenschaften beschrieben worden, die zum Vergleich mit den Verbindungen Psora-3 und Psora-4 herangezogen werden können.

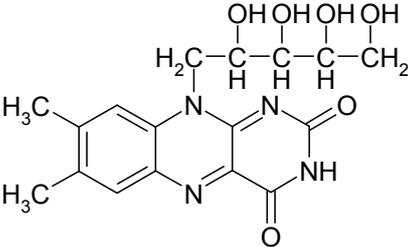
Als Referenz dienten weiterhin einige Verbindungen (Abbildung 1.5), die nicht der Substanzgruppe der Psoralene angehören. Ketoprofen ist ein Nicht-Steroidales Antirheumatikum. Chlorpromazin dient hauptsächlich als Neuroleptikum. Riboflavin (Vitamin B₂) ist Bestandteil der ubiquitär vorhandenen Flavinenzyme. Natriumlaurylsulfat (SDS) wird u. a. als Emulgator verwendet.



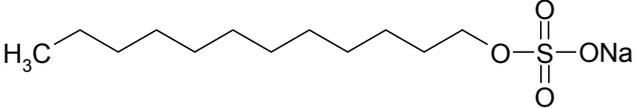
Ketoprofen



Chlorpromazin



Riboflavin

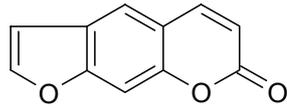


Natriumlaurylsulfat

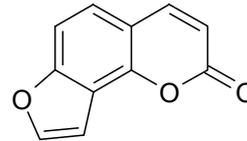
Abbildung 1.5 Referenzverbindungen

1.3 Furocumarine

Psoralene sind linear kondensierte Furocumarine. Angelicine zeichnen sich durch einen angular kondensierten Furanring aus (Abbildung 1.6) und können ebenfalls Photosensibilisierungsreaktionen auslösen (Averbeck 1989).



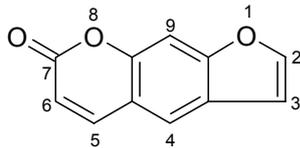
Psoralene



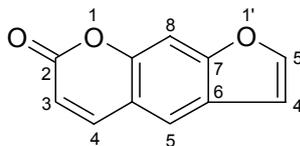
Angelicine

Abbildung 1.6 Lineare und angular kondensierte Furocumarine

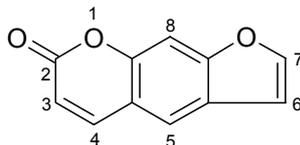
Da viele Furocumarine zunächst aus Pflanzen isoliert und erst später vollsynthetisch hergestellt worden sind, existieren mehrere Nomenklatorsysteme parallel für die Bezifferung der Ringatome (Abbildung 1.7). In dieser Arbeit werden die Psoralene nach der gebräuchlichen biomedizinischen Nomenklatur bezeichnet.



Psoralen-Nomenklatur nach IUPAC,
Chemical Abstracts und Beilstein



Biomedizinische Psoralen-Nomenklatur



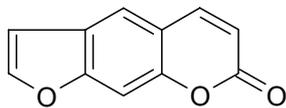
Psoralen-Nomenklatur nach MacLeod

Abbildung 1.7 Nomenklatorsysteme des Furocumarinrings

1.3.1 Psoralene

Zur Erleichterung der Abschätzung des *in vivo*-Verhaltens von Psora-3 und Psora-4 werden die photosensibilisierenden Aktivitäten *in vivo* einiger bekannter Verbindungen einschließlich IUPAC-Namen, weiteren Bezeichnungen und Herkunft vorgestellt. Die Angaben wurden den Chemical Abstracts und den Veröffentlichungen von Musajo und Rodighiero 1962, Soine 1964, Zaynoun et al. 1977 und Naganuma et al. 1985 entnommen.

1.3.1.1 Psoralen



CAS-Nr. 66-97-7

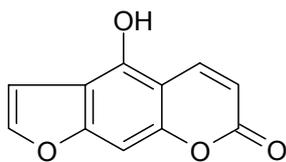
7H-Furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on

Furocumarin, Ficusin

Pflanzeninhaltsstoff

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: ++++

1.3.1.2 Bergaptol



CAS-Nr. 486-60-2

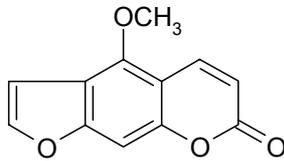
4-Hydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on

5-Hydroxypsoralen

Pflanzeninhaltsstoff

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: -

1.3.1.3 Bergapten



CAS-Nr. 484-20-8

4-Methoxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on

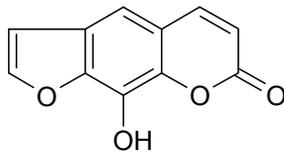
5-Methoxypsoralen, 5-MOP, Geralen, Heraclin, Majudin

Pflanzeninhaltsstoff

PUVA-Therapeutikum (Psoraderm®)

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: ++

1.3.1.4 Xanthotoxol



CAS-Nr. 2009-24-7

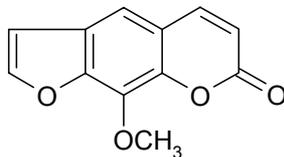
9-Hydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on

8-Hydroxypsoralen

Pflanzeninhaltsstoff

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: -

1.3.1.5 Xanthotoxin



CAS-Nr. 298-81-7

9-Methoxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on

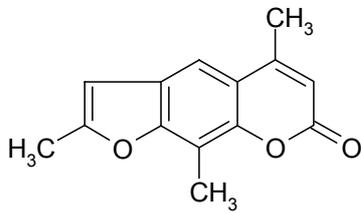
8-Methoxypsoralen, 8-MOP, Methoxsalen, Ammoidin

Pflanzeninhaltsstoff

PUVA-Therapeutikum (Meladinine®, Geroxalen®, Meloxine®, Oxsoralen®, Uvadex®)

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: +++

1.3.1.6 Trioxsalen



CAS-Nr. 3902-71-4

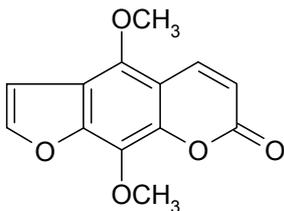
2,5,9-Trimethyl-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

4,5',8-Trimethylpsoralen

Synthetikum

PUVA-Therapeutikum (Trisoralen[®], Tripsor[®], Puvadin[®])Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: ++++

1.3.1.7 Isopimpinellin



CAS-Nr. 482-27-9

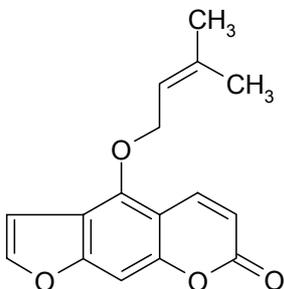
4,9-Dimethoxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

5,8-Dimethoxypsoralen

Pflanzeninhaltsstoff

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: -

1.3.1.8 Imperatorin



CAS-Nr. 482-44-0

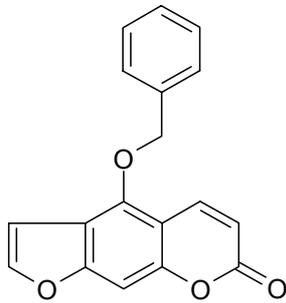
9-[(3-Methyl-2-butenyl)oxy]-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

8-Isoamylendioxy-psoralen, Marmelosin

Pflanzeninhaltsstoff

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: -

1.3.1.9 5-Benzyloxypsoralen



CAS-Nr.109559-62-8

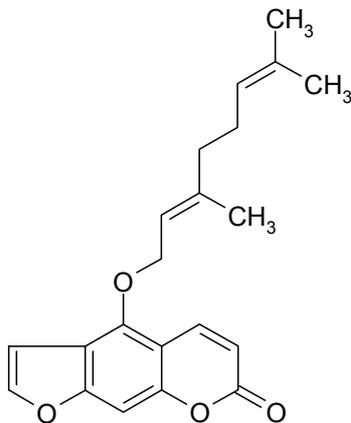
4-(Phenylmethoxy)-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

5-BOP

Synthetikum

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: -

1.3.1.10 Bergamottin



CAS-Nr. 7380-40-7

4-[[[(2*E*)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl]oxy]-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

5-Gerinoxypsoralen, 5-GOP, Bergaptin

Pflanzeninhaltsstoff

Photosensibilisierende Aktivität *in vivo*: -

1.3.2 Phytophotodermatitis

Eine Phytophotodermatitis ist eine Hautreaktion, die durch Sonnenlicht nach Kontakt mit Pflanzenmaterialien ausgelöst wird (Finkelstein et al. 1994). Pflanzenextrakte werden zunehmend bei der Herstellung von Kosmetika, Pflegeprodukten und anderen dermatologischen Externa verwendet und können ein Photosensibilisierungspotenzial aufweisen. Die Furocumarine gehören zu der

Gruppe der wichtigsten pflanzlichen Photosensibilisatoren (Schempp et al. 2002). Eine Auswahl photosensibilisierender Pflanzen ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

<i>Stoffklasse</i>	<i>Pflanzenfamilie</i>	<i>Pflanzenart</i>
Psoralene	Apiaceae	<i>Ammi majus</i> (Knorpelmöhre)
		<i>Angelica archangelica</i> (Engelwurz)
		<i>Apium graveolens</i> (Sellerie)
		<i>Daucus carota</i> (Karotte)
		<i>Foeniculum vulgare</i> (Fenchel)
		Heracleum-Arten (Bärenklau)
		<i>Pastinaca sativa</i> (Pastinak)
		<i>Petroselinum crispum</i> (Petersilie)
		<i>Peucedanum ostruthium</i> (Meisterwurz)
	Fabaceae	<i>Psoralea corylifolia</i>
	Moraceae	<i>Ficus carica</i> (Feigenbaum)
	Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i> (Limone)
		<i>Citrus aurantium</i> (Pomeranze)
<i>Citrus bergamia</i> (Bergamotte)		
<i>Citrus limon</i> (Zitrone)		
<i>Citrus paradise</i> (Grapefruit)		
<i>Citrus sinensis</i> (Apfelsine)		
<i>Dictamnus alba</i> (Diptam)		
<i>Pelea anisata</i> (hawaiischer Mokihanabaum)		
<i>Ruta graveolens</i> (Gartenraute)		
Furochinoline	Rutaceae	<i>Dictamnus alba</i> (Diptam)
		<i>Ruta graveolens</i> (Gartenraute)
Naphthodianthrone	Hypericaceae	<i>Hypericum perforatum</i> (Johanniskraut)
	Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i> (Buchweizen)

Tabelle 1.1 Photosensibilisierende Pflanzen (nach Roth 1988, Bowers 1999 und Schempp et al. 2002)

Die photosensibilisierenden Substanzen können auf verschiedenen Wegen in die Haut gelangen. Phytophotodermatiden werden u. a. durch Hautkontakt mit Pflanzen oder Pflanzenteilen verursacht. Die Exposition kann in der Natur durch unbeabsichtigtes Berühren oder beim Ernten oder Verarbeiten von Karotten bzw. Sellerie, der mit dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* infiziert ist, erfolgen (Finkelstein et al. 1994, Schempp 2002). Häufig werden Phytophotodermatiden durch den Kontakt mit der Gartenraute und einigen Bärenklau-Arten (Abbildungen 1.8 und 1.9)

hervorgerufen (Heskel et al. 1983, Kavli et al. 1983, Kavli et al. 1984, Lagey et al. 1995, Bowers 1999, Wessner et al. 1999). Die berühmte Berloque dermatitis zeigt sich nach Gebrauch von Bergamottöl-haltigem Kölnischwasser (Bowers 1999).



Abbildung 1.8

Ruta graveolens (Zeichnung Anne Zager)



Abbildung 1.9 Heracleum mantegazzianum (Zeichnung Anne Zager)

Möglich sind auch Photosensibilisierungen, die durch Zufuhr von Furocumarinen mit der Nahrung ausgelöst werden. Eine Rolle spielt der Verzehr von gelagertem Gemüse wie Sellerie und Petersilie. Während der Lagerung können größere Mengen an Furocumarinen gebildet werden. Die Aufnahme von Furocumarinen aus Pastinak und Citrus-Likören dürfte vernachlässigbar klein sein, da die Verzehrsmengen sehr gering sind (Schlatter 1988). Eine Übersicht zu dem Vorkommen und dem Gehalt verschiedener Furocumarine in Pflanzen ist von Bourgaud et al. 1989 erstellt worden.

2 Photosensibilisierung

Einige endogene und exogene Verbindungen, die sogenannten Photosensibilisatoren, erhöhen die Empfindlichkeit der Haut gegenüber Sonnenlicht und verursachen Hautreaktionen nach der Exposition einer Strahlungsdosis, die ansonsten keine Konsequenzen auslöst (Epstein 1999, Yashar und Lim 2003, Lehmann 2004). Die Photosensibilisierung ist damit in den Bereich der heliotropen Dermatosen (Lichtdermatosen, Photodermatosen) einzugliedern. Eine Auswahl von heliotrop induzierten Hautreaktionen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

<i>Verlauf</i>	<i>Hautreaktionen</i>
akut	Sonnenbrand Pigmentierung Lichtschwiele Immunsuppression
chronisch	Elastose (Altershaut, Landmannshaut, Freizeithaut) scheckige Hyper- und Hypopigmentierung Präkanzerosen (aktinische Keratose, Lentigo maligna) Malignome (Basalzellkarzinom, spinozelluläres Karzinom, Lentigo maligna-Melanom)

Tabelle 2.1 Sonneninduzierte Reaktionen an normaler Haut (nach Lehmann 2004)

Bei den primären Lichtdermatosen (Tabelle 2.2) ist die elektromagnetische Strahlung (Licht) der entscheidende pathogenetische Faktor.

<i>Idiopathisch</i>	<i>Mit bekanntem Photosensibilisator</i>
Lichturtikaria (Urticaria solaris)	Photosensibilisierung (Photoirritation, Photoallergie, Photokarzinogenität)
Polymorphe Lichtdermatose (PMLD)	Chronisch aktinische Dermatitis (CAD)
Hydroa vacciniformia	
Aktinische Prurigo	

Tabelle 2.2 Primäre Lichtdermatosen (nach Lehmann 2004)

Weiterhin existieren sekundäre Lichtdermatosen (Tabelle 2.3), die zwar durch Sonnenstrahlung induziert werden, jedoch grundsätzlich eine andere Genese haben. Die Entstehung beruht z. B. auf Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses), Stoffwechselerkrankungen (Porphyrien, Pellagra) und Enzymdefekten (Xeroderma pigmentosum).

Lupus erythematoses	Porphyrien
Pellagra	Muzinosen
Blasenbildende Autoimmundermatosen	Xeroderma pigmentosum
Dykeratosis follicularis (Morbus Darier)	Herpes simplex

Tabelle 2.3 Sekundäre Lichtdermatosen (nach Lehmann 2004)

Die Diagnostik dieser Lichtdermatosen umfasst mehrere Stufen. Als erstes wird im Rahmen der Anamnese die Krankengeschichte des Patienten abgefragt. Es müssen das Alter des Patienten bei dem ersten Auftreten, die Exposition gegenüber Photosensibilisatoren, das Intervall zwischen Sonnenexposition und Auftreten der Schädigungen, die Dauer des Hautausschlags, saisonale Erscheinungsformen, Hautreaktionen auch hinter Fensterglas, familiäre Faktoren und andere Erkrankungen berücksichtigt werden. Daran schließen sich physische Untersuchungen, Bestimmung der minimalen Erythem-Dosis (MED) im Rahmen eines Phototests, Durchführung von Photopatch-Tests (belichtete Epikutantests), Blutuntersuchungen und Probennahmen von Hautstücken für die Histopathologie an. In der Regel ist aus den Ergebnissen die Art der Lichtdermatose erkennbar (Yashar und Lim 2003).

2.1 Klassifizierung der Photosensibilisierung

Die Photosensibilisierung durch photoaktive Substanzen wird in verschiedene klinische Kategorien eingeteilt.

Werden zelluläre Bestandteile angegriffen und geschädigt, so resultieren phototoxische Reaktionen. Als Photoirritation bezeichnet man eine akute phototoxische Reaktion, die durch einen Photosensibilisator hervorgerufen wird. Unter Photokarzinogenität versteht man die Eigenschaft einer Substanz, längerfristig in Kombination mit Licht Hauttumore auszulösen. Photoirritation und Photokarzinogenität werden sowohl durch dermal als auch durch systemisch verwendete Photosensibilisatoren verursacht (Anon. 2002). Werden die beiden Erscheinungsformen *in vitro* untersucht, so bestimmt man die Photozytotoxizität als Maß für die Photoirritation und die Photogenotoxizität als Maß für die Photokarzinogenität (Spielmann et al. 2000).

Bildet sich ein Photoaddukt aus einem Protein und einem Photosensibilisator und schließt sich eine Sensibilisierung an, so folgt nach erneuter Exposition gegenüber dem Photosensibilisator und Licht eine photoallergische Reaktion (Spielmann et al. 2000). Durch immunologische Prozesse werden dabei Hautzellen indirekt geschädigt. Wird der Photosensibilisator dermal appliziert, handelt es sich um eine Photokontaktallergie, nach einer enteralen oder parenteralen Aufnahme des Photosensibilisators spricht man von einer hämatogenen Photoallergie (Lehmann 2004).

<i>Photoallergie</i>	<i>Photoirritation</i>
klinischer Gesamtaspekt: Ekzem	klinischer Gesamtaspekt: Sonnenbrand
selten	häufig
persistierende Lichtreaktion möglich	keine persistierenden Lichtreaktionen
vorhergehende Sensibilisierung	Reaktion auch bei Erstkontakt
Kreuzreaktionen	keine Kreuzreaktionen
niedrige Auslösungskonzentrationen	hohe Auslösungskonzentrationen

Tabelle 2.4

Photoallergische und photoirritative Reaktionen im Vergleich (nach Häberle et al. 1998)

Photoallergische und photoirritative Reaktionen unterscheiden sich in einer Reihe von Eigenschaften (Tabelle 2.4). Zur Differentialdiagnostik bedient man sich den unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern (Tabelle 2.5). Wenn über einen längeren Zeitraum die Haut durch phototoxische Reaktionen geschädigt wird, so resultieren die Hautbilder (Tabelle 2.1), die auch bei chronischer Belastung mit Sonnenlicht hervorgerufen werden (Lehmann et al. 2004).

<i>Hautreaktion</i>	<i>Photoallergie</i>	<i>Photoirritation</i>
Erythem	+	+++
Ödem	+++	+
Papel	+	-
Papulovesikel	++	-
Blasen	+	(+)

Tabelle 2.5 Klinische Erscheinungsbilder von photoallergischen und photoirritativen Reaktionen (nach Häberle et al. 1998)

Im Rahmen von photokarzinogenen Prozessen treten mindestens drei verschiedene Krebsarten mit jeweiligen charakteristischen Erscheinungsformen auf (Stern 1998): nicht-melanomartige Hautkarzinome (Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome), bösartige Melanome und nicht-kutane Karzinome (z. B. Lymphome).

2.2 Vorkommen von Photosensibilisatoren

Menschen können sich prinzipiell in allen Lebensbereichen (Haushalt, Arbeit, Wellness, Medizin) Photosensibilisatoren aussetzen (Tabelle 2.6).

<i>Haushalt</i>	<i>Arbeit</i>
Desinfektionsstoffe (halogenierte Salicylanilide, Bithionol, Hexachlorophen)	Farbstoffe (Benzanthron, Dispers Blau 35)
Holzkonservierungsmittel	Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (Steinkohlenteer, Holzkonservierungsmittel, Anthracen)
Gemüse (Sellerie, Pastinak)	Pflanzen (Riesenbärenklau)
	Druckerschwärze
<i>Wellness</i>	<i>Medizin</i>
Pflanzen (Riesenbärenklau, Gartenraute, Feige)	Antibiotika (Tetracycline, Sulfonamide, Chinolone)
Parfum & Kosmetika (Bergamottöl, Moschus, 6-Methylcumarin)	Psychopharmaka (Phenothiazine)
Sonnenschutzmittel (p-Aminobenzoessäure, Ethoxyethyl-p-methoxycinnamat, Isopropyl-dibenzoylmethan)	Diuretika (Chlorothiazid, Furosemid)
Tatoos (Cadmiumsulfid)	Herz-Kreislauf-Mittel (Amiodaron, Chinidin, Propranolol)
Zigarettenrauch (Placzek et al. 2004)	NSAR (Ibuprofen, Naproxen, Piroxicam)
	PUVA (5-MOP, 8-MOP, Trioxsalen)
	Photodynamische Therapie (PDT)

Tabelle 2.6 Vorkommen von Photosensibilisatoren (nach Johnson 1992)

Neben diesen exogen zugeführten Verbindungen können auch endogene Verbindungen Photosensibilisierungsreaktionen auslösen. Beispiele dafür sind anormale Metabolite wie Uroporphyrin und Coproporphyrin und normale Metabolite wie Protoporphyrin, Bilirubin, Kynurensäure und Riboflavin, die im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen, z. B. den Porphyrinen, unverhältnismäßig viel gebildet werden (Johnson 1992). Diese Verbindungen werden in der Regel alle durch UVA-Strahlung bzw. sichtbares Licht angeregt. Ein weiterer wichtiger endogener Chromophor, der im Gegensatz zu den oben aufgeführten durch UVB-Strahlung angeregt wird, ist die DNA. Unter UVB-Bestrahlung reagieren benachbarte Thymin-Basen zu Cyclobutandimeren und Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukten

(Abbildung 2.1). Ebenfalls bilden sich reaktive Sauerstoff-Spezies wie Hydroxylradikale oder Singulett-Sauerstoff, die verschiedene Schädigungen in der DNA auslösen können. Diese Reaktionen wirken an der Entstehung von Hautkrebs und von Hautalterungsprozessen mit (Ichihashi et al. 2003, Brendler-Schwaab et al. 2004).

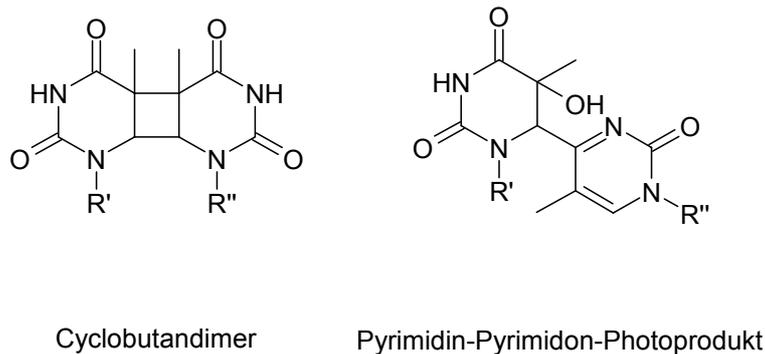


Abbildung 2.1 Reaktionsprodukte aus Thymin-Basen und UVB-Strahlung (nach Ichihashi et al. 2003)

Die Photosensibilisierung durch Arzneistoffe belegt einen signifikant wichtigen Anteil der Gesamthäufigkeit aller heliotropen Erkrankungen. Obwohl sie nur einen Typus der vielen möglichen Photodermatosen repräsentiert, ist die Inzidenz laut Ferguson 2002 mit 7% aller diagnostizierten Photodermatosen sehr hoch. Darüber hinaus ordnen viele Patienten die Sonnenbrand-ähnlichen Symptome ursächlich nicht den jeweiligen Arzneimitteln zu und schildern sie deswegen nicht gegenüber Ärzten oder Apothekern (Moore 2002). Aufgrund der zunehmenden Zahl an photosensibilisierenden Arzneistoffen (Abbildung 2.2) und der stärkeren Belastung der Haut mit UV-Strahlung (Kapitel 2.4), kann man abschätzen, dass das Risiko einer Arzneimittel-ausgelösten Photosensibilisierung in den letzten Jahren zugenommen hat.

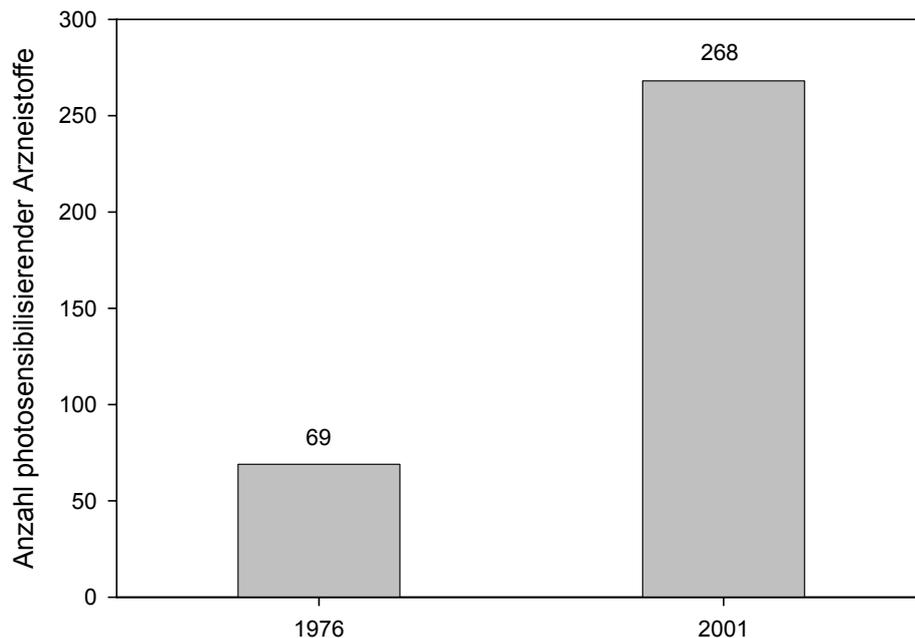


Abbildung 2.2 Vergleich der Anzahl photosensibilisierender Arzneistoffe 1976 und 2001 (nach Magnus 1976 und Litt 2001)

In Tabelle 2.7 sind Arzneistoffe aufgeführt, bei denen phototoxische Reaktionen nachweisbar sind. Photoallergien treten im Vergleich zu phototoxischen Reaktionen grundsätzlich seltener auf. Eine Reihe von Chemikalien, die Photoallergien auslösen können, ist in Tabelle 2.8 dargestellt. Bis heute ist 8-MOP die einzige bekannte Substanz, für die photokarzinogene Eigenschaften beim Menschen gesichert nachweisbar sind. Wenn im Rahmen einer PUVA-Therapie (Kapitel 2.5.1) große Dosen von 8-MOP und UVA-Strahlung über mehrere Jahre appliziert werden, so ergibt sich ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Basalzellkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und Melanomen. Einige Verbindungen, bei denen *in vitro* photogenotoxische Eigenschaften feststellbar sind, stehen unter dem Verdacht, ebenfalls unter Bestrahlung Hautkrebs auszulösen (Brendler-Schwaab et al. 2004).

Im Gegensatz zu der als Nebenwirkung unerwünschten Hautreaktion von vielen Arzneistoffen nach Sonnenlichtexposition versucht man bei der Photodynamischen Therapie (PDT) und der Psoralen-UVA-Photochemotherapie (PUVA) Photosensibilisierungsreaktionen gezielt einzusetzen, um bestimmte Krankheiten zu heilen bzw. deren Symptome zu lindern (Luksiene 2003, Dalla Via und Magno 2001, Bethea et al. 1999).

Acetazolamid	Diclofenac	Indapamid	Promethazin
Acetohexamid	Diflunisal	Interferon beta	Propiomazin
Afloqualon	Diltiazem	Isoniazid	Prothipendyl
Alimemazin	Dimetotiazin	Isothipendyl	Protriptylin
Alprazolam	Diphenhydramin	Isotretinoin	Pyrazinamid
Amilorid	Dosulepin	Ketoprofen	Risperidon
Amiodaron	Doxepin	Levofloxacin	Rufloxacin
Amitriptylin	Doxycyclin	Levomepromazin	Secobarbital
Amobarbital	Enalapril	Lomefloxacin	Sertralin
Amodiaquine	Enoxacin	Loxapin	Sitafloxacin
Amoxapin	Etretinat	Maprotilin	Sparfloxacin
Bendroflumethiazid	Felbamat	Mefloquin	Sulfadiazin
Benzthiazid	Felodipin	Mepacrin	Sulfafurazol
Benzydamin	Fenofibrat	Mequitazin	Sulfamethoxazol
Bithionol	Fenticlor	Methazolamid	Sulfanilamid
Bromchlorsalicylanilid	Flecainid	Methdilazin	Sulfasalazin
Buclosamid	Fleroxacin	Methotrexat	Suprofen
Captopril	Floxuridin	Methyldopa	Terfenadin
Carbamazepin	Fluorouracil	Metolazon	Tetrachlorsalicylanilid
Carbutamid	Fluoxetin	Minocyclin	Tetracyclin
Carprofen	Fluphenazin	Nabumeton	Thiazinamium
Chinidin	Flutamid	Nalidixinsäure	Thiethylperazin
Chinin	Furosemid	Naproxen	Thiopropazat
Chlordiazepoxid	Glibenclamid	Nifedipin	Thiopropazin
Chloroquin	Glibornurid	Norfloxacin	Thioridazin
Chlorothiazid	Gliclazid	Nortriptylin	Tiaprofensäure
Chlorpromazin	Glimepirid	Ofloxacin	Tiothixen
Chlorpropamid	Glipizid	Orbifloxacin	Tolazamid
Chlorprothixen	Gliquidon	Oxomemazin	Tolbutamid
Chlortalidon	Glisentid	Oxytetracyclin	Tolmetin
Chlortetracyclin	Glisolamid	Paroxetin	Trazodon
Ciprofloxacin	Glisoxyepid	Pentobarbital	Tretinoin
Clinafloxacin	Glycyclamid	Perazin	Triamteren
Clofazimin	Grepafloxacin	Periciazin	Trichlormethiazid
Clofibrat	Griseofulvin	Perphenazin	Triclosan
Clomipramin	Haloperidol	Phenothiazin	Trifluoperazin
Clozapin	Hexachlorophen	Phenylbutazon	Triflupromazin
Dacarbazin	Hydralazin	Phenytoin	Trimethoprim
Dantrolen	Hydrochlorothiazid	Piroxicam	Tripelennamin
Dapson	Hydroflumethiazid	Polythiazid	Trovafoxacin
Demeclocyclin	Hydroxychloroquin	Prochlorperazin	Valproinsäure
Desipramin	Imipramin	Promazin	Vinblastin

Tabelle 2.7

Phototoxische Arzneistoffe (Auswahl nach Quintero und Miranda 2000, modifiziert nach Pharmazeutischer Stoffliste, 14. Auflage 2004, ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn)

Bithionol	Hexachlorophen	Perubalsam
Buclosamid	Ketoprofen	Promethazin
Carprofen	6-Methylcumarin	Sulfanilamid
Chlorhexidin	Moschus	Suprofen
Chlorpromazin	p-Aminobenzoessäure	Tetrachlorsalicylanilid
Fenticlor	Parsol® 1789	Triclosan

Tabelle 2.8

Photoallergische Chemikalien (Auswahl nach Spielmann et al. 2000, Lovell und Jones 2000, Tokura 2003)

2.3 Mechanismus der Photosensibilisierung

Gemäß dem ersten Gesetz der Photochemie von Grotthus und Draper erfordert die Photosensibilisierung als photochemische Reaktion zunächst die Absorption von Photonen (Abbildung 2.3). Am häufigsten ist der UVA-Anteil des Sonnenlichts für Photosensibilisierungsreaktionen verantwortlich, danach folgen das sichtbare Licht und die UVB-Strahlung. Mit der Absorption verbunden ist der Übergang vom Singulett-Grundzustand in den angeregten Singulett-Zustand, aus dem prinzipiell auch photochemische Reaktionen ablaufen können. Da der angeregte Singulett-Zustand im Regelfall jedoch sehr kurzlebig ist (10^{-9} bis 10^{-6} Sekunden), finden die meisten Photosensibilisierungsreaktionen nach Quantenspinumkehr aus dem längerlebigen Triplett-Zustand (10^{-3} Sekunden) statt. Die durch Absorption aufgenommene Energie kann auch durch strahlungslose Deaktivierung, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz abgegeben werden (Johnson 1992).

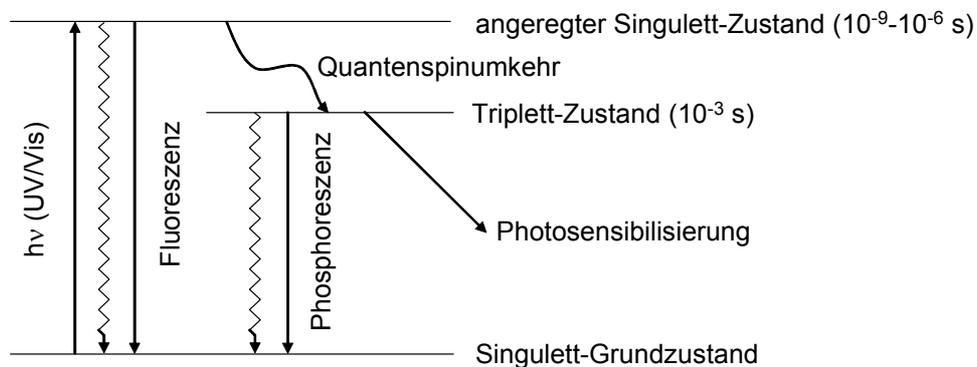


Abbildung 2.3 Termschema der Photosensibilisierung (strahlungslose Deaktivierung durch gezackte Pfeile dargestellt, modifiziert nach Johnson 1992)

Es können aus dem Triplett-Zustand verschiedene Reaktionen ablaufen, die deutlich differenzierte Mechanismen zeigen (Abbildung 2.4). Photodynamische Reaktionen sind die in der Regel in Anwesenheit von Sauerstoff ablaufenden Prozesse, bei denen sich ein Photosensibilisatormolekül als Katalysator verhält und nach der Energieabgabe auf andere Moleküle in den Singulett-Grundzustand zurückkehrt. Anschließend steht es erneut für die Absorption von Photonen zur Verfügung und kann weitere Photoreaktionen auslösen (Johnson 1992).

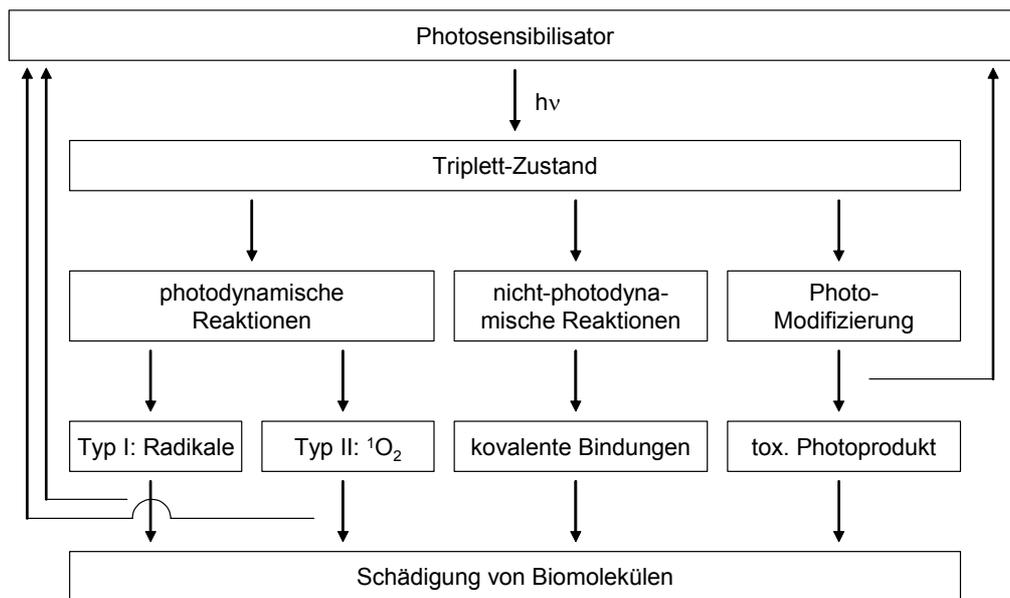


Abbildung 2.4 Mechanismen der für die Photosensibilisierung verantwortlichen Reaktionen (modifiziert nach Spielmann et al. 2000)

Katalysiert der Photosensibilisator im Triplett-Zustand Elektronentransfer-Reaktionen unter Entstehung von Radikalen und deren Abkömmlingen (Superoxidradikal-anionen, Hydroperoxidradikale, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale), so handelt es sich um Typ I-Reaktionen. Überträgt der Photosensibilisator die zusätzliche Energie des Triplett-Zustands auf molekularen Triplett-Sauerstoff (3O_2), so geht Sauerstoff in den angeregten Singulett-Zustand (1O_2) über. Man spricht dann von den sogenannten Typ II-Reaktionen (Foote 1991, Johnson 1992, Spielmann et al. 2000). Die gebildeten Radikale und Singulett-Sauerstoff reagieren mit endogenen Biomolekülen und lösen somit Schädigungen aus (siehe Kapitel 6.1 und 6.2).

Wird ein Photosensibilisatormolekül innerhalb einer photochemischen Reaktion mit Biomolekülen stöchiometrisch unter Ausbildung von kovalenten Bindungen verbraucht, ordnet man diesen Prozess den nicht-photodynamischen Reaktionen zu. Außerdem können Photomodifizierungen des Photosensibilisatormoleküls z. B. durch Reaktion mit Wasser oder Sauerstoff ablaufen. In beiden Fällen können die resultierenden Reaktionsprodukte toxische oder phototoxische Eigenschaften aufweisen (Spielmann et al. 2000).

Die Reaktionen, die zur Photosensibilisierung der Haut führen, können natürlich auch nach anderen Kriterien unterteilt werden, so z. B. nach den angegriffenen Biomolekülen oder dem Ort der Schädigung (Abbildung 2.5).

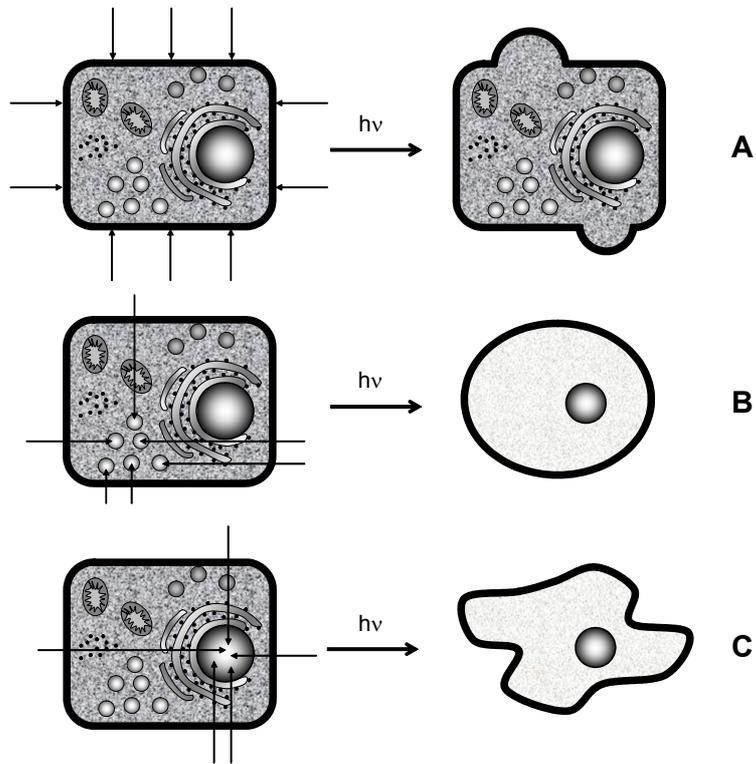


Abbildung 2.5

Nach Allison et al. 1966 und Johnson 1984 modifizierte schematische Darstellung der zellulären Hauptangriffspunkte für Photosensibilisatoren und der morphologischen Veränderungen nach Bestrahlung: Schaden an Zellmembran (A), Lysosomen (B) und DNA innerhalb des Zellkerns (C)

2.4 Sonnenstrahlung

Licht stellt einen Teilbereich des elektromagnetischen Spektrums dar (Tabelle 2.9). Nach strikter Definition besteht Licht nur aus dem für das menschliche Auge sichtbaren Anteil der elektromagnetischen Strahlung (Grossweiner 1989). Das terrestrische Sonnenspektrum setzt sich aus einem kleinen Teil der elektromagnetischen Strahlung zusammen (Abbildung 2.6). Wie erwähnt können UVB-Strahlung, UVA-Strahlung und sichtbares Licht in Kombination mit Chemikalien Photosensibilisierungsreaktionen auslösen. Am stärksten erzeugt UV-Strahlung bis 330 nm Erytheme (Sonnenbrand). Hautbräunung erfolgt durch maßvolle UV-Bestrahlung mit Wellenlängen oberhalb 330 nm (Kowalzik et al. 2000).

<i>Spektralbereich</i>	<i>Wellenlängenbereich</i>	<i>Energie eines Photons (eV)</i>
Mikrowellen	0,1 cm – 100 cm	$10^{-3} - 10^{-6}$
IRC	3 μm – 0,1 cm	$0,4 - 10^{-3}$
IRB	1,4 μm – 3 μm	0,9 – 0,4
IRA	0,76 μm – 1,4 μm	1,6 – 0,9
VIS	400 nm – 760 nm	3,1 – 1,6
UVA	320 nm – 400 nm	3,9 – 3,1
UVB	280 nm – 320 nm	4,4 – 3,9
UVC	100 nm – 280 nm	12,4 – 4,4
Vakuum-UV	10 nm – 100 nm	124 – 12,4
Röntgenstrahlung	10 pm – 10 nm	$10^5 - 10^2$
γ -Strahlung	0,1 pm – 10 pm	$10^7 - 10^5$

Tabelle 2.9 Spektralbereiche der elektromagnetischen Strahlung (nach Grossweiner 1989)

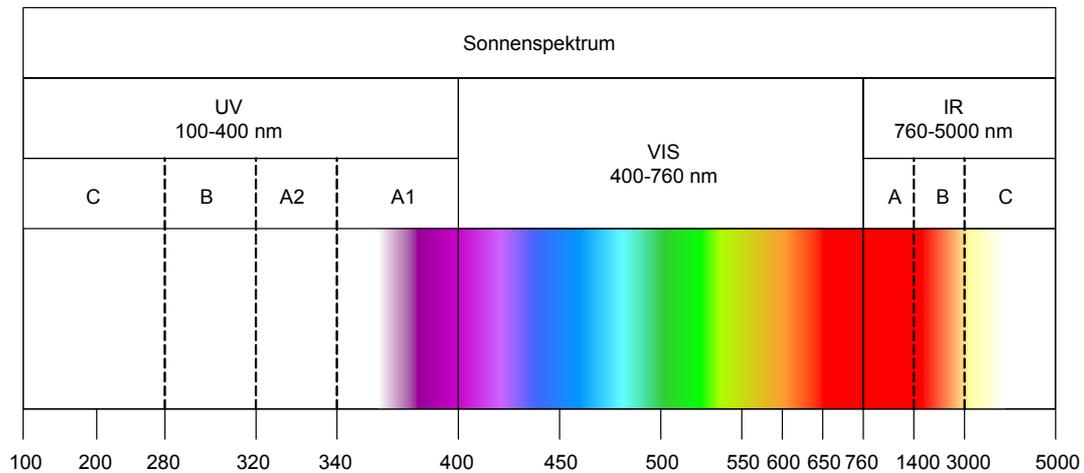


Abbildung 2.6 Spektralbereiche des terrestrischen Sonnenlichts (modifiziert nach Kowalzik et al. 2000)

Die Bestrahlungsstärke des Sonnenlichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Das terrestrische Spektrum ist von vielen Einflussgrößen wie Wetterlage, Tages- und Jahreszeit abhängig.

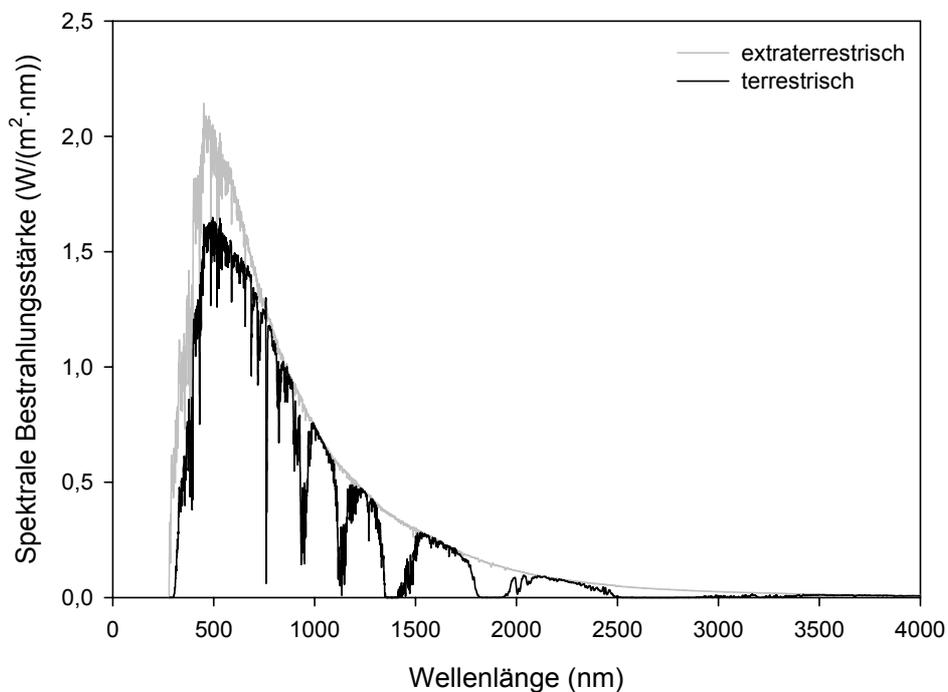


Abbildung 2.7 Extraterrestrisches und terrestrisches Sonnenspektrum (nach Daten der Referenzspektren ASTM G173-03 der „American Society for Testing and Materials“ 2004)

Am stärksten emittiert die Sonne Strahlung von ca. 500 nm, die vom Menschen als blau-grünes Licht wahrgenommen wird. Dies entspricht in etwa dem Wellenlängenbereich, in dem das menschliche Auge im Laufe der Evolution seine größte Empfindlichkeit entwickelt hat (Sandmann 2001).

Die Differenz zwischen dem extraterrestrischen und dem terrestrischen Spektrum wird durch Ozon und Sauerstoff in der Stratosphäre verursacht (Molina und Molina 1986). Dabei spielen Absorptions- und Streuungsprozesse eine Rolle. Die kumulativen Bestrahlungsstärken und der Anteil an der Gesamtstrahlung der verschiedenen Bereiche können Tabelle 2.10 entnommen werden. Ozon ist ein besonders effektiver UV-Filter. Es absorbiert UVC-, UVB- und schwach UVA-Strahlung und sorgt dafür, dass im Regelfall die stark schädigende UVC-Strahlung die Erdoberfläche nicht erreichen kann und die ebenfalls Beeinträchtigungen auslösende UVB-Strahlung zu über 90% reduziert wird (Sandmann 2001). Für den UV-Bereich ist dieser Zusammenhang in Abbildung 2.8 dargestellt. Man erkennt darin deutlich, dass ab ca. 320 nm das terrestrische und das extraterrestrische Spektrum einen parallelen Verlauf nehmen und dass auf der Erdoberfläche unterhalb von 290 nm durch die Ozonabsorption quasi keine Strahlung auftritt.

Strahlungsbereich	Extraterrestrisch		Terrestrisch	
	E (W/m^2)	Anteil (%)	E (W/m^2)	Anteil (%)
UVC	7,9	0,6	0,0	0,0
UVB	17,7	1,3	1,2	0,1
UVA	62,8	4,6	41,7	4,4
VIS	656,3	48,0		
IR	622,5	45,5	897,9	95,5
Gesamtstrahlung	1367,2	100,0	940,8	100,0

Tabelle 2.10

Verteilung der Bestrahlungsstärke (E) über die Spektralbereiche des Sonnenlichts (nach Sandmann 2001)

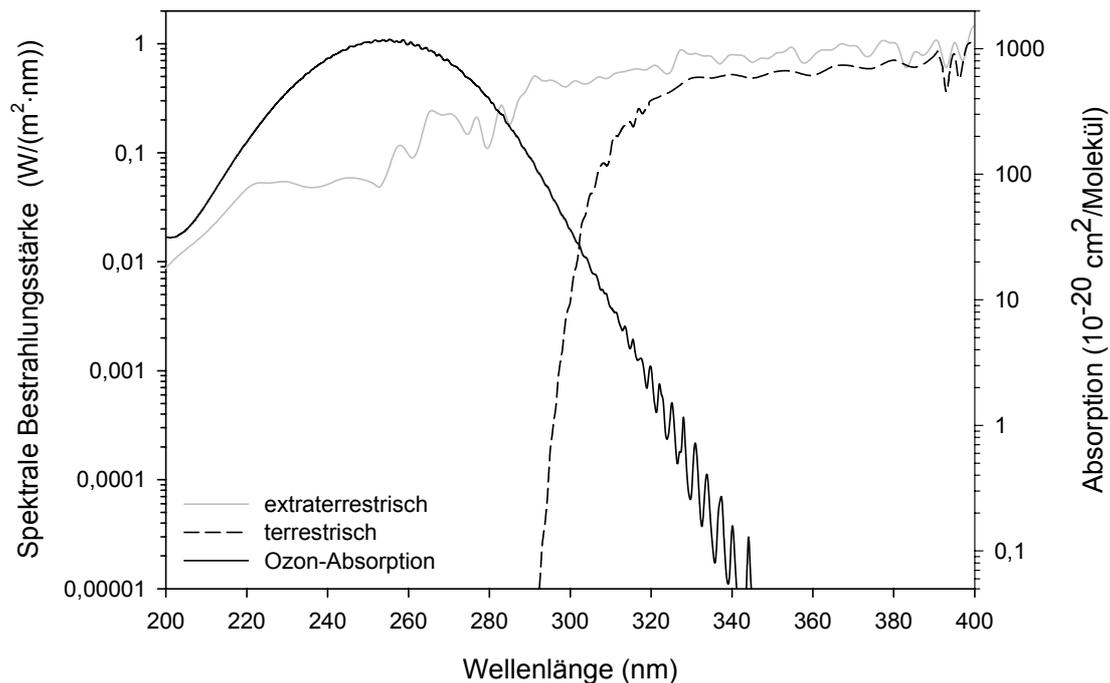


Abbildung 2.8 Absorptionskurve des Ozons und extraterrestrisches und terrestrisches Spektrum im Bereich zwischen 200 und 400 nm (nach Daten von Molina und Molina 1986 und Stick und Pielke 1997)

Problematisch in jeder Hinsicht ist die zunehmende Belastung des Menschen mit UV-Strahlung. Einige Folgen einer erhöhten Exposition gegenüber UV-Strahlung sind in Tabelle 2.11 zusammengefasst.

<i>Erhöhtes Risiko für</i>	<i>Ausgewählte Literaturstellen</i>
Hautkrebs	Urbach 1989, Amron und Moy 1991, Sandmann 2001, Abarca et al. 2002, de Gruijl et al. 2003, Hofmann-Aßmus 2004
Erythem (Sonnenbrand)	Stick und Pielke 1997, McKenzie et al. 1999, Reuder et al. 2001, Abarca et al. 2002, de Gruijl et al. 2003
Augenschäden	Urbach 1989, de Gruijl et al. 2003
Photosensibilisierung	Beggs 2000, Abarca et al. 2002

Tabelle 2.11 Konsequenzen erhöhter UV-Exposition

Das Erythem-Wirkungsspektrum erklärt das bei größerer UV-Belastung häufigere Auftreten von Erythemen (Abbildung 2.9).

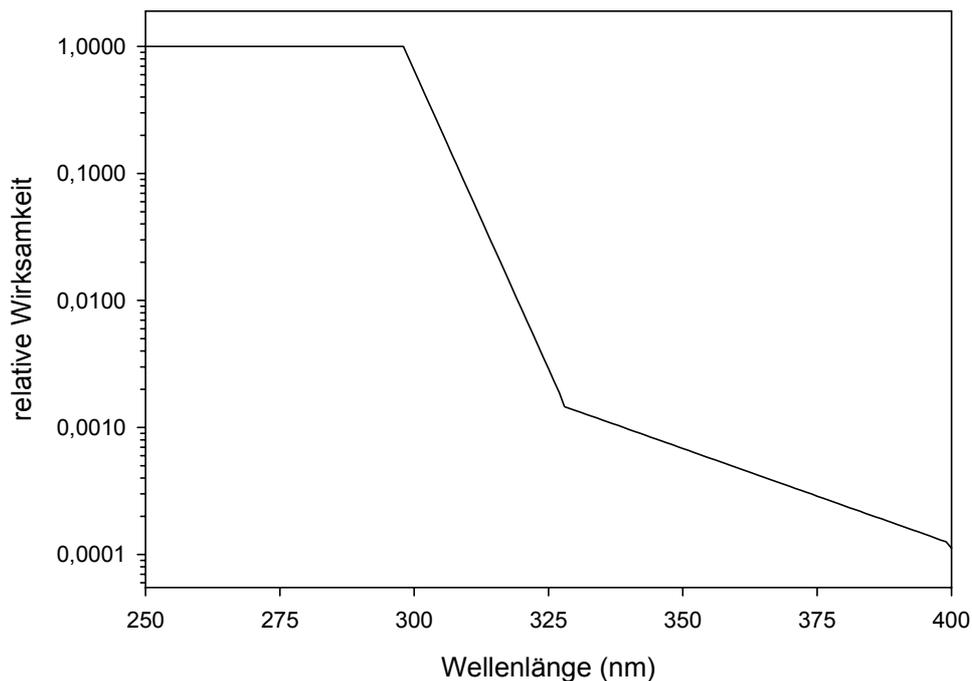


Abbildung 2.9 Erythem-Wirkungsspektrum (nach DIN 5031-10 2000 und Frederick et al. 1989)

Analog gilt der gleiche Zusammenhang für die Förderung von Hautkrebs durch UV-Strahlung, da das dazugehörige Wirkungsspektrum sehr dem des Erythems ähnelt (DIN 5031-10 2000).

Die verstärkte Exposition des Menschen gegenüber UV-Strahlung hat verschiedene Ursachen. In Deutschland hängt diese Zunahme nicht ausschließlich, wie allgemein angenommen, mit der Ausdünnung der Ozonschicht zusammen, sondern vielmehr wird sie durch ein geändertes Freizeitverhalten der Bevölkerung erklärt (Stick und Pielke 1997, Sandmann 2001). Die deutsche Bevölkerung setzt sich zunehmend länger und häufig ungeschützt der Sonne und somit erhöhten Dosen von UVB- und UVA-Strahlung aus. Oft wird der Haut auch in den Wintermonaten keine Gelegenheit zur Regeneration gegeben, da Solarien und Urlaubsziele mit hoher UV-Strahlung aufgesucht werden.

Der Schaden, der allein durch übermäßige UV-Exposition in den USA entsteht, wird mit ca. 1 Milliarde US-Dollar pro Jahr angegeben (Tabelle 2.12). Dieser Betrag soll bis 2010 auf mindestens 5 Milliarden US-Dollar ansteigen (Warthan et al. 2003).

<i>Diagnose</i>	<i>Jährliche Kosten in den USA</i>
nicht-melanomartige Karzinome	426.000.000,00 \$
Melanome	495.000.000,00 \$
Sonnenbrand	10.000.000,00 \$
Gesamt	931.000.000,00 \$

Tabelle 2.12 Kosten von Hauterkrankungen, die durch UV-Strahlung ausgelöst werden (nach Warthan et al. 2003)

Aufgrund des Ozonlochs über der Antarktis ergaben sich jedoch in Ländern der südlichen Hemisphäre, z. B. Australien, Neuseeland und Chile, deutliche Zunahmen der UV-Strahlung in den letzten Jahren (McKenzie et al. 1999, Abarca et al. 2002).

Beobachtungen ergaben, dass seit 1970 die UV-Strahlung auch auf der Erdoberfläche der nördlichen Hemisphäre zunimmt. Das gilt besonders für die durch das Ozon absorbierte UVB-Strahlung. Die Intensität der UVA-Strahlung hängt dagegen von den sonstigen meteorologischen Bedingungen ab (Frederick et al. 1989, Frederick et al. 1991, Reuder et al. 2001, Sandmann 2001). Nach Berechnungen wird die Belastung mit UV-Strahlung in Zentraleuropa bis 2015 im Frühjahr ansteigen und in den anderen Jahreszeiten gleich bleiben. 2050 soll sich die Stratosphäre in Bezug auf den Ozon-Gehalt regeneriert und den quasi unbeeinflussten Zustand von 1970 angenommen haben (Reuder et al. 2001).

2.5 Photosensibilisierung als therapeutischer Effekt

In Deutschland sind verschiedene Medikamente zugelassen, die therapeutisch erwünschte Effekte durch das Zusammenspiel eines Photosensibilisators mit Licht geeigneter Wellenlänge hervorrufen (Tabelle 2.13).

<i>Arzneimittel</i>	<i>Arzneistoff</i>	<i>Zugelassene Indikationen</i>
Meladinine [®]	8-MOP	PUVA-Therapie zur Behandlung spezieller Formen der Psoriasis und Vitiligo, der Mycosis fungoides und anderer kutaner T-Zell-Lymphome
Photofrin [®]	Porfimer-Natrium	PDT zur Behandlung von endobronchialen Frühkarzinomen, die chirurgisch oder radiotherapeutisch nicht zugänglich sind
Visudyne [®]	Verteporfin	PDT zur Behandlung spezieller Formen der altersbedingten Makuladegeneration
Metvix [®]	Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat)	PDT zur Behandlung spezieller Formen der aktinischen Keratose
Foscan [®]	Temoporfin	PDT zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen, die ansonsten nicht therapierbar sind

Tabelle 2.13 In Deutschland zugelassene therapeutisch eingesetzte Photosensibilisatoren (nach Fachinformationen des Jahres 2004)

Die Psoralen-UVA-Photochemotherapie (PUVA) ist eine mehrere tausend Jahre alte Behandlungsform. Sie wurde z. B. zur Behandlung der Vitiligo in Ägypten und Indien ab etwa 2000 vor Christus unter dermalen Applikation von Pflanzenextrakten der großen Knorpelmöhre (*Ammi majus*) bzw. der haselnussblättrigen Psoralea (*Psoralea corylifolia*) und anschließender Sonnenlichtexposition eingesetzt (Pathak und Fitzpatrick 1992).

Dem steht die Photodynamische Therapie (PDT) als eine vollständig neue Behandlungsform gegenüber, die erst am Anfang ihrer Entwicklung steht und deren Einsatzmöglichkeiten kaum beschränkt scheinen (Rowe 1998, McCaughan 1999, Luksiene 2003).

2.5.1 PUVA-Therapie

Bei der PUVA-Therapie werden Psoralene, wie z. B. 5-MOP, 8-MOP oder Trioxsalen, dermal oder systemisch verabreicht. Auf der Haut können die Psoralene mit Hilfe einer halbfesten Arzneiform (Creme, Lotion), einer speziellen Dusche oder einem Bad aufgebracht werden (Radenhausen et al. 1999, Kostovic et al. 2002). In Abhängigkeit von dem Hauttyp des Patienten werden die betroffenen Hautareale unterschiedlichen Strahlungsintensitäten ausgesetzt (McClelland et al. 1997). Neben den in Tabelle 2.13 aufgeführten Indikationen wurde und wird sie auch zur Behandlung vieler anderer Erkrankungen eingesetzt (Pathak und Fitzpatrick 1992).

Eine Repigmentierung der depigmentierten Hautstellen (Vitiligo) bzw. eine Reduktion der kutanen Hyperproliferation (Psoriasis) wird erreicht (McNeely und Goa 1998). Für die Wirkung ist die Photoaddition der Psoralene an Thyminbasen der DNA wichtig. Sie führt zur Ausbildung von Mono- und Diaddukten (siehe Kapitel 6.3). Auch andere Photoreaktionen sind an der Auslösung der verschiedenen biologischen Effekte beteiligt. In Abhängigkeit von der Psoralen- und der Strahlungsdosis können Nekrose, Apoptose und Zytostase auftreten. Im subletalen Bereich wird die Expression von bestimmten Genen induziert und die zelluläre Mikroumgebung durch geänderte Zelloberflächen oder Sekretion von Botenstoffen beeinflusst (Bethea et al. 1999).

Die Pathogenese der Vitiligo und der Psoriasis ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Njoo und Westerhof 2001, Travis und Weinberg 2002), obwohl wichtige Fortschritte erzielt wurden (Lebwohl 2003). Gleiches gilt auch für den genauen Wirkmechanismus der PUVA-Therapie (McNeely und Goa 1998, Bethea et al. 1999).

Klinisch eingeschränkt wird die PUVA-Therapie besonders durch das erhöhte Hautkrebsrisiko (Gasparro et al. 1998).

2.5.2 Extrakorporale Photopherese

Die Extrakorporale Photopherese („Extracorporeal Photopheresis“, ECP) ist eine Sonderform der PUVA-Therapie, die zur Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen eingesetzt wird. Im Gegensatz zur normalen PUVA-Therapie wird nach

der oralen Gabe von 8-MOP nicht die Haut bestrahlt, sondern der Patient bekommt ca. 1,5 l Blut abgenommen, das in drei Fraktionen aufgeteilt wird: Erythrozyten, Leukozyten und Plasma. Die Erythrozyten-Fraktion wird dem Patienten sofort zugeführt, die Plasma- und die Leukozyten-Fraktion erst nach Bestrahlung. Obwohl nur ein sehr geringer Anteil der malignen Leukozyten den Photoreaktionen mit 8-MOP ausgesetzt wird, kommt es zu einer Immunmodulation, die den pathogenen T-Zellklon wirkungsvoll unterdrückt. Diese Immunmodulation wird durch die Schädigung der pathologischen Lymphozyten ausgelöst. Es findet eine Induktion der Apoptose von T-Zellen und eine Aktivierung von Monozyten einschließlich Zytokin-Freisetzung statt. Studien belegen eine Ansprechrate von 50 bis 75% und eine Lebensverlängerung von Patienten mit fortgeschrittenem T-Zell-Lymphom. Ein Hauptvorteil der Photopherese gegenüber der normalen PUVA-Therapie ist die Vermeidung der Hautbestrahlung mit den damit verbundenen Nebenwirkungen. Weitere Erkrankungen können ebenfalls mit Hilfe der Extrakorporalen Photopherese behandelt werden (van Iperen und Beijersbergen van Henegouwen 1997, Oliven und Shechter 2001).

2.5.3 Photodynamische Therapie

Die Photodynamische Therapie ist eine vielversprechende Methode für die Behandlung von Krebs und vielen anderen Erkrankungen. Sie ist gegenüber Photochemotherapien mit Psoralenen durch das Zusammenspiel eines Photosensibilisators, Licht und Sauerstoff gekennzeichnet. Selektivität wird durch unterschiedliche Kumulation des Photosensibilisators in normalem und krankhaftem Gewebe und durch gezielte Bestrahlung des betroffenen Gewebes erreicht. Der Photosensibilisator wird in der Regel parenteral appliziert. In einem gewissen Abstand schließt sich die Bestrahlung an. Der Photosensibilisator erzeugt in Typ I- und Typ II-Reaktionen reaktive Sauerstoff-Spezies, die direkt die betroffenen Zellen schädigen (Nyman und Hynninen 2004). Eine Reihe von Anforderungen an einen idealen Photosensibilisator für die Photodynamische Therapie ist in Tabelle 2.14 aufgeführt.

chemische Reinheit	keine bzw. sehr geringe Dunkeltoxizität
hohe photochemische Aktivität	präferenzielle Aufnahme in Zielgewebe
Absorptionsbande bei hohen Wellenlängen (600-800 nm) mit großem Absorptionskoeffizienten	schnelle Elimination und damit geringe systemische Toxizität

Tabelle 2.14 Anforderungen an Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie (nach Sharman et al. 1999)

Die neuesten Entwicklungen bei der Suche nach idealen Photosensibilisatoren sind von Nyman und Hynninen 2004 zusammengefasst worden. Während Porfimer-Natrium (Abbildung 2.10) noch zu der ersten Generation der Photosensibilisatoren gehört (Sharman et al. 1999), bei der nur wenige der in Tabelle 2.14 aufgeführten Kriterien zutreffen, ordnet man die Verbindungen Verteporfin, Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) und Temoporfin (Abbildung 2.11) der zweiten Generation mit annähernd idealen Eigenschaften zu (Sharman et al. 1999).

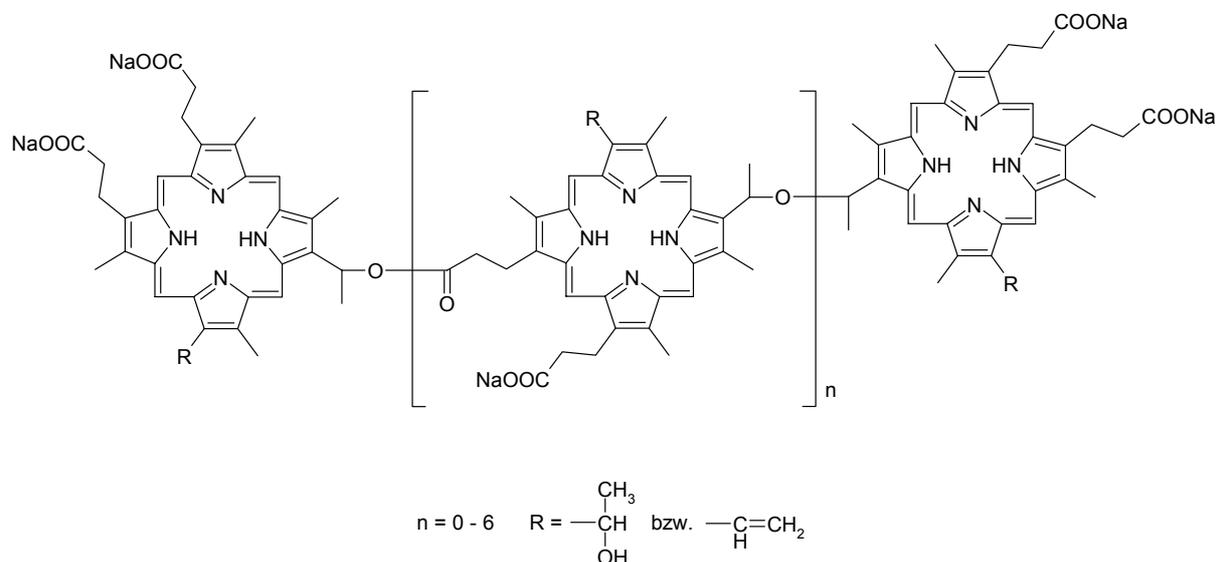


Abbildung 2.10 Porfimer-Natrium: Photosensibilisator der ersten Generation

Verteporfin wird zur Behandlung der feuchten altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt. Die dabei in die Netzhaut einwuchernden Blutgefäße werden selektiv durch die gesteigerte Aufnahme von Verteporfin-haltigen LDL-Partikeln und durch zielgerichtete Laserstrahlen (689 nm) geschädigt (Scott und Goa 2000).

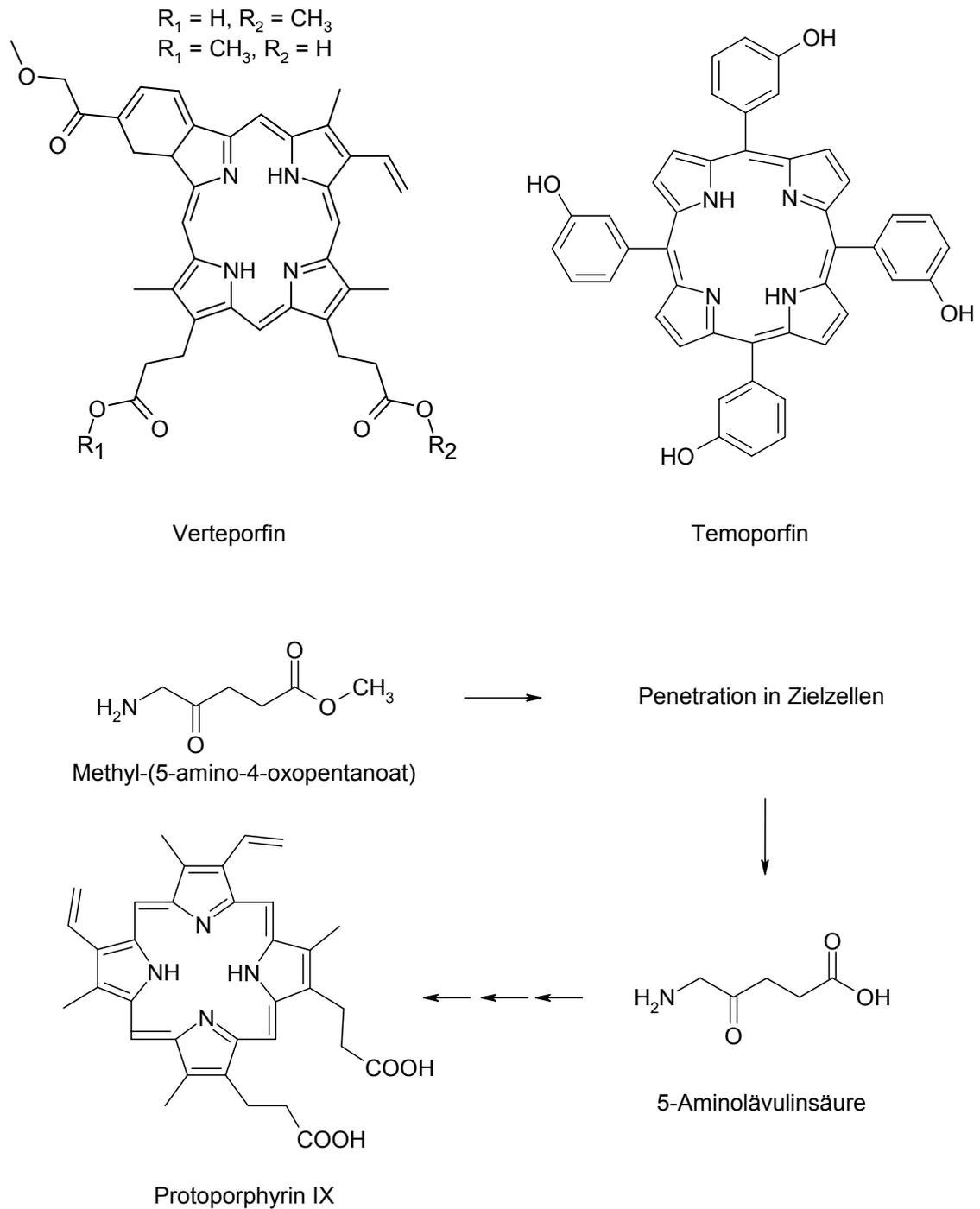


Abbildung 2.11 Photosensibilisatoren der zweiten Generation: Verteporfin, Temoporfin und Bioaktivierung des Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) zum photosensibilisierenden Protoporphyrin IX

Temoporfin ist wahrscheinlich eine der phototoxischsten Verbindungen, die derzeit eingesetzt werden. Im Vergleich zu Porfimer-Natrium ist es um den Faktor 100 photoaktiver (Sharman et al. 1999).

Eine Ausnahme stellt die Verbindung Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) dar. Sie ist ein dermal anzuwendendes Prodrug, das sich bevorzugt in Zellen, die bei aktinischer Keratose geschädigt sind, anreichert, dort zunächst zur Aminolävulinsäure und anschließend zur Wirkform Protoporphyrin IX metabolisiert wird. Die Bestrahlung erfolgt mit rotem Licht der Wellenlänge 630 nm (Wolf 2003).

2.6 Historische Aspekte der Photosensibilisierung

Schon um 410 vor Christus dokumentierte der griechische Feldherr Xenophan die Auslösung von Gesundheitsschäden durch Sonnenlicht. Er beobachtete bei seinen Soldaten die Schneeblindheit, eine starke Beeinträchtigung der Sehfunktion durch UV-Strahlung, als er auf einem Feldzug in Armenien durch tiefen Schnee zog.

In Ägypten und Indien war lange bekannt, dass auf der Haut aufgetragene Pflanzenextrakte in Kombination mit Sonnenlicht Blasenbildung und erhöhte Pigmentierung auslösen können. Um 1250 nach Christus schilderte Ibn El-Bitar in Ägypten diese Reaktionen sehr ausführlich.

Die Entdeckung des ultravioletten Lichts durch Ritter 1801 ermöglichte die 1858 von Charcot aufgestellte Erkenntnis, dass nicht Wärme sondern UV-Strahlung die Reaktionen in Haut und Augen auslöst. Dubreuilh, ein Hautarzt aus der Region um Bordeaux, bemerkte 1896, dass Hautkrebs besonders häufig an sonnenexponierten Hautarealen von Bauern und Winzern und kaum bei der Stadtbevölkerung auftrat. Raab erkannte 1899, dass auch sichtbares Licht Photosensibilisierung auslösen kann. Die Bestrahlung von Mikroorganismen, die sich in Lösungen von Fluoreszenzfarbstoffen befanden, führte zu deren Abtötung. Raab nannte diesen Vorgang photodynamische Reaktion. 1905 nutzten Jesionek und Tappeiner dieses Phänomen, um Basalzellkarzinome zu entfernen. Hausmann stellte 1908 heraus, dass auch endogene Substanzen, wie z. B. erhöhte Mengen an Porphyrinen, kutane Reaktionen hervorrufen können. Die Berloque dermatitis, eine sonnenlichtausgelöste Hautreaktion nach Gebrauch von Kölnischwasser, wurde von Freund 1916 beschrieben. Er identifizierte das Bergamottöl als die photoaktive Komponente.

Ab 1920 ließ der technische Fortschritt auch die Entwicklung von künstlichen UV-Quellen und damit reproduzierbare Experimente zu. Findlay wies 1928 in Tierexperimenten die Auslösung von Hautkrebs mit UV-Quecksilberdampflampen nach. Unter zusätzlicher dermaler Applikation bestimmter Stoffe erhöhte sich die Anzahl der Tumore deutlich.

Haxthausen und Hausmann bewiesen 1929, dass auch oral und parenteral gegebene Verbindungen Photosensibilisierungsreaktionen verursachen. Photoallergische Reaktionen durch Stoffe wurden zum ersten Mal 1939 von Epstein dokumentiert. El Mofty wendete 1948 als erster in der Neuzeit photosensibilisierende Pflanzenextrakte zur Behandlung der Vitiligo an. Ab 1950 nahmen schließlich die Photosensibilisierungsreaktionen, die durch Arzneimittel ausgelöst wurden, eindeutig zu. 1981 konnte Dougherty Hautkrebs und weitere oberflächliche Tumore, die für Licht zugänglich waren, mit Hämatoporphyrin im Rahmen einer Photodynamischen Therapie erfolgreich behandeln (Urbach 1998).

3 Arzneistoffentwicklung und Photosensibilisierung

Photosensibilisierung ist eine bedeutende Nebenwirkung vieler Arzneistoffe. Aufgrund phototoxischer Reaktionen wurde 1997 das Chinolon-Antibiotikum Sparfloxacin in der Schweiz vom Markt genommen. Die Entwicklung eines weiteren Chinolon-Antibiotikums, Clinafloxacin, wurde ebenfalls aufgrund phototoxischer Eigenschaften eingestellt (Schnyder und Caduff 2003). Damit im Rahmen einer Arzneistoffentwicklung Ressourcen und Kapital nicht sinnlos vergeudet werden, empfiehlt es sich, Arzneistoffe, die Sonnenlicht absorbieren und damit potenzielle Photosensibilisatoren darstellen, frühzeitig auf diese unerwünschte Wirkung zu testen (Spielmann et al. 2000). Analog zu anderen toxikologischen Untersuchungen können *in vivo*-, *in vitro*- und *in silico*-Testsysteme herangezogen werden (Holtzman 2000). Zur Bestimmung der Photosensibilisierung bieten sich *in vitro*-Modelle an, da diese grundsätzlich günstig, empfindlich und verlässlich sind (Miranda 1997) und die Ergebnisse, z. B. bei den Chinolon-Antibiotika, sehr gut mit den *in vivo*-Eigenschaften korrelieren (Zhang et al. 2003).

3.1 Regulatorische Anforderungen

Die Festlegung von Vorschriften und Vorgehensweisen zur Identifizierung und Bestimmung möglicher photosensibilisierender Eigenschaften von neuen Arzneistoffen ist ein aktueller Themenschwerpunkt der internationalen Arzneimittelzulassungsbehörden (Putman et al. 2003). In der Europäischen Union ist im Dezember 2002 die „Note for Guidance on Photosafety Testing“ in der Version vom Juni 2002 in Kraft getreten. In den USA ist die „Guidance for Industry - Photosafety Testing“ im Mai 2003 veröffentlicht worden. Die Richtlinien sind auf den Internetseiten der EMEA (www.emea.eu.int) und der FDA (www.fda.gov) abrufbar.

Beide Richtlinien besitzen die gleiche Zielsetzung, nämlich die Festlegung, wie neue Arzneistoffe, die für den Einsatz am Menschen entwickelt werden, in Hinblick auf mögliche Photosensibilisierungsreaktionen ausreichend getestet und beurteilt werden sollen. Um unnötige Kosten zu vermeiden, müssen jedoch nur die Arzneistoffe untersucht werden, die im Bereich zwischen 290 und 700 nm Licht absorbieren und die lokal auf der Haut appliziert werden bzw. nach systemischer

Aufnahme die Haut oder die Augen erreichen. Die Richtlinien unterteilen in drei klinisch relevante Kategorien: Photoirritation (akut toxische Hautreaktion), Photoallergie (durch Photoprodukte ausgelöste immunologische Reaktion) und Photokarzinogenität (Induktion von Hauttumoren).

3.1.1 Europäische Richtlinie

Wenn möglich, sollen gemäß Richtlinie des Rates 86/609/EWG vom 24. November 1986, zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, geeignete *in vitro*-Testsysteme zur Vermeidung von Tierversuchen verwendet werden.

Als Strahlungsquellen werden in der Regel Sonnensimulatoren eingesetzt, die keine UVC-Strahlung und abgeschwächte UVB-Strahlung aussenden. Die Strahlungs-dosis soll so niedrig sein, dass alleine keine oder nur sehr schwache schädliche Effekte ausgelöst werden, und so hoch, dass eine ausreichende Aktivierung vieler Photosensibilisatoren gewährleistet ist.

Zur Bestimmung der photoirritativen Eigenschaften wird die Durchführung des 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest empfohlen. Mit der Richtlinie 2000/33/EG der Kommission vom 25. April 2000 wurde diese wissenschaftlich validierte *in vitro*-Methode in den Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG, zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe, aufgenommen. In den meisten Fällen bietet diese Methode ausreichende Informationen zur präklinischen Beurteilung von potenziell photoirritativen Arzneistoffen, so dass im Regelfall präklinische Studien mit Tieren nicht gerechtfertigt sind. Es wird jedoch die Durchführung von kontrollierten klinischen Studien mit gesunden Probanden, z. B. zur Bestimmung der minimalen Erythem-Dosis (MED), befürwortet. Wenn *in vitro* oder *in vivo* potenzielle Risiken auftreten, sollten diese sowohl vor als auch nach der Zulassung im Rahmen von Gutachten zur Arzneimittelsicherheit geeignet erfasst werden.

Bezüglich der Testung auf ein eventuelles photoallergisches Potenzial stellen *in vitro*-Methoden zur Bestimmung von Photoaddukten (Photoproteinbindung) und der Photooxidation von Biomolekülen (z. B. durch Singulett-Sauerstoff) geeignete Werkzeuge zur Differenzierung zwischen photoallergischen und nicht-photoallergischen Arzneistoffen dar. Weitere *in vitro*-Modelle sollen in der Zukunft den noch notwendigen Einsatz von Meerschweinchen zur Bestimmung der Photoallergenität ersetzen.

In Hinblick auf die Beurteilung der Photokarzinogenität sollen zunächst Methoden zur Einschätzung der Photogenotoxizität eingesetzt werden. Zweckdienliche Testsysteme sind der Photomikrokerntest und der Photocometassay. Für Substanzen, die ein klares photogenotoxisches Potenzial aufweisen, wird eine Photokarzinogenität angenommen. Die Bestimmung der Photokarzinogenität kann gegebenenfalls mit Hilfe von SKH1 (hr/hr) haarlosen Albinomäusen durchgeführt werden. Die Methode stellt in diesem Bereich den einzigen GLP-konformen Tierversuch dar. Da kaum Verbindungen bekannt sind, die für den Menschen gesicherte Photokarzinogene darstellen, ist die Korrelation zwischen der Photokarzinogenität beim Nagetier und beim Menschen noch unklar. Neben der Photogenotoxizität müssen auch andere Mechanismen, z. B. die Immunsuppression durch Methotrexat oder Cyclosporin, berücksichtigt werden, die die Karzinogenität von UV-Strahlen in der Haut verstärken (Photokokarzinogenität).

Die Gesamtbeurteilung des Risikos, das mit der Einnahme eines potenziell photosensibilisierenden Arzneimittels verbunden ist, muss im Zusammenhang mit den Ergebnissen der präklinischen und klinischen Studien bezüglich Art und Potenz der Effekte, der Abwägung gegenüber dem therapeutischen Nutzen und der Verfügbarkeit von effektiven klinischen Alternativen mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil durchgeführt werden. Wenn ein Arzneimittel, das klinisch relevante Photosensibilisierungsreaktionen zeigt, zugelassen wird, müssen entsprechende Warnhinweise in Fachinformation und Packungsbeilage aufgenommen werden. Diese sollten beinhalten, dass das Arzneimittel unter Bestrahlung Hauteffekte auslösen kann und dass sich der Patient während der Behandlung nicht direkt der Sonne aussetzen darf.

3.1.2 Amerikanische Richtlinie

Im Gegensatz zur europäischen Richtlinie werden von der FDA *in vivo*-Untersuchungen stärker betont, die entweder präklinisch unter Verwendung von Tieren oder im Rahmen von klinischen Studien am Menschen ablaufen. Weiterhin wird auf die Testung von dermalen Zubereitungen näher eingegangen. Neben einem photosensibilisierenden Arzneistoff können auch die Hilfsstoffe zu einer Hautreaktion unter Bestrahlung beitragen, so dass bei einer Messung des photosensibilisierenden Potenzials die gesamte Arzneimittelzubereitung untersucht werden soll.

Die FDA empfiehlt für die Bestimmung der Photoirritation Kurzzeit-Studien mit Tieren und gegebenenfalls Studien am Menschen. Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen und Schweine stellen geeignete Tiere dar. Der 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest gemäß Richtlinie 2000/33/EG und andere *in vitro*-Methoden können nützliche Informationen zur Beurteilung beisteuern.

Wenn eine Substanz bekanntermaßen photoreaktive Eigenschaften aufweist, dann sollten Langzeit-Studien zur Evaluierung von photokarzinogenen Eigenschaften vermieden werden. Abgesehen von dem bloßen Hinweis auf photoirritative Eigenschaften, sollten Warnhinweise durch den Vermerk ergänzt werden, dass möglicherweise durch das jeweilige Arzneimittel unter Bestrahlung Hautkrebs entstehen kann. Dies ist bei den Arzneimitteln ausreichend, bei denen Hautkrebs als Folge mehrfacher photoirritativer Prozesse auftritt, da ausreichend aufgeklärte Patienten nach Aussetzung gegenüber Sonnenlicht in der Regel sofort die photoirritative Hautreaktion, ein dem Sonnenbrand ähnliches Erythem, bemerken und entsprechend reagieren. Einige Arzneistoffe besitzen jedoch auch ohne die Auslösung von Photoirritationen ein photokarzinogenes Potenzial. Bei diesen Verbindungen muss eine nachdrückliche Warnung angegeben sein.

Ein Warnhinweis muss auch bei Arzneistoffen deklariert werden, die z. B. strukturell ähnlich zu bekannten Photokarzinogenen aufgebaut sind, die zu einer bekannten pharmakologischen Klasse von Photokarzinogenen gehören, die über einen längeren Zeitraum verwendet werden oder die *in vitro* oder *in vivo* bei Kurzzeit-Studien bezüglich der Photokarzinogenität positive Ergebnisse ergaben. *In vitro*-Daten zur Photogenotoxizität werden kritisch von der FDA beurteilt.

3.2 Sonstige Empfehlungen

Grundsätzlich sind mehrere Schritte zur Beurteilung der potenziellen Photosensibilisierung durch Arzneistoffe notwendig. Es müssen die photo-physikalischen Eigenschaften eines Arzneistoffs, die Photochemie bezüglich der Reaktionen mit relevanten Biomolekülen und die Photobiologie mit geeigneten zellulären Testsystemen berücksichtigt werden. Diese Betrachtungen können durch *in vitro* / *in vivo*-Korrelationen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergänzt werden (Miranda 1997).

Zur Erforschung des Mechanismus der Photosensibilisierung können Untersuchungen mit Lipiden, Aminosäuren, Proteinen oder DNA herangezogen werden. Die Fähigkeit Typ I- oder Typ II-Reaktionen einzugehen, sollte ebenfalls nicht vernachlässigt werden (Miranda 1997, Kornhauser et al. 1998).

Das „European Centre for the Validation of Alternative Methods“ (ECVAM) ist ein Teil des „Institute for Health & Consumer Protection“ (IHCP) am „Joint Research Centre of the European Commission“ in Ispra, Italien. Es veranstaltet regelmäßig Workshops mit Fachkräften aus allen Bereichen der Biowissenschaften, um gemäß dem 3R-Prinzip „Refine, Reduce, Replace“ (Russell und Burch 1959) Tierversuche durch wissenschaftlich validierte und regulatorisch akzeptierte *in vitro*-Methoden zu ersetzen. Die Teilnehmer des 42. Workshops empfehlen folgende Vorgehensweisen für die *in vitro*-Beurteilung des phototoxikologischen Gefahrenpotenzials (Spielmann et al. 2000). Als erstes wird die Struktur einer Verbindung in Hinblick auf Phototoxikologie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen bewertet. Substanzen, die eine deutliche Absorption im UV-Vis-Bereich zeigen, sollten weiter untersucht werden. Der 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest gilt als Methode der Wahl, um photosensibilisierende Eigenschaften zu bestimmen. Fällt dieser Test positiv aus, schließen sich weitere Untersuchungen zur Photoallergenität (*in vitro*-Photoproteinbindung) und zur Photogenotoxizität (z. B. Photocometassay) an. Weitere Tests, z. B. zur Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Photoproduktion oder der Photohämolyse, lassen Schlussfolgerungen über die Mechanismen der Photosensibilisierung zu.

Der 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest wurde im April 2004 von dem OECD-Rat akzeptiert und ist damit im Rahmen des 15. Nachtrags zu den OECD Richtlinien zur Testung von Chemikalien („OECD Guidelines for Testing of Chemicals“) als Richtlinie 432 auch weltweit rechtlich verbindlich (Anon. 2004).

Die Arbeitsgruppe Photochemische Genotoxizität der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM) hat 2004 Empfehlungen zur Risikobeurteilung der Photokarzinogenität von Chemikalien publiziert (Brendler-Schwaab et al. 2004). Die Substanzen, die im UV-Vis-Bereich Strahlung absorbieren, die topisch appliziert werden oder nach systemischer Anwendung auch in Form von Metaboliten die Haut erreichen, müssen auf photogenotoxische Eigenschaften geprüft werden. Sowohl photoirritative als auch nicht-photoirritative Verbindungen müssen untersucht werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass photokarzinogene Prozesse auch ohne Photoirritationen ablaufen können. Die *in vitro*-Untersuchung der Photogenotoxizität, z. B. mit Hilfe des Photomikrokerntests oder des Photocometassays, ermöglicht eine erste Gefahrenabschätzung des photokarzinogenen Potenzials.

4 Materialien

4.1 Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Firma</i>	<i>Ref.-Nr.</i>
Psoralen	Fluka	82548-100MG
Bergapten (5-MOP)	Roth	8899.1
Xanthotoxin (8-MOP)	Fluka	95560-5G
Trioxsalen	Sigma-Aldrich	T6137-1G
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka	71727-250G
Ketoprofen	Bayer	3418X
Riboflavin (Vitamin B ₂)	Fluka	95170-10G
Methanol Uvasol [®]	Merck	1.06002.0500
Ethanol Uvasol [®]	Merck	1.00980.0500
Dimethylsulfoxid Uvasol [®] (DMSO)	Merck	1.02950.0500
Natriumchlorid	Merck	1.06404.0500
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04873.1000
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	1.05104.1000
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën	30427-250G
4-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich	M5162-25G
Tris-Base (Trizma [®])	Aldrich	252859-100G
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex [®] III)	Merck	1.08418.1000
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck	1.08346.9025
0,1 N HCl-Lösung (Titrisol [®])	Merck	1.09973.0001
<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -nitrosoanilin	Merck	8.20515.0025
Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT)	Sigma	N-6875-500MG
L-Histidinmonohydrochlorid Monohydrat	Merck	1.04350.0025
L-Methionin	Aldrich	151696-25G
humanes Serumalbumin	Sigma	A-1653-5G

Tabelle 4.1

Kommerziell erworbene Chemikalien

Die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 wurden entsprechend den Vorschriften von Vennekamp et al. 2004 synthetisiert.

4.2 Verbrauchsgegenstände

<i>Gegenstand</i>	<i>Firma</i>	<i>Ref.-Nr.</i>
Filtropur S 0,2 Filtrationseinheit	Sarstedt	83.1826.001
Norm-Ject 20 ml Einmalspritze	Henke Sass Wolf	-
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt	72.690
Reagenzröhrchen 10 ml	Sarstedt	57.519
Eindrückstopfen zur 10 ml Reagenzröhre	Sarstedt	65.793.518
Reagenzröhre 50 ml	Sarstedt	62.559.001
Uringefäß 100 ml	Sarstedt	75.562.005
Mikrotiterplatte mit 24 Löchern	Sarstedt	83.1836.300
Amicon® Centrifree® Ultrafiltrationseinheit	Millipore	4104
Acryl-Halbmikroküvette	Sarstedt	67.740
Quarz-Makroküvette 10 mm Schichtdicke für Absorptionmessungen	Helma	QS 110
Quarz-Makroküvette 10 mm Schichtdicke für Fluoreszenzmessungen	Helma	QS 111
Kimwipes® Lite	Kimberly-Clark	7106010
Reference Pipette 10-100 µl (gelb)	Eppendorf	9283298
Reference Pipette 50-200 µl (gelb)	Eppendorf	9283299
Reference Pipette 100-1000 µl (blau)	Eppendorf	9283300
Reference Pipette 500-2500 µl (rot)	Eppendorf	9283301
Pipettenspitzen 10-200 µl (gelb)	Sarstedt	70.760
Pipettenspitzen 100-1000 µl (blau)	Sarstedt	70.762
Pipettenspitzen 500-2500 µl (weiß)	Eppendorf	0030 000.951

Tabelle 4.2

Verbrauchsgegenstände

4.3 Geräte

4.3.1 Zentrifugation

Beckman J2-21M/E Zentrifuge mit Rotor JA-14

Heraeus Sepatech Medifuge (für 10 ml Zentrifugenröhrchen)

Heraeus Sepatech 17S Biofuge mit Heraeus Sepatech 24 x 1,5 ml Rotor

4.3.2 UV-Vis-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden an einem Hewlett-Packard 8452A Dioden-Array-Spektrophotometer, kombiniert mit einem Hewlett Packard 9153C/900-300-Computersystem, aufgenommen, dessen Küvettenschlitten mit einem Julabo F20 Temperaturregler verbunden war.

4.3.3 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Perkin Elmer LS 50B Lumineszenz-Spektrophotometer gemessen, dessen Küvettenschlitten ebenfalls an einen Julabo F20 Temperaturregler angeschlossen war.

4.3.4 Strahlungsquellen

4.3.4.1 Heraeus Original Hanau Fluotest

Diese Lampe emittiert UVA-Strahlung mit der Wellenlänge 366 nm (Leistung 210 W) und wurde bei folgenden Bestimmungen eingesetzt: Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff und Superoxidradikalanionen und Quervernetzung von DNA.

4.3.4.2 Philips Sunlamp TL 36 D 25/09N

Zwei dieser Lampen wurden bei der Bestimmung der Hämolyse und der Proteinbindung verwendet. Das von der Lampe emittierte Spektrum ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

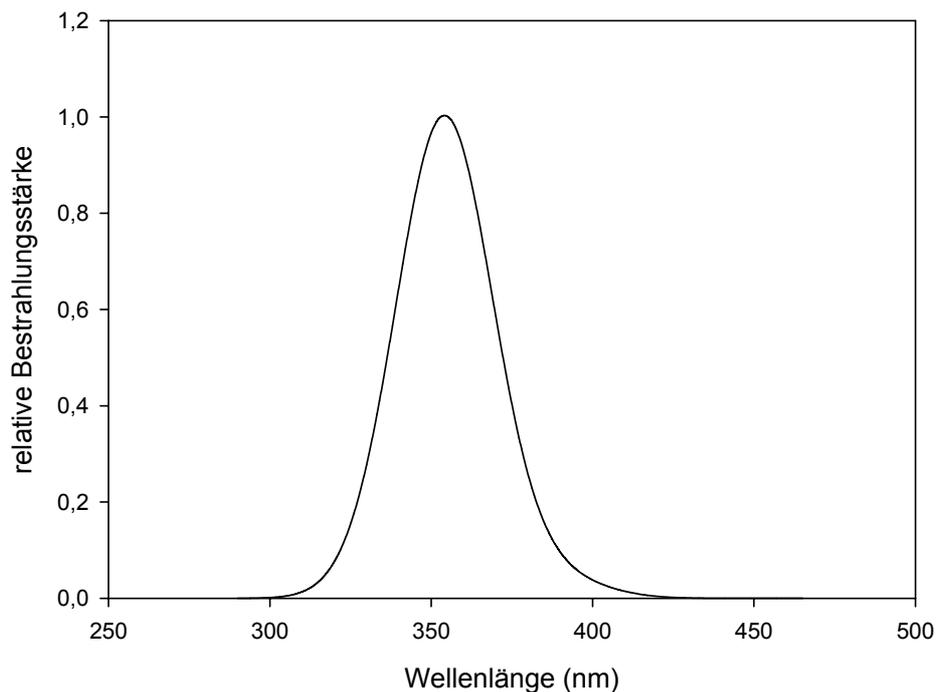


Abbildung 4.1 Spektrum einer Philips Sunlamp TL 36 D 25/09N

Der Hauptemissionsbereich liegt zwischen 305 und 420 nm. Die maximale Bestrahlungsstärke liegt bei 355 nm. UVC-Strahlung wird nicht von der Lampe emittiert. UVB-Strahlung (280-315 nm) wird im Vergleich zu UVA-Strahlung (315-400 nm) mit deutlich geringerer Leistung ausgesendet. Die Nennleistung einer Lampe beträgt 26 W.

4.3.4.3 Dr. Hönle Sonnensimulator SOL-500

Diese Lampe wurde bei der Bestimmung der Photozytotoxizität entsprechend den EU- und OECD-Richtlinien eingesetzt. Hierbei kam ein H1-Filter zum Einsatz, der zum großen Teil die UVB-Strahlung der Lampe absorbiert. Der eingesetzte Mikrotiterplattendeckel reduziert zusätzlich besonders bei Wellenlängen um 300 nm die Bestrahlungsstärke (Abbildung 4.2).

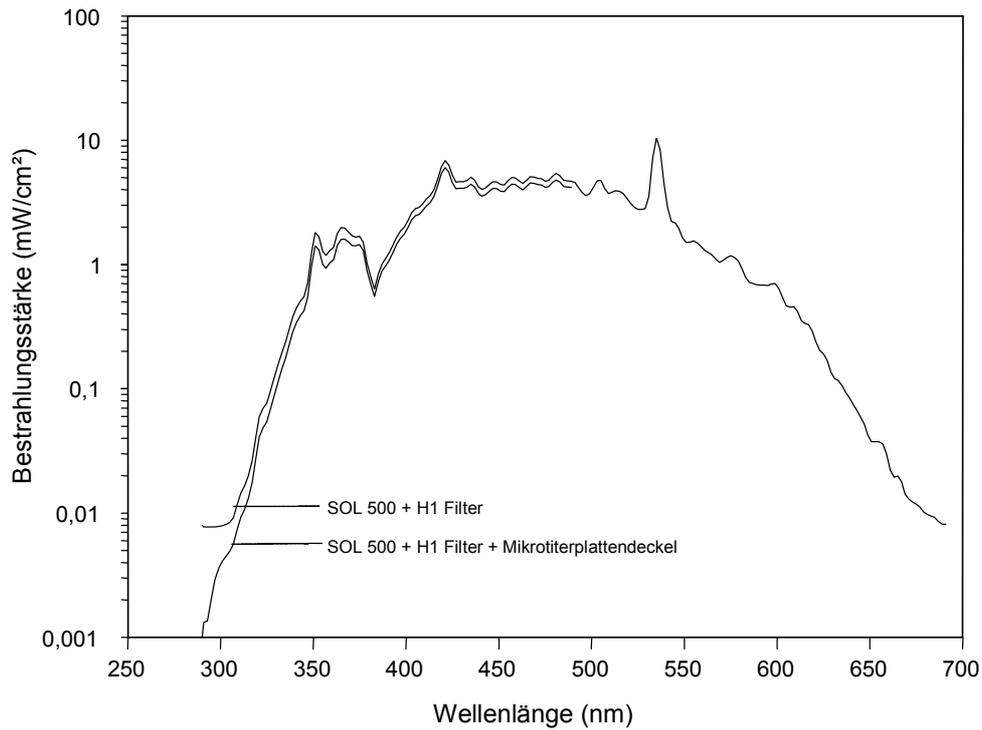


Abbildung 4.2 Spektrum des Dr. Hönle Sonnensimulators SOL-500 mit H1 Filter und Mikrotiterplattendeckel

4.3.4.4 Atlas MTS Suntest CPS⁺

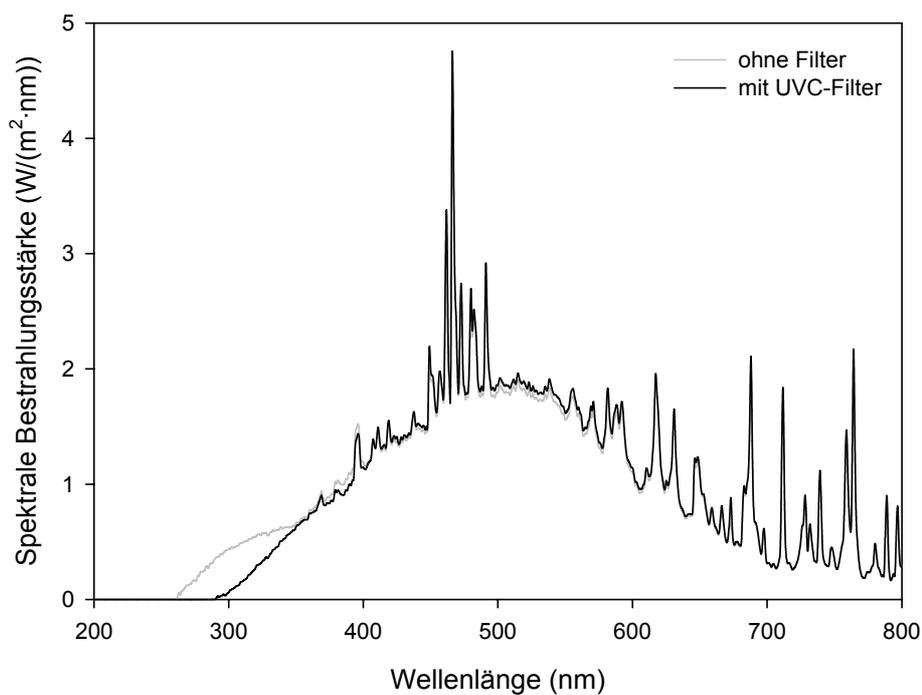


Abbildung 4.3 Atlas MTS Suntest CPS⁺: Spektrum ohne und mit UVC-Filter

Ein Atlas MTS Suntest CPS⁺ Sonnensimulator mit einem UVC-Filter wurde bei der Bestimmung der Photogenotoxizität verwendet. Strahlung mit Wellenlängen oberhalb 290 nm konnte den UVC-Filter passieren.

4.3.5 Sonstige Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>	<i>Ref.-Nr.</i>
Feinwaage	Sartorius	MC1
Vortexer	Janke & Kunkel	VF2
Ultraschallbad	Bandolin Sonorex	RK 514
Wasserbad	GFL	1083
Temperaturregler	Julabo	F20
Digitalthermometer	TFA	D 2010
UVA-Meter	Holtkamp	360
pH-Meter	Metrohm	605
pH-Glaselektrode	Metrohm	6.0232.100
Titramax	Heidolph	100

Tabelle 4.3

Sonstige verwendete Geräte

5 Photophysikalische Untersuchungen

Die photophysikalischen Eigenschaften der Psoralene beeinflussen direkt die Fähigkeit zur Auslösung der Photosensibilisierung der Haut. Für die Photosensibilisierung sind die ungesättigten Furan- und Pyronringe essenziell (Song und Tapley 1979). Die Hydrierung einer Doppelbindung im Furan- oder Pyronring des Psoralens oder eine Einführung einer Hydroxygruppe (Abbildung 5.1) führt zu deutlich veränderten photophysikalischen Eigenschaften und dem vollständigen Verlust der photosensibilisierenden Aktivität *in vivo* (Musajo und Rodighiero 1972).

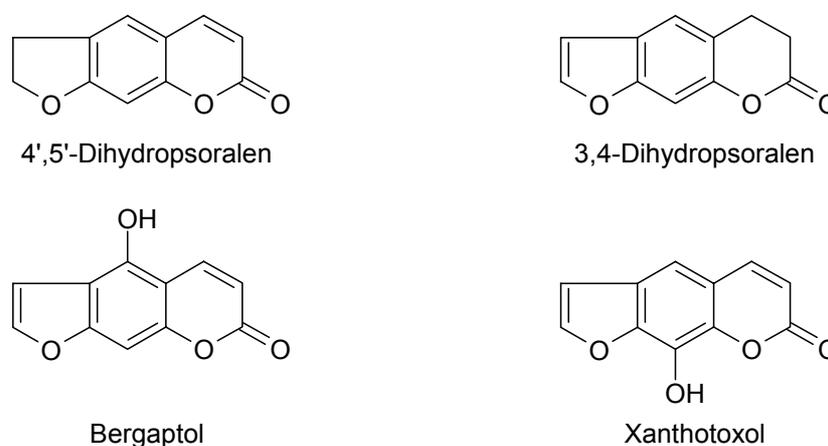


Abbildung 5.1 *In vivo* nicht-photosensibilisierende Dihydro- und Hydroxy-Psoralene

Aus diesem Grund wurden die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Psora-3 und Psora-4 mit denen der bekannten Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP und Trioxsalen verglichen, um Aussagen über wichtige photophysikalische Parameter treffen zu können. Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind, genauso wie z. B. Triplett-Quantenausbeuten, gegenüber dem Einfluss von Substituenten sehr empfindlich (Song und Tapley 1979).

5.1 Photophysikalische Eigenschaften der Psoralene

Die für die Photosensibilisierung notwendige Aktivierung der Psoralene erfolgt durch UVA-Strahlung. Die größte Aktivität liegt für die Verbindung 8-MOP zwischen 350 und 365 nm, für 5-MOP bei 335 nm. Die maximal effektiven Wellenlängenbereiche

stimmen damit nicht mit der Wellenlänge des längstwelligen Absorptionsmaximums überein (Schlatter 1988).

Die Aktivierung der Psoralene erfolgt durch Absorption von Photonen mit geeigneten Wellenlängen und damit verbundener Anregung in höherenergetische Singulett-Zustände. Wenn ein nicht-bindendes Elektron der Carbonylgruppe die Energie eines entsprechenden Photons aufnimmt, resultiert daraus zunächst der angeregte $^1n, \pi^*$ -Zustand. Andererseits können auch π -Elektronen Photonen absorbieren, woraus ein angeregter $^1\pi, \pi^*$ -Zustand entsteht. Der leicht höherenergetische $^1n, \pi^*$ -Zustand geht durch strahlungslose Energieabgabe (gezackte Pfeile in Abbildung 5.2) in den $^1\pi, \pi^*$ -Zustand über. Daran schließt sich eine effiziente Quantenspinumkehr („Intersystem Crossing“, ISC) in den $^3n, \pi^*$ -Zustand an und verhindert damit eine starke Fluoreszenz. Wiederum strahlungslos tritt ein Wechsel in den niederenergetischen $^3\pi, \pi^*$ -Zustand auf, aus dem Phosphoreszenz und photochemische Reaktionen erwachsen (Song und Tapley 1979).

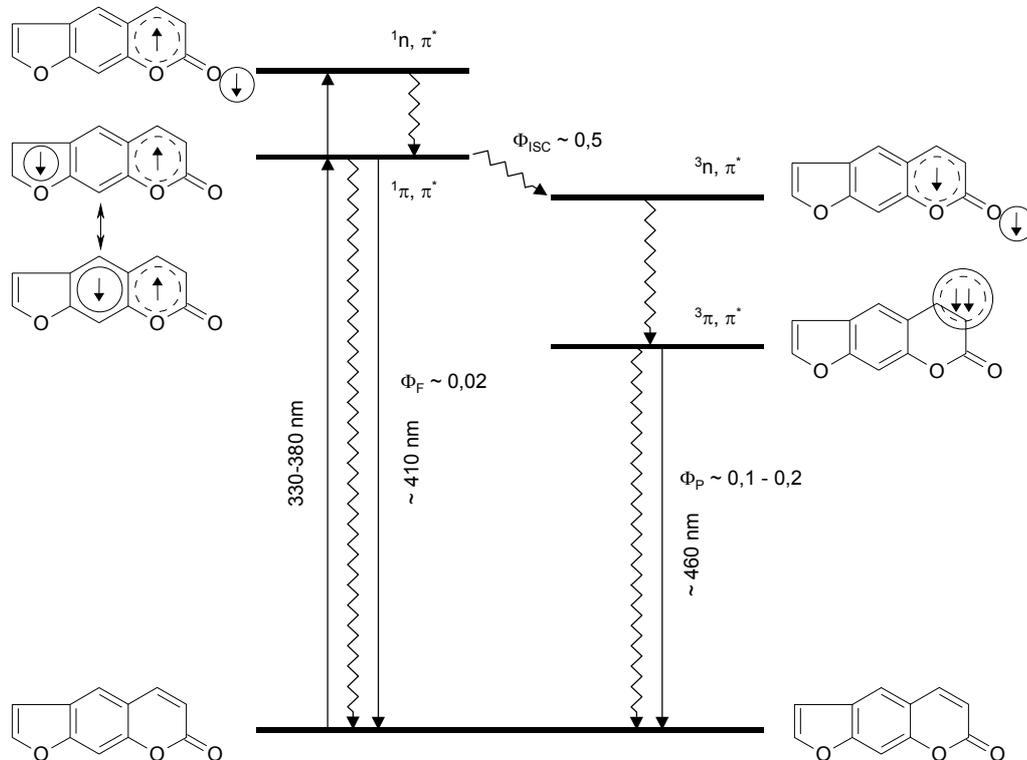


Abbildung 5.2

Psoralen: Termschema (durchgängige Kreise = HOMO, unterbrochene Kreise = LUMO, modifiziert nach Song und Tapley 1979)

Prinzipiell ist auch eine Photoreaktion aus dem $^1\pi,\pi^*$ -Zustand möglich, findet aber seltener statt, weil dieser Singulett-Zustand eine kürzere Lebensdauer (10^{-8} Sekunden) als der erwähnte Triplett-Zustand (10^{-3} Sekunden) besitzt (Pathak 1984).

Neben den Wellenlängenbereichen des eingestrahnten Lichts, des Absorptionsmaximums und der maximalen Aktivität *in vivo* kann also die Quantenausbeute für den Übergang von dem Singulett- in den Triplett-Zustand und die Lebensdauer des angeregten Triplett-Zustands untersucht werden. In Tabelle 5.1 sind Triplett-Quantenausbeuten der Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP und Trioxsalen aufgeführt.

Verbindung	Φ_{ISC} absolut	Φ_{ISC} relativ	RPA
Psoralen	0,12	1,00	1,00
5-MOP	< 0,01	< 0,08	0,28
8-MOP	0,06	0,50	0,38
Trioxsalen	0,09	0,75	2,70

Tabelle 5.1 Triplett-Quantenausbeuten (Φ_{ISC} , nach Potapenko 1991) und relative photosensibilisierende Aktivität *in vivo* (RPA, nach Musajo und Rodighiero 1972) einiger Psoralene

Wird zusätzlich die relative photosensibilisierende Aktivität (Tabelle 5.1) herangezogen, so bekommt man einen weiteren Beleg dafür, dass photophysikalische Parameter großen Einfluss auf die photosensibilisierende Aktivität ausüben können. Neben der Quantenausbeute für den Singulett-Triplett-Übergang kann man z. B. für die Entstehung von Singulett-Sauerstoff oder die Addition an Nukleinbasen Reaktionskonstanten messen und verschiedene Verbindungen quantitativ miteinander vergleichen (Bensasson et al. 1977, Grossweiner 1984, Knox et al. 1988).

5.2 Absorptionseigenschaften

5.2.1 Methode

Die Absorptionsspektren der Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP, Trioxsalen, Psora-3 und Psora-4 im Bereich 200 bis 800 nm wurden unter Verwendung von Quarzküvetten in einer Konzentration von 20 μM in reinem Ethanol gemessen. Ethanol diente als Lösungsmittelabgleich.

5.2.2 Ergebnisse

5-MOP, Psora-3 und Psora-4 zeigten oberhalb von 220 nm identische Absorptionsspektren. Zum Vergleich sind in Abbildung 5.3 die Absorptionsspektren von 5-MOP und Psora-4 dargestellt.

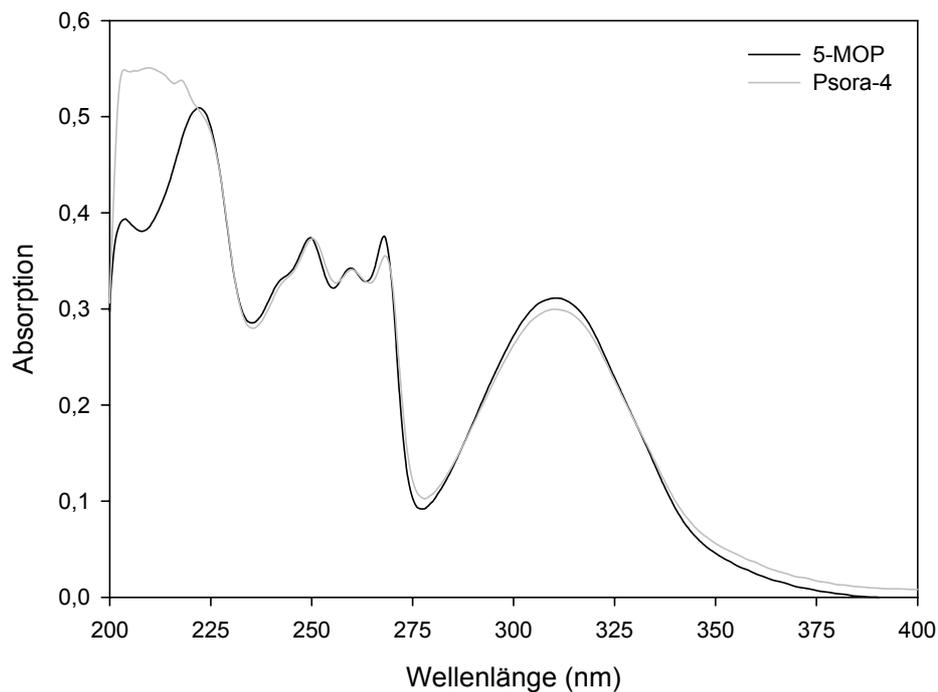


Abbildung 5.3 Absorptionsspektren von 5-MOP und Psora-4

Allen Verbindungen ist gemeinsam, dass ihre längstwelligsten Absorptionsmaxima im Bereich zwischen 300 und 340 nm und die entsprechenden logarithmierten molaren Absorptionskoeffizienten um den Wert 4 liegen. Die Verbindungen Psoralen, 8-MOP

und Trioxsalen unterscheiden sich deutlich untereinander und gegenüber 5-MOP, Psora-3 und Psora-4 (Tabelle 5.2).

Verbindung	$\lambda_{max, 1}$ (nm)	$\log \epsilon_{max, 1}$	$\lambda_{max, 2}$ (nm)	$\log \epsilon_{max, 2}$	$\lambda_{max, 3}$ (nm)	$\log \epsilon_{max, 3}$
Psoralen	246	4.40	290	4.02	328	3.79
5-MOP	260	4.23	268	4.27	310	4.19
8-MOP	218	4.39	250	4.37	300	4.08
Trioxsalen	250	4.48	296	4.02	336	3.80
Psora-3	260	4.22	268	4.25	310	4.17
Psora-4	260	4.23	268	4.25	310	4.18

Tabelle 5.2

Psoralene: Wellenlängen der drei längstwelligen Absorptionsmaxima (λ_{max}) und logarithmierte molare Absorptionskoeffizienten ($\log \epsilon_{max}$)

5.3 Fluoreszenzeigenschaften

5.3.1 Methode

Die Fluoreszenzspektren der Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP, Trioxsalen, Psora-3 und Psora-4 wurden unter Verwendung von Fluoreszenz-Quarzküvetten in einer Konzentration von 100 μM in reinem Ethanol gemessen. Die Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsmonochromators betragen 15 nm.

5.3.2 Ergebnisse

In Abbildung 5.4 sind die Fluoreszenzspektren von Psoralen, in Abbildung 5.5 die von Psora-3 dargestellt. Die Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsmaxima sind in Tabelle 5.3 aufgeführt. Im Vergleich zeigten Trioxsalen, 5-MOP, Psora-3 und Psora-4 gegenüber Psoralen und 8-MOP deutlich höhere Fluoreszenz-Intensitäten.

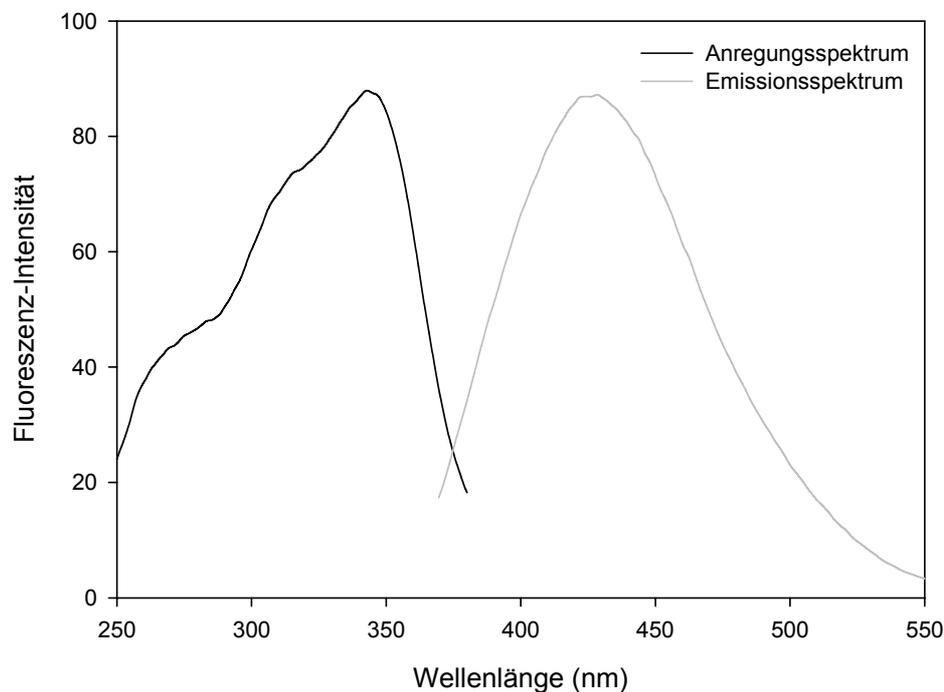


Abbildung 5.4 Fluoreszenzspektren Psoralen

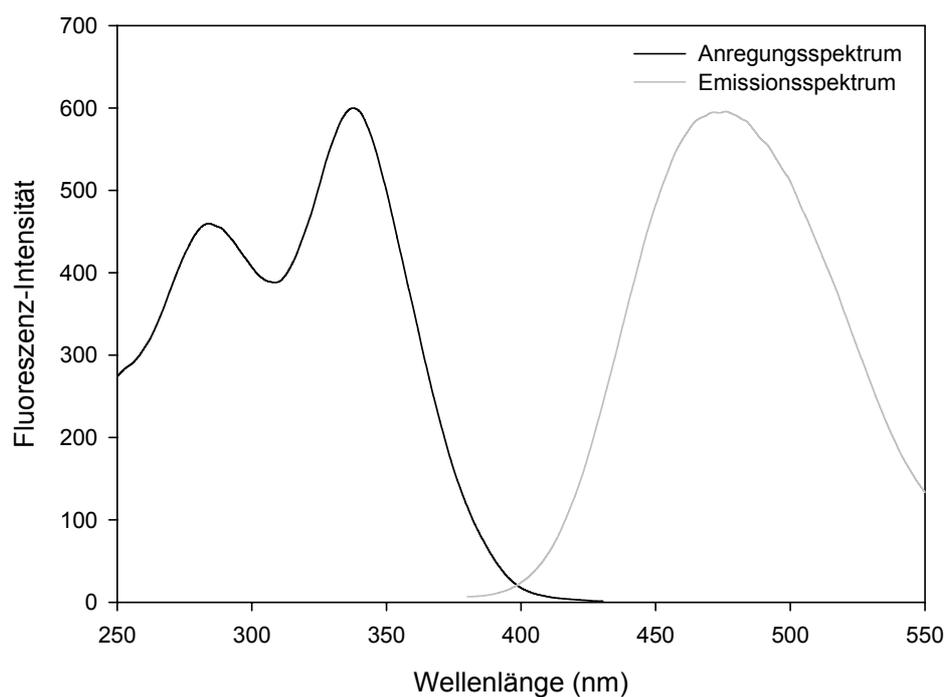


Abbildung 5.5 Fluoreszenzspektren Psora-3

Verbindung	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Psoralen	343	428
5-MOP	338	476
8-MOP	326	470
Trioxsalen	352	431
Psora-3	338	476
Psora-4	337	476

Tabelle 5.3 Anregungs- und Emissionsmaxima

5.4 Diskussion

Alle Psoralene zeigten oberhalb von 280 nm logarithmierte molare Absorptionskoeffizienten größer als 1. Damit ist gemäß OECD Testrichtlinie 432 die erste Voraussetzung für photosensibilisierende Reaktionen, entsprechend des ersten Gesetzes der Photochemie von Grotthus und Draper, erfüllt. Grotthus und Draper postulierten 1818, dass nur absorbiertes Licht eine chemische Änderung auslösen kann. 280 nm wurde als untere Wellenlänge gewählt, da laut „Commission Internationale de l’Eclairage“ (CIE) an dieser Stelle der UVB-Bereich des Sonnenlichts anfängt und niederwelligere UVC-Strahlung im terrestrischen Spektrum nicht vorkommt. Ozon und Sauerstoff absorbieren diese höherenergetische Strahlung vollständig (Molina und Molina 1986).

Wie in Kapitel 5.1 erläutert fluoresziert Psoralen aufgrund des starken Singulett-Triplett-Übergangs sehr schwach. 5-MOP zeigt eine wesentlich geringere Triplett-Quantenausbeute und ermöglicht damit eine stärkere Fluoreszenz. Psora-3 und Psora-4 fluoreszieren ungefähr mit der gleichen Intensität wie 5-MOP. Obwohl Psora-3 und Psora-4 einen zusätzlichen Chromophor, den Phenylring an der Alkyl-Kette, tragen, weisen sie oberhalb von 220 nm gleiche Absorptionsspektren und gleiche Anregungs- und Emissionsmaxima im Fluoreszenzspektrum auf. Diese Tatsache ist über die nicht vorhandene Konjugation des isolierten Phenylrings zum Psoralen-Chromophor zu erklären. In Bezug auf das terrestrische Lichtspektrum ergeben sich also keine Unterschiede zwischen den Verbindungen 5-MOP, Psora-3 und Psora-4. Gleiche Triplett-Quantenausbeuten und Triplett-Lebensdauern sind anzunehmen.

Eine Betrachtung der reinen photophysikalischen Eigenschaften gestattet also die Folgerung, dass Psora-3 und Psora-4 genauso wie 5-MOP deutlich geringere Photoreaktivitäten zeigen als Psoralen, 8-MOP und Trioxsalen.

6 Photochemische Untersuchungen

Neben den beschriebenen photophysikalischen Grundvoraussetzungen spielen die photochemischen Eigenschaften von Arzneistoffen oder Chemikalien eine sehr wichtige Rolle für die Photosensibilisierung der Haut. Die Photochemie beschreibt die Reaktionen eines Photosensibilisators unter Bestrahlung in Abhängigkeit von seiner Umgebung und ermöglicht damit Aussagen über den Mechanismus und das Ausmaß der Photosensibilisierung. Im Folgenden werden die untersuchten Reaktionen, Zielstrukturen und die aus den Reaktionen folgenden biologischen Konsequenzen diskutiert.

6.1 Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff

Die Produktion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) durch Psoralene und UV-Strahlung kann maßgeblich an photosensibilisierenden Prozessen beteiligt sein (Averbeck 1989). Bevor die Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff durch die untersuchten Psoralene vorgestellt wird, sollen zunächst Eigenschaften, Entstehung und Reaktivität des Singulett-Sauerstoffs erörtert werden.

6.1.1 Eigenschaften des Singulett-Sauerstoffs

Luftsauerstoff liegt im Triplett-Grundzustand vor ($^3\text{O}_2$). Somit stellt der Sauerstoff eine Ausnahme dar, denn die meisten stabilen Moleküle weisen einen Singulett-Grundzustand auf. In diesem Zusammenhang ist der Spinerhaltungs-Satz entscheidend, der die Reaktion von Singulett- mit Triplett-Molekülen verbietet. Im Fall des Sauerstoffs müssen für die Verletzung dieser Regel ca. $85 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (die sogenannte Elektronenspin-Barriere) aufgebracht werden. Dieses hat zur Folge, dass sowohl chemische als auch biologische Oxidationsprozesse mit Triplett-Sauerstoff nur sehr langsam ablaufen. Diese Tatsache bewahrt biologische und sonstige Moleküle vor der spontanen Oxidation durch Luftsauerstoff. Nach Übergang in den angeregten Singulett-Zustand, z. B. durch Energieübertragung von einem angeregten Photosensibilisator-Molekül, besteht dieses Reaktionsverbot nicht mehr und Singulett-Sauerstoff kann seine volle oxidative Kraft entwickeln (Adam 1981).

In Abbildung 6.1 ist das Molekülorbital-Schema des Triplett-Sauerstoffs dargestellt. Triplett-Sauerstoff (${}^3\Sigma_g^-$) stellt ein Biradikal mit parallelem Elektronenspin der beiden ungepaarten Elektronen dar.

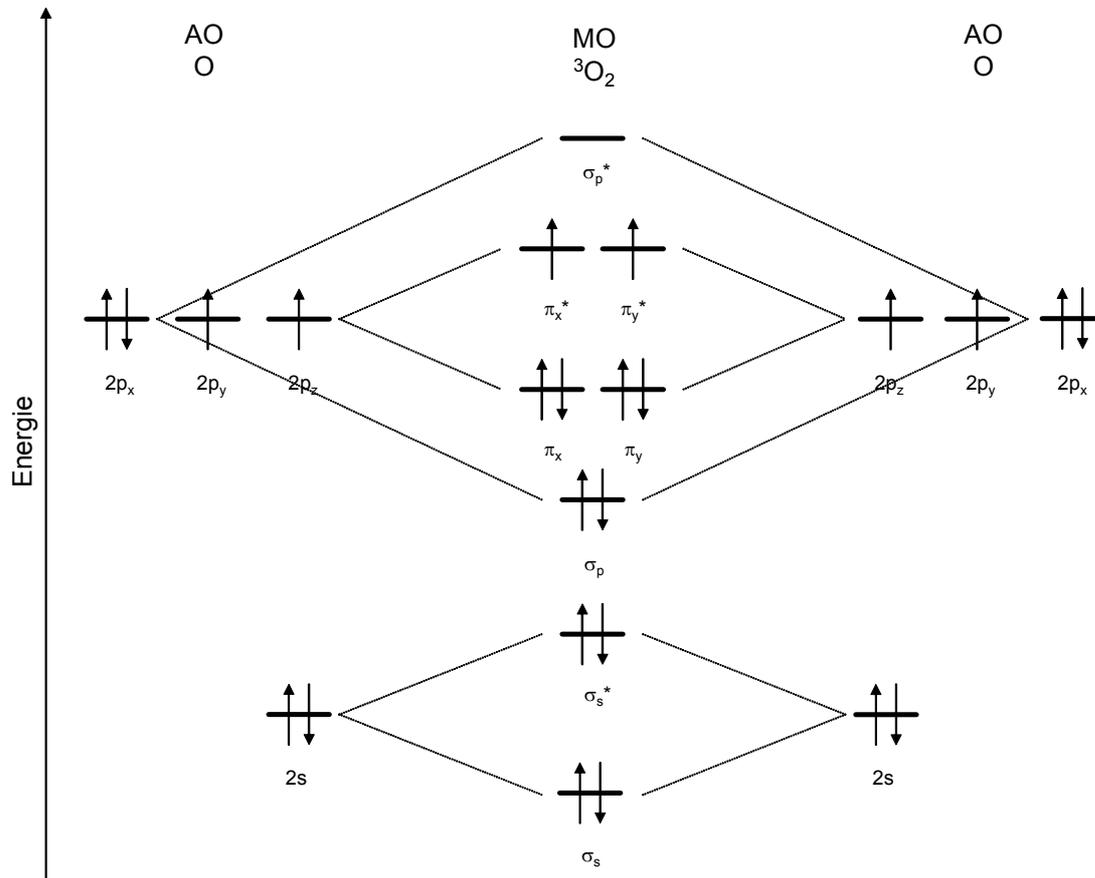
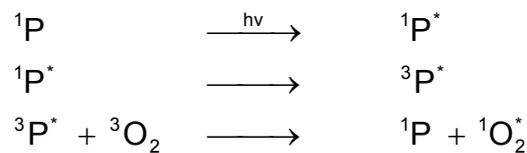


Abbildung 6.1 Molekülorbital-Schema des Triplett-Sauerstoffs (AO = Atomorbital, MO = Molekülorbital, modifiziert nach Greenwood und Earnshaw 1988)

Es sind zwei verschiedene Singulett-Zustände mit antiparallelem Elektronenspin möglich. Der im Vergleich niedrigenergetische ${}^1\Delta_g$ -Zustand ($96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ oberhalb ${}^3\Sigma_g^-$) weist die beiden antiparallelen Elektronen im gleichen π_x^* -Molekülorbital auf, während sich die beiden antiparallelen Elektronen im ${}^1\Sigma_g^+$ -Zustand ($160 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ oberhalb ${}^3\Sigma_g^-$) auf die π_x^* - und π_y^* -Molekülorbitale verteilen. Singulett-Sauerstoff wurde erstmals 1931 von Kautsky und de Bruijn beschrieben. Für beide Singulett-Zustände existiert die Elektronenspin-Barriere nicht, daher kann Singulett-Sauerstoff direkt mit Molekülen reagieren, die sich ebenfalls im Singulett-Zustand befinden.

Spektroskopisch kann man Singulett-Sauerstoff durch Beobachtung der Emission von Licht charakteristischer Wellenlängen nachweisen. Die entsprechenden Wellenlängen sind 1269 nm für den niedrigerenergetischen und 762 nm für den höherenergetischen Singulett-Sauerstoff. Es konnte durch Detektion von Strahlung der Wellenlänge 1269 nm bei Photosensibilisierungsreaktionen gezeigt werden, dass $^1\Delta_g$ -Singulett-Sauerstoff an photodynamischen Effekten beteiligt ist (Adam 1981). Der höherenergetische $^1\Sigma_g^+$ -Zustand ist kurzlebiger und desaktiviert sehr schnell, ohne dass eine chemische Reaktion stattfindet. Deswegen ist $^1\Delta_g$ der für Photosensibilisierungsreaktionen wichtigste Singulett-Sauerstoff-Zustand (Davies 2003).

Singulett-Sauerstoff kann sowohl chemisch, so z. B. durch die Reaktion von Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid, photochemisch (Adam 1981) als auch enzymatisch durch Oxidasen (Epe 1991) erzeugt werden. Für die photochemische Entstehung von Singulett-Sauerstoff gilt folgender Mechanismus:



Hierbei ist P das Photosensibilisatormolekül, 1 steht für Singulett-, 3 für Triplett- und * für elektronisch angeregte Zustände.

6.1.2 Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit biologischen Molekülen

Singulett-Sauerstoff besitzt im Gewebe eine Halbwertszeit bis zu 0,5 μs und kann innerhalb von Zellen in einem Radius von bis zu 0,1 μm diffundieren, ohne dass eine Inaktivierung erfolgt. Dabei ist auch eine Durchquerung von Wasser-Lipid-Grenzflächen möglich (Epe 1991).

Photochemisch entstandener Singulett-Sauerstoff reagiert mit den verschiedensten im Organismus vorhandenen Molekülen wie Aminosäuren, Proteinen, Nukleosiden bzw. DNA und Lipiden.

Zum Teil werden diese Reaktionen von der Bildung weiterer reaktiver Sauerstoff-Spezies, wie z. B. Superoxidradikalanionen oder Hydroxylradikale, begleitet, die wiederum Präkursoren von Singulett-Sauerstoff darstellen oder aus Sekundärreaktionen entstehen (Epe 1991). Ferner kann Singulett-Sauerstoff auch mit dem Photosensibilisator selber reagieren.

6.1.2.1 Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen

Da Proteine ca. 68% des Trockengewichts von Zellen und Geweben ausmachen, sind sie ein wichtiger Angriffspunkt für Singulett-Sauerstoff. Singulett-Sauerstoff reagiert schneller mit Protein-Seitenketten als mit den meisten anderen zellulären Bestandteilen. Neben Proteinen werden natürlich auch einzelne Aminosäuren angegriffen (Davies 2003).

Die Geschwindigkeiten für die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit verschiedenen Aminosäuren unterscheiden sich deutlich. Bei physiologischen pH-Werten werden selektiv nur die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Methionin, Cystein und Cystin durch Singulett-Sauerstoff oxidiert. Es wurden allerdings auch andere geschädigte Aminosäuren in photooxidierten Proteinen gefunden. Wahrscheinlich ist aber, dass diese Schädigungen indirekt als Folge von Sekundärprozessen auftreten. Diese sekundären Abläufe spielen ebenfalls eine wichtige Rolle, da durch sie weitere Beeinträchtigungen ausgelöst werden.

Die Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit freiem bzw. proteingebundenem Tryptophan sind in Abbildung 6.2 dargestellt. Neben den dort aufgeführten Produkten werden auch 3-Hydroxykynurenin, Anthranilsäure, Asparaginsäure, Kohlendioxid und Ammoniak freigesetzt. Die Entstehung des primären Hydroperoxids mit Verschiebung der Doppelbindung erfolgt nach dem 1,3-Additionsmechanismus (siehe auch Abbildung 6.10). Aus den Produkten *N*-Formylkynurenin und Kynurenin kann auch Singulett-Sauerstoff unter Bestrahlung gebildet werden, so dass der oxidative Schaden noch weiter zunehmen kann. Metallionen fördern die Ein-Elektronen-Reduktion des 3 α -Hydroperoxy pyrroloindol-Derivats und die damit verbundene radikalische Kettenreaktion (siehe auch Kapitel 6.1.2.3).

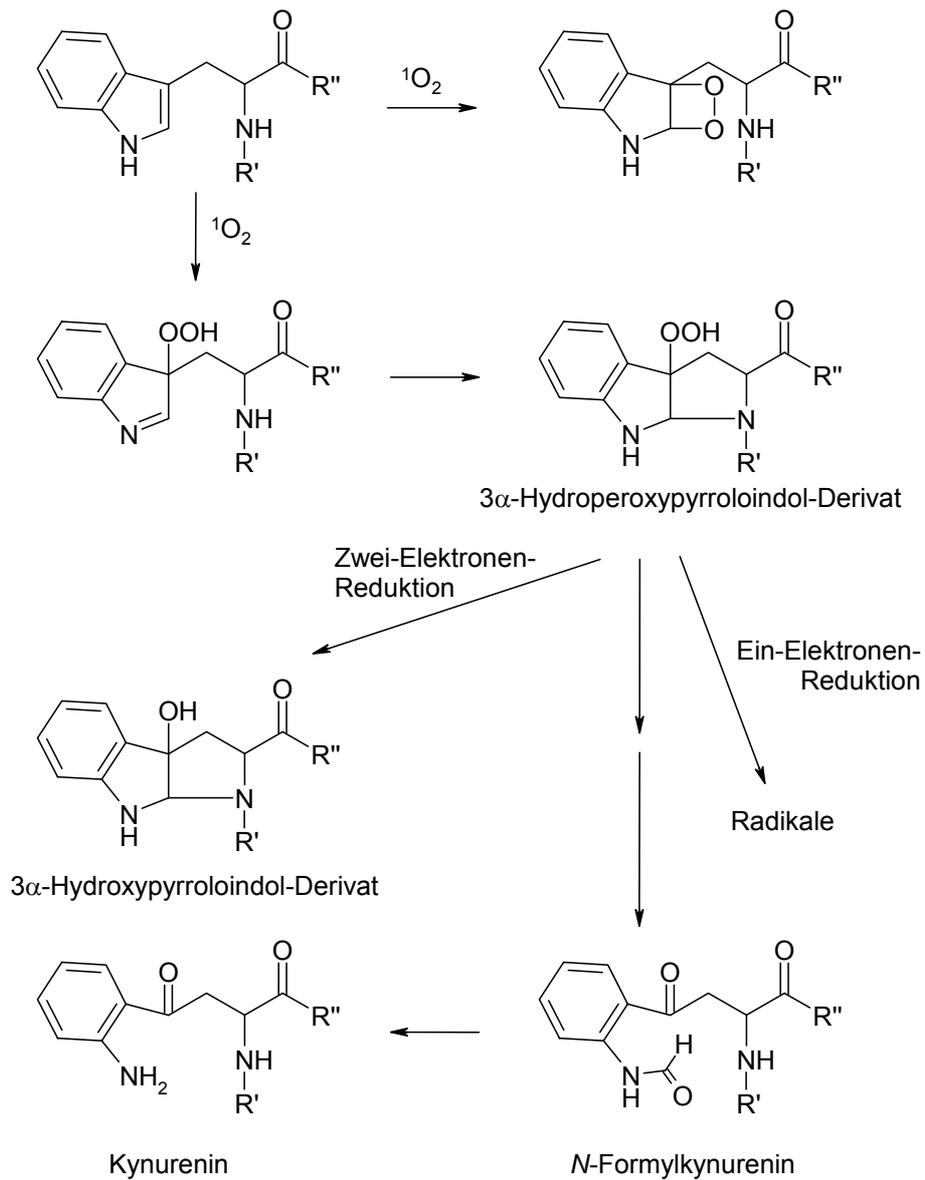


Abbildung 6.2 Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit Tryptophan und Sekundärprozesse

Hinsichtlich des Tyrosins muss man strenger zwischen den Reaktionen im Protein (Abbildung 6.3 A) und denen der freien Aminosäure (Abbildung 6.3 B) unterscheiden. Im Protein findet man als Hauptendprodukt das Alkohol-Derivat, während freies Tyrosin zur Verbindung HOHICA abreagiert. Aufgrund der geringeren Nucleophilie des Stickstoffs läuft der dazu erforderliche Ringschluss kaum in proteingebundenem Tyrosin ab.

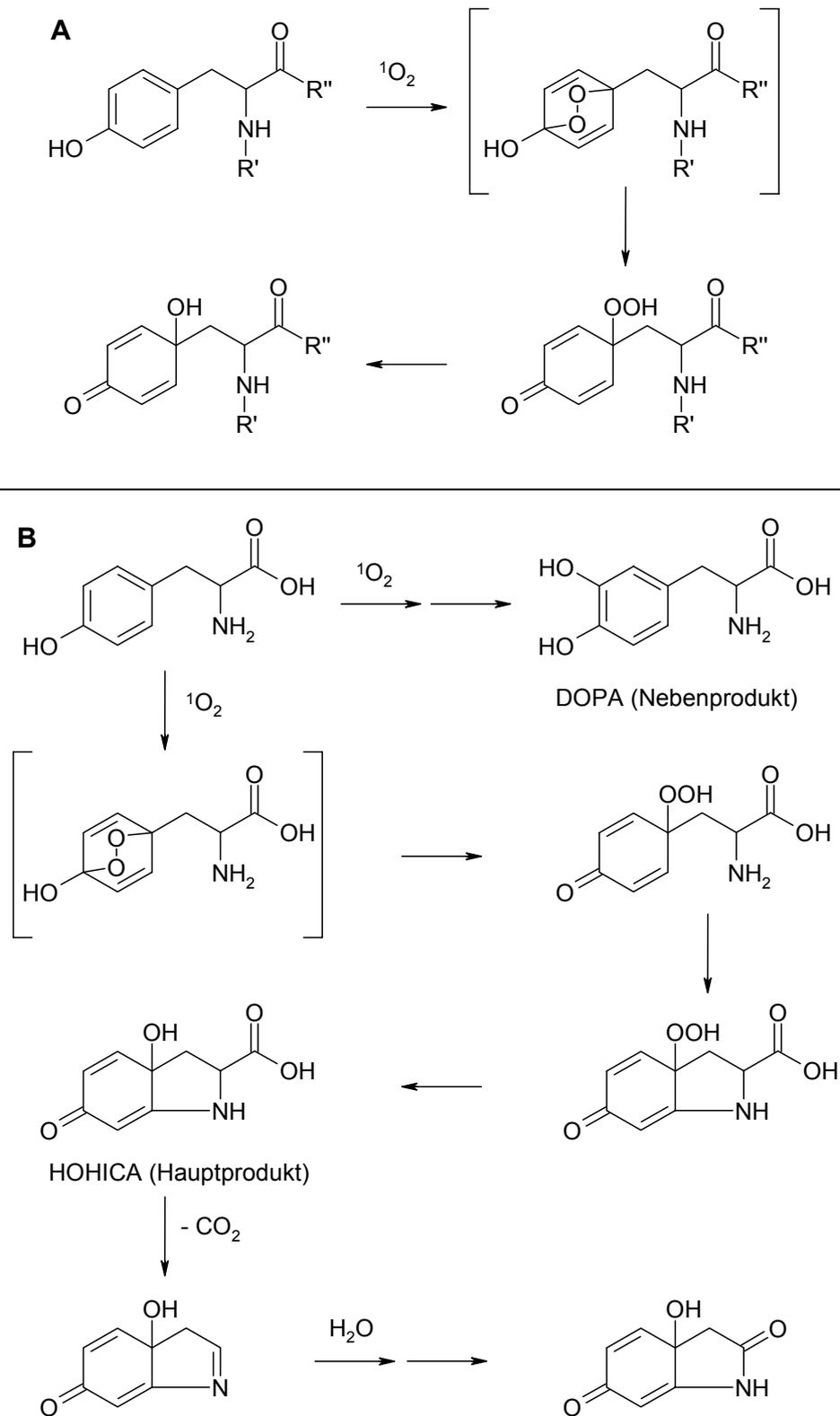


Abbildung 6.3

Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit proteingebundenem (A) und freiem Tyrosin (B) und Folgeprozesse

Da die dargestellten Reaktionen die α -Aminogruppe oder andere funktionelle Gruppen des Protein-Rückgrats nicht einbeziehen, geht man davon aus, dass sie auch in Proteinen ablaufen. Neben den in Abbildung 6.4 aufgeführten Verbindungen entstehen weitere Produkte, die u. a. mit Histidin- und Lysin-Resten reagieren und somit Proteine bzw. Proteinabschnitte kovalent quervernetzen können.

Singulett-Sauerstoff addiert sich ebenfalls an freies Methionin. Dabei entsteht ein Zwitterion, das mit einem weiteren Molekül Methionin zu zwei Molekülen Methionin-Sulfoxid abreagieren kann (Abbildung 6.5). Ob diese Reaktionen auch in Proteinen ablaufen, muss noch untersucht werden.

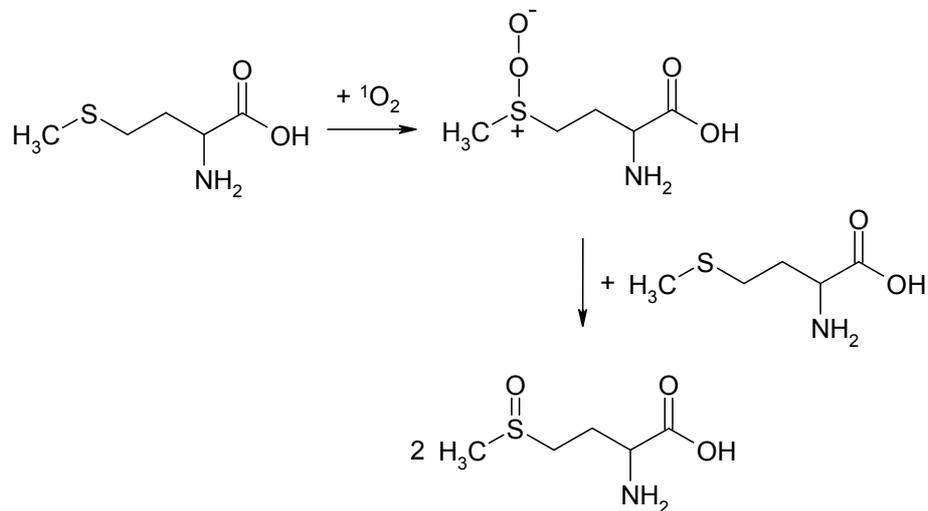


Abbildung 6.5 Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit freiem Methionin

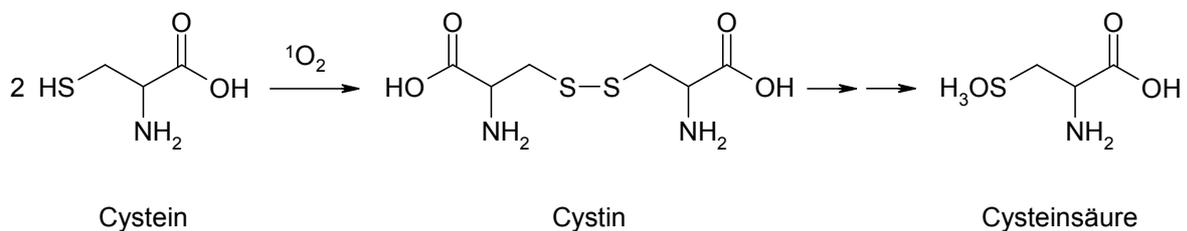


Abbildung 6.6 Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit freiem Cystein

Noch nicht vollständig aufgeklärt ist auch die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit freiem Cystein. Gesicherte Produkte sind in Abbildung 6.6 dargestellt.

Diese Oxidationen finden sicherlich weniger in Proteinen statt, bei denen sterische Einflüsse, z. B. durch Dimerbildung, die Reaktionen verhindern.

Freies Cystin wird zunächst zum Zwitterion und wahrscheinlich mit einem weiteren Molekül Cystin zum Cystin-Sulfoxid oxidiert (Abbildung 6.7). Ob diese Reaktion auch in Proteinen erfolgt und damit auch die dreidimensionale Struktur des Proteins beeinflusst, ist noch nicht vollständig aufgeklärt worden.

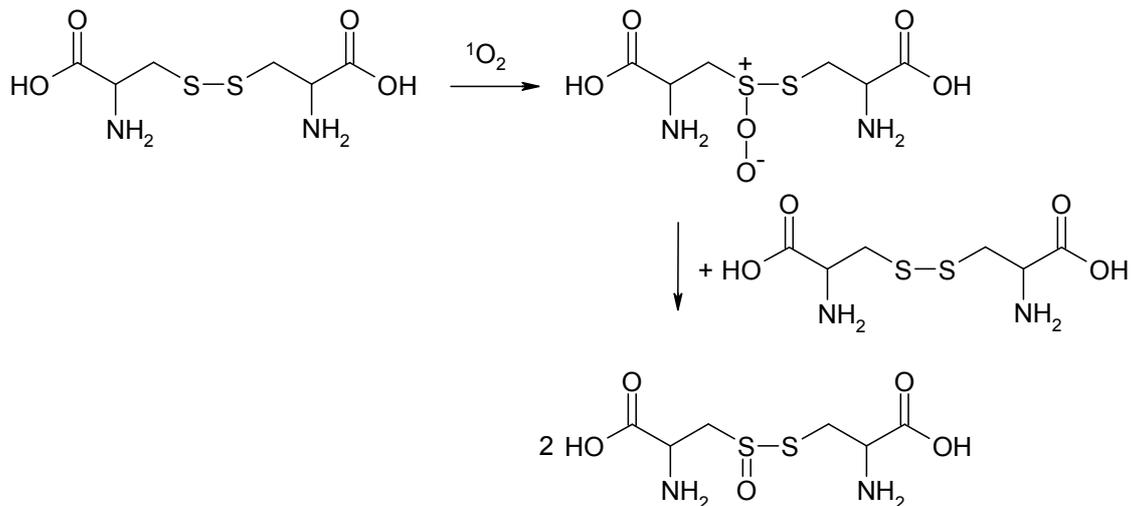


Abbildung 6.7 Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit freiem Cystin

Bereits 1903 konnte durch Tappeiner gezeigt werden, dass durch das Zusammenspiel von Photosensibilisatoren mit Luft und Licht die enzymatische und funktionelle Aktivität von Proteinen verloren geht. Diese Tatsache wurde durch viele nachfolgende Studien bestätigt. Ein großer Anteil des Schadens kann direktem photooxidativem Stress zugeschrieben werden, jedoch dürfen auch die nachfolgenden Dunkelreaktionen nicht vernachlässigt werden.

Die Inaktivierung von Proteinen erfolgt durch Peroxid-Bildung, Seitenketten-Modifikationen, Fragmentierung, Quervernetzung und Aggregat-Bildung. Dabei treten biophysikalische Veränderungen wie Konformationsänderung, Auffaltungsprozesse, Änderung der Hydrophobizität und mechanischer Eigenschaften auf. Letztendlich werden diverse Zell- und Gewebe-Funktionen negativ beeinflusst (Davies 2003).

6.1.2.2 Reaktionen mit Nucleosiden und DNA

Singulett-Sauerstoff reagiert sowohl mit freien Nucleosiden als auch mit den Nucleinbasen der DNA. Dabei wird fast ausschließlich Guanosin bzw. Guanin angegriffen (Sies und Menck 1992).

Die Effektivität der Schädigung von Nucleosiden bzw. DNA durch Singulett-Sauerstoff hängt stark davon ab, wo das Photosensibilisatormolekül sich zum Zeitpunkt der Anregung befindet. Handelt es sich um einen lipophilen Photosensibilisator, der sich bevorzugt in Membranen einlagert, wird vermehrt der DNA-Teil geschädigt, der sich in der Nähe der Kernmembran befindet. Eine Reaktion mit DNA läuft besonders dann ab, wenn ein Photosensibilisator nicht-kovalente Bindungsaktivität gegenüber DNA zeigt. Durch Singulett-Sauerstoff werden sowohl zytotoxische als auch genotoxische Reaktionen hervorgerufen (Epe 1991).

Bei der Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Desoxyguanosin (dG) entstehen viele Produkte, wobei viele ein stark abgebautes Purinringsystem aufweisen.

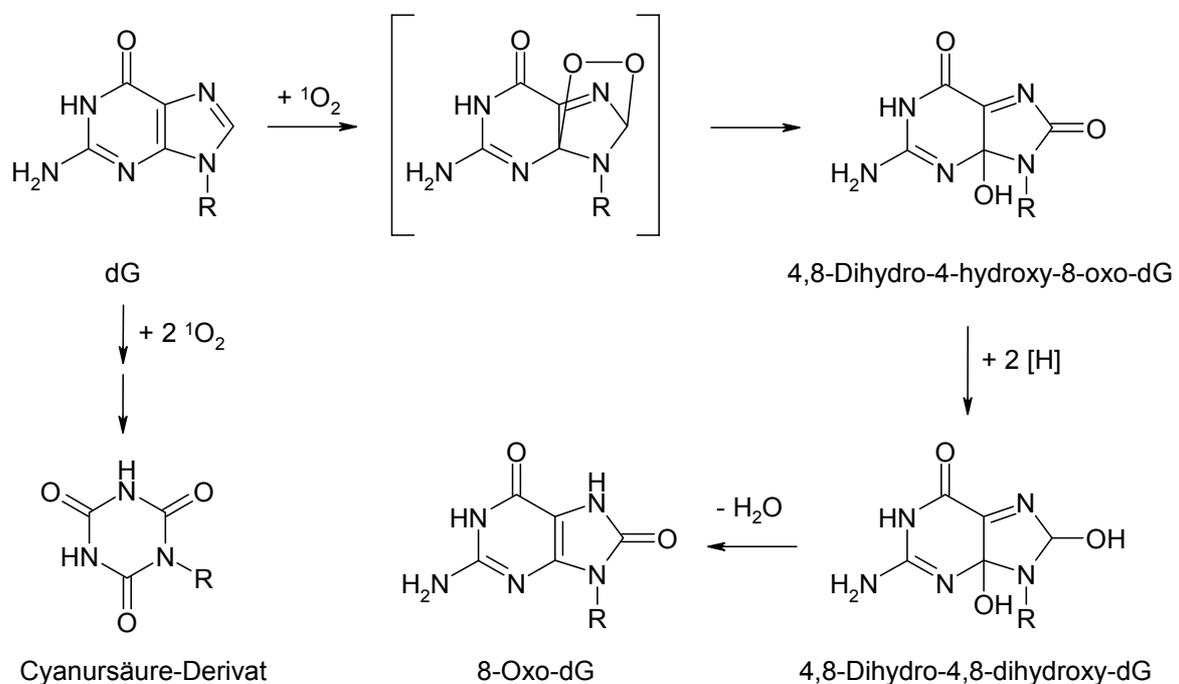


Abbildung 6.8

Singulett-Sauerstoff-Abbauprodukte von Desoxyguanosin (dG, nach Sies und Menck 1992 und Piette 1991)

Nachgewiesen wurden u. a. die Abbauprodukte, die in Abbildung 6.8 aufgeführt sind. Die Reaktivität scheint gegenüber Einzelstrang-DNA höher zu sein als gegenüber Doppelstrang-DNA, es sei denn, dass der Photosensibilisator in die DNA interkaliert. Diese Guanin-Modifikationen stellen den häufigsten Typus der DNA-Schädigung durch Singulett-Sauerstoff dar. Dagegen werden DNA-Brüche und der Verlust von Nukleinbasen (sogenannte AP-Stellen, wobei AP für Apurin bzw. Apyrimidin steht) deutlich weniger durch Singulett-Sauerstoff induziert. Es wird angenommen, dass 8-Oxo-dG (Abbildung 6.8) die wichtigste promutagene Basen-Modifizierung für DNA-Schäden durch Singulett-Sauerstoff darstellt. Es werden ferner am häufigsten G:C→T:A-Mutationen ausgelöst, signifikante Mutationen an T:A-Basenpaaren wurden nicht beobachtet. Dieser Befund unterstützt die These, dass nur Guanin angegriffen wird. Die Basen-Modifikationen weisen ein zytotoxisches Potenzial auf, können aber durch unspezifische Nukleotid-Exzisionsreparatur und spezifische Basen-Exzisionsreparatur beseitigt werden (Epe 1991).

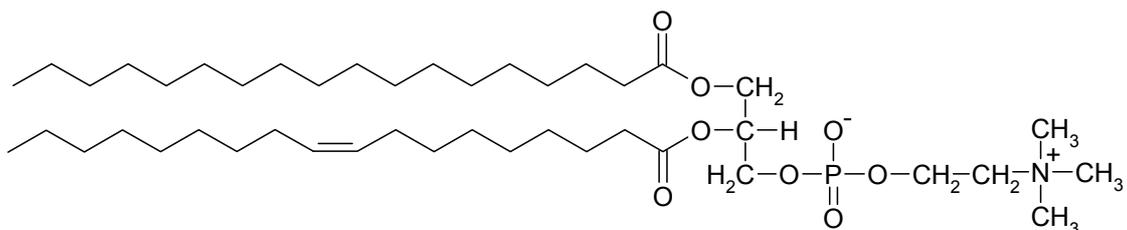
Im Vergleich zu Sauerstoffradikalen werden durch Singulett-Sauerstoff kaum Brüche des DNA-Rückgrats hervorgerufen. Es wurde berichtet, dass die Strangbrüche ausschließlich an Guanin-Stellen auftreten. Der genaue Mechanismus dieser Schädigung ist bisher unbekannt. Als potenzielle Vorstufe wird das initiale Endoperoxid an Guanosin (siehe Abbildung 6.8) betrachtet. Trotzdem sind die Strangbrüche nicht als Folge der Basenmodifikationen anzusehen. Die Häufigkeit der Bildung von Strangbrüchen durch Singulett-Sauerstoff liegt zwischen 2 und 5%. Neben Strangbrüchen wurden auch Alkali-labile und Piperidin-labile Stellen gefunden (Epe 1991, Sies und Menck 1992).

Ebenfalls in einer sehr geringen Häufigkeit treten AP-Stellen (Basenverluste) durch Singulett-Sauerstoff auf. Bei AP-Stellen muss zwischen solchen, die durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung, den regulären AP-Stellen, und solchen, die durch Oxidation im Zucker-Anteil der DNA, den oxidierten AP-Stellen, unterschieden werden. Die Mehrzahl der beobachteten AP-Stellen gehörte dem oxidierten Typus an.

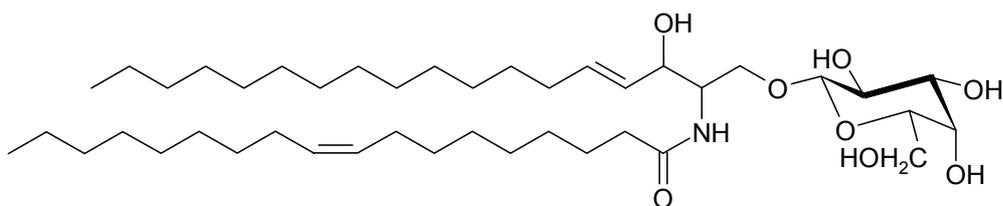
Aus weiteren *in vitro*-Experimenten mit Bakterien und Säugetierzellen konnte man Anhaltspunkte dafür finden, dass Singulett-Sauerstoff vermittelter DNA-Schaden an photogenotoxischen Prozessen beteiligt ist. Aufgrund dieser Ergebnisse und einigen *in vivo*-Experimenten muss man davon ausgehen, dass Singulett-Sauerstoff eine Rolle bei photokarzinogenen Abläufen spielt (Epe 1991).

6.1.2.3 Reaktionen mit Lipiden

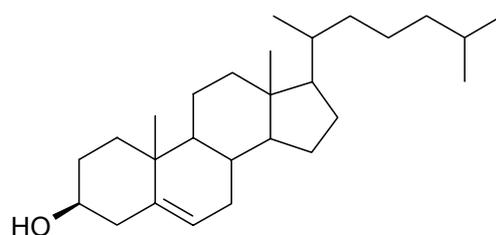
Ungesättigte Membran-Lipide in Säugetierzellen wie Phospholipide, Glycolipide und Cholesterol (Abbildung 6.9) werden u. a. durch Singulett-Sauerstoff geschädigt. Die dabei entstehenden peroxidierten Lipide sind sehr bedeutsam für photosensibilisierende Prozesse (Photoirritation und Photokarzinogenese).



Phospholipid: Phosphatidylcholin (Lecithin)



Glycolipid: Cerebrosid



Cholesterol

Abbildung 6.9

Cholesterol und Beispiele für Phospholipide und Glycolipide

Die Lipidperoxidation kann durch verschiedene physikalische und chemische Vorgänge ausgelöst werden. Dafür können neben Singulett-Sauerstoff auch Sauerstoff-Radikale oder Wasserstoffperoxid verantwortlich sein. Bei der Bildung von Singulett-Sauerstoff in Membranen entstehen charakteristische Lipid-Hydroperoxide (LOOH). Wird dabei die ungesättigte Fettsäure Linolsäure als Bestandteil eines Phospholipids angegriffen, so entsteht in einer 1,3-Addition z. B. das charakteristische 10-Hydroperoxy-Derivat mit der Verschiebung der Doppelbindung in die Allylstellung (Abbildung 6.10). Weiterhin entstehen die 9-, 12- und 13-Hydroperoxy-Derivate durch den gleichen konzertierten Mechanismus (Abbildung 6.11).

Die vier verschiedenen Hydroperoxy-Derivate werden ungefähr im gleichen Ausmaß gebildet. Unter Abwesenheit von Reduktionsmitteln oder redoxaktiven Metallionen ist die Bildung linear mit der Strahlungsdosis verknüpft. Unter Anwesenheit der genannten Agenzien wird die Reaktion durch Radikalkettenreaktionen deutlich beschleunigt. Rein radikalische Reaktionen ergeben nur die konjugierten 9- und 13-Hydroperoxy-Derivate, so dass ein Nachweis der nicht-konjugierten 10- und 12-Hydroperoxy-Derivate einen Hinweis auf die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an photodynamischen Prozessen gibt.

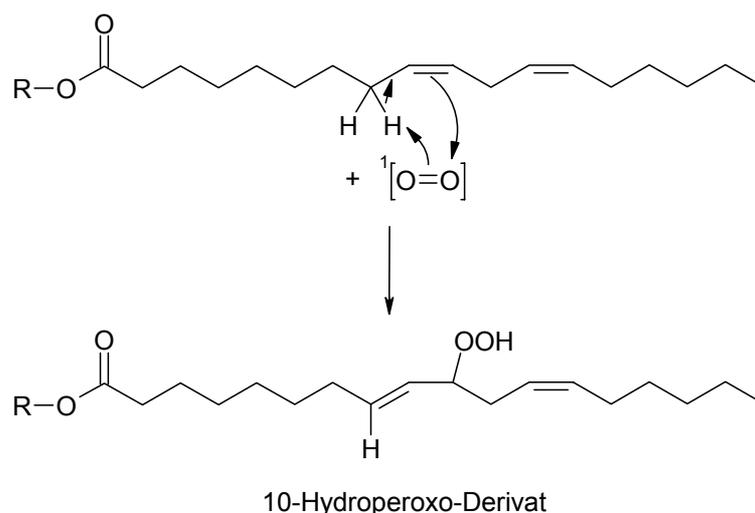


Abbildung 6.10

Entstehung des 10-Hydroperoxy-Derivats durch 1,3-Addition von Singulett-Sauerstoff an Linolsäure

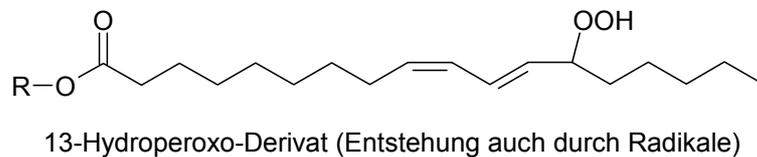
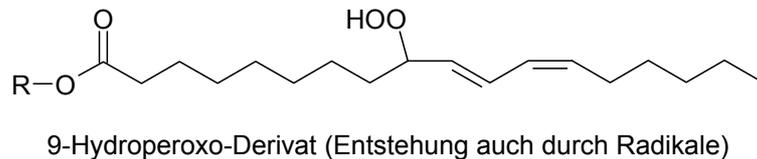
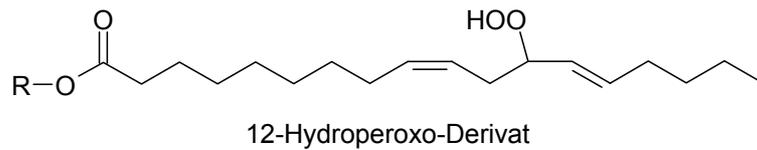


Abbildung 6.11 Weitere Hydroperoxy-Derivate durch die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Linolsäure

Die Entstehung der beschriebenen Hydroperoxide ist einzigartig für nicht-enzymatische Lipidperoxidation, sie werden z. B. nicht durch Lipoxygenasen produziert. Analoge Beziehungen gelten auch für andere ungesättigte Fettsäuren in Lipiden (Girotti and Kriska 2004).

Cholesterin ist ein weiterer sehr wichtiger Bestandteil von allen Biomembranen eukaryotischer Zellen. Der größte Anteil (typischerweise mehr als 80%) ist in der Zellmembran lokalisiert, wo es ca. 45 Molprozent der gesamten Lipidmenge ausmacht. Diese Tatsache macht deutlich, dass Cholesterin ein exzellentes Ziel für Photosensibilisatoren darstellt, die sich bevorzugt in der Membran aufhalten. Durch Singulett-Sauerstoff erhält man drei charakteristische Hydroperoxide, die ebenfalls in einer 1,3-Addition entstehen und die Doppelbindung in Allylstellung aufweisen (Abbildung 6.12). In mit Singulett-Sauerstoff behandelten Membranen findet man mindestens die fünffache Menge vom 5α -Hydroperoxy-Derivat gegenüber den 6α - und 6β -Formen. Im Gegensatz dazu werden in radikalischen Reaktionen 7α - und 7β -Hydroperoxide gebildet (Girotti und Kriska 2004).

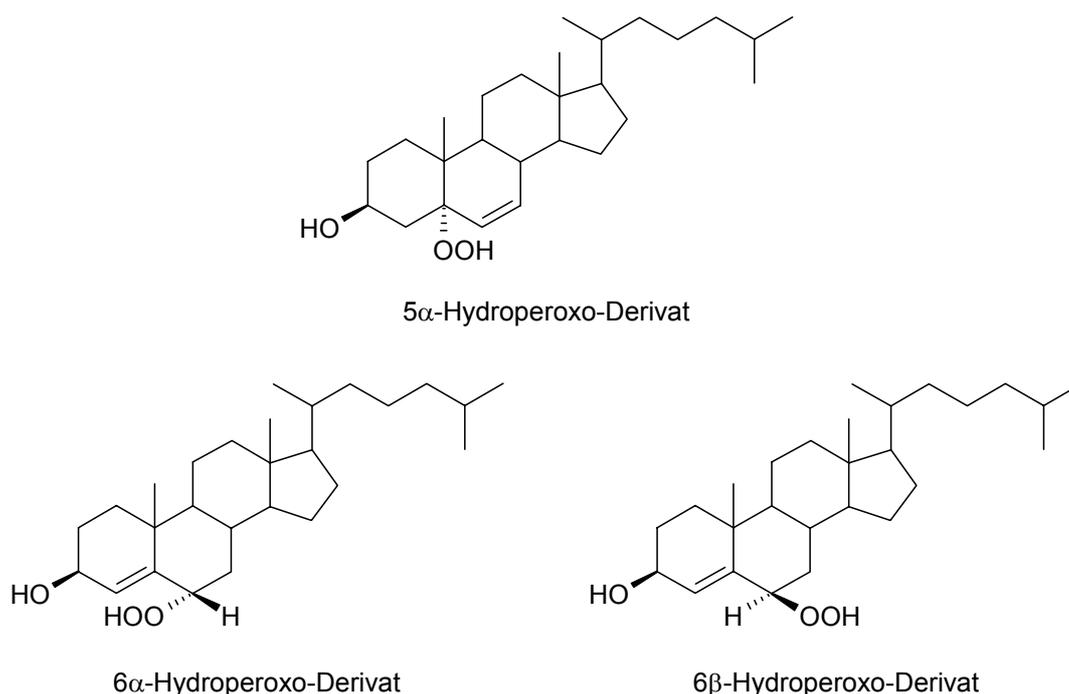


Abbildung 6.12 Charakteristische Cholesterol-Hydroperoxide durch Einwirkung von Singulett-Sauerstoff

Aufgrund der erhöhten Polarität schädigen Hydroperoxo-Derivate von Cholesterol, Phospho- und Glycolipiden direkt die Struktur und Fluidität der Biomembran. In Abhängigkeit von dem Ausmaß der Bildung von peroxidierten Derivaten entscheidet sich, ob eine Zelle überleben kann oder untergeht (Abbildung 6.13).

Dabei kann eine Apoptose, die durch Chromatin-Kondensation, Zellschrumpfen und nur gering verminderten Metabolismus gekennzeichnet ist, physiologisch von Vorteil sein. Auf diese Weise ist es möglich, dass unnötige oder auch mutierte Zellen aus dem Gewebe entfernt werden. Im Gegensatz zur Apoptose verursacht eine Nekrose, die mit Membranauflösung und Untergang des Zellmetabolismus einhergeht, schädliche Effekte für die Umgebung durch Inflammation. Apoptose und Nekrose finden dann statt, wenn die toxisierende Ein-Elektronen-Reduktion die Zwei-Elektronen-Reduktion überwiegt (Girotti und Kriska 2004).

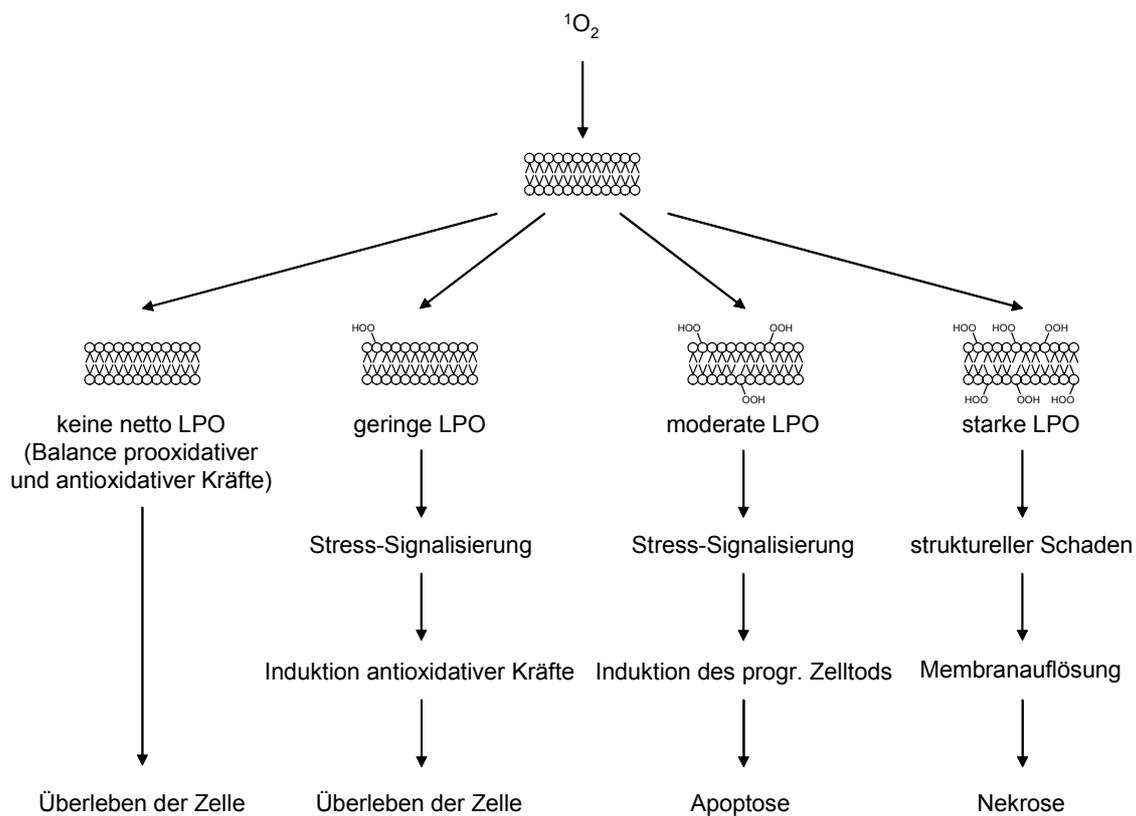


Abbildung 6.13 Darstellung der Reaktionsmöglichkeiten einer Zelle in Abhängigkeit vom oxidativen Schaden durch Singulett-Sauerstoff (LPO = Lipidperoxidation, modifiziert nach Girotti 1998)

Grundsätzlich können Lipid-Hydroperoxide verschiedene Reaktionen auslösen. Eine Ausweitung der Toxizität erfolgt durch die eisenkatalysierte Ein-Elektronen-Reduktion als radikalische Kettenperoxidation. Beibehaltung bzw. Verminderung der Toxizität findet durch die Zwei-Elektronen-Reduktion mittels selenhaltigen Peroxidasen (SePX) statt. Diese beiden Reaktionstypen können ebenfalls nach Translokation auf eine andere Membran derselben oder einer weiteren Zelle ablaufen.

Im Fall der eisenkatalysierten Ein-Elektronen-Reduktion wird ein Hydroperoxid zunächst in der Gegenwart von Elektronendonatoren wie Ascorbinsäure oder Glutathion zum Epoxyperoxy-Radikal (OLOO^\bullet) umgesetzt (Abbildung 6.14). Die gebildeten Radikale vermögen in einer radikalischen Kettenreaktion sehr viele weitere Radikale und Hydroperoxide (L^\bullet , LOO^\bullet , OLO^\bullet , LOOH) zu bilden, so dass in einem „Circulus vitiosus“ eine starke Schädigung von Lipiden stattfindet. Die primär durch Singulett-Sauerstoff gebildeten charakteristischen Derivate, wie das in

Abbildung 6.14 dargestellte 10-Hydroperoxo-Derivat der Linolsäure, treten bei Vorliegen von geeignet gebundenen Fe^{2+} -Ionen in den Hintergrund und die durch Radikale gebildeten Hydroperoxide überwiegen quantitativ. Wenn keine für Singulett-Sauerstoff charakteristischen Hydroperoxide nachzuweisen sind, bedeutet dies deswegen nicht, dass Singulett-Sauerstoff für den photodynamischen Prozess keine Rolle spielt. Die Kettenreaktion läuft auch nach der Bestrahlung noch relativ lange ab (Girotti und Kriska 2004).

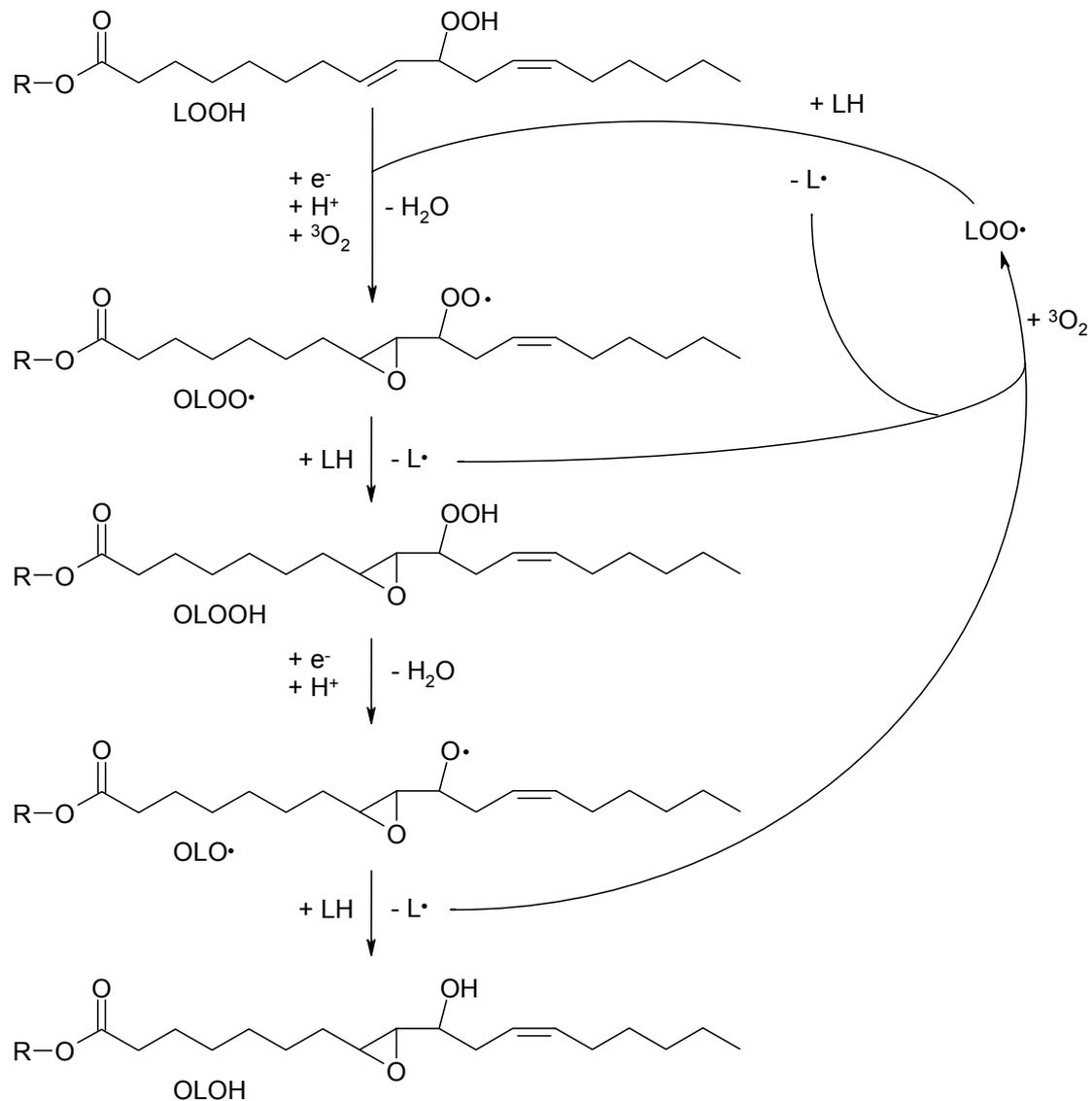


Abbildung 6.14

Eisenkatalysierte Ein-Elektronen-Reduktion des 10-Hydroperoxo-Derivats der Linolsäure und anschließende radikalische Kettenreaktion

Da gegen Singulett-Sauerstoff kein direkter enzymatischer Abwehrmechanismus existiert, sind reparative Reaktionen zum Schutz von Zellen erforderlich. Hierbei sind die selenhaltigen Peroxidasen (SePX) entscheidend beteiligt. Sowohl die klassische Glutathion-Peroxidase (GPX1) als auch die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPX bzw. GPX4) entgiften die Phospholipid-Hydroperoxide. Beide Enzyme sind weit verbreitet in Zytosol, Kern und Mitochondrien von Säugetierzellen vorzufinden und weisen im aktiven Zentrum Selen auf, das an Cystein gebunden ist und an der Detoxifizierung der Peroxide mittels Zwei-Elektronen-Reduktion zum Alkohol beteiligt ist (Abbildung 6.15).

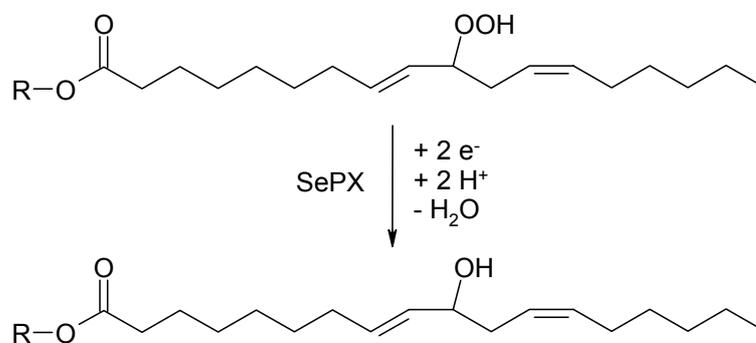


Abbildung 6.15 Zwei-Elektronen-Reduktion des 10-Hydroperoxy-Derivats der Linolsäure durch selenhaltige Peroxidasen (SePX)

Die Peroxidasen unterscheiden sich trotzdem auffallend bezüglich Reaktivität und Spezifität. Während GPX4 auf Hydroperoxide in Membranen direkt einwirken kann, muss durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) zunächst die peroxidierte Fettsäure aus der Membran herausgelöst werden, damit GPX1 in einem weiteren Schritt das Hydroperoxid zum Alkohol reduzieren kann. Es ergeben sich also zwei verschiedene Reparaturwege, der Reduktion-Entfernung-Reparatur-Weg für GPX4 und der Entfernung-Reduktion-Reparatur-Weg für GPX1. Bei beiden Typen besteht der Reparatur-Schritt aus dem Wiedereinbau von Fettsäuren mittels Acyltransferasen.

Cholesterin-Hydroperoxide können ebenfalls radikalische Kettenreaktionen auslösen und sind aufgrund des hohen Vorkommens an Cholesterin in der Zellmembran besonders schädlich. GPX4 ist das bislang einzige bekannte Enzym, das die Cholesterin-Hydroperoxide entgiftet. Sie werden z. B. nicht durch GPX1 reduziert.

Da Lipid-Hydroperoxide eine erhöhte Polarität aufweisen und zum Teil unter Beteiligung von Transport-Proteinen von einer Membran zu einer anderen Membran über das wässrige Medium wandern, laufen die Kettenreaktionen nicht nur in der direkten Umgebung der Entstehung der Hydroperoxide ab, sondern auch in Membranen anderer Kompartimente derselben Zelle oder benachbarter Zellen. Je nachdem, ob die Hydroperoxide zu Orten großer Empfindlichkeit, z. B. zu Mitochondrien und dem Kern, oder geringer Empfindlichkeit, z. B. zu SePX-reichen Membranen, wandern, nehmen der peroxidative Schaden und die Stress-Signalisierung zu oder ab (Girotti und Kriska 2004).

Ein weiterer Schutzmechanismus vor Lipid-Hydroperoxiden ist die Induktion der Häm-Oxygenase HO-1 und des Ferritin. Auf diese Weise wird die durch Häm- und freie Fe^{2+} -Ionen-katalysierte radikalische Kettenreaktion unterdrückt, da die entsprechenden notwendigen Elektronendonatoren in geringerer Konzentration zur Verfügung stehen. Gleichzeitig zur Induktion der HO-1 werden die Phospholipasen A_2 (PLA_2) und C (PLC) aktiviert, so dass die Lipidderivate Arachidonsäure und Diacylglycerol gebildet werden. Diacylglycerol ist ein starker Aktivator der Proteinkinase C (PKC) und des nukleären Transkriptionsfaktor κB , die beide das Überleben der Zelle und die Proliferation fördern. Diacylglycerol stimuliert anscheinend auch Protein-Phosphatasen, die wiederum antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 dephosphorylieren und damit inaktivieren. Die durch Diacylglycerol ausgelösten Effekte werden durch Ceramid gegengeregelt. Die Phospholipasen A_2 und C sind aber auch gleichzeitig an der Auslösung der Apoptose beteiligt. Die PLA_2 ist auf peroxidierten Membranen aktiver als auf nicht-peroxidierten Membranen und vermag deshalb peroxidierte viel schneller als nicht-peroxidierte Fettsäuren aus Phospholipiden hydrolytisch abzuspalten. Die freigesetzten Hydroperoxide der Fettsäuren wirken als Mimikry von natürlichen Eicosanoiden und regen Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen an. Daher und aufgrund der guten Translokationsfähigkeit zu anderen Membranen werden die Hydroperoxo-Derivate auch als Zweiter Botenstoff („Second Messenger“) von Apoptose-Prozessen angesehen.

Zusammenfassend kann man den durch Singulett-Sauerstoff in den Membranen gebildeten Hydroperoxo-Derivaten, die typischerweise längerlebiger sind als

radikalische Verbindungen bzw. Reaktionsprodukte, folgende Eigenschaften bzw. Reaktivitäten zuweisen: Translokation, Ein-Elektronen-Reaktion, enzymatische Zwei-Elektronen-Reaktion und Botenstoff für Zytoprotektion bzw. Apoptose in Abhängigkeit von der Menge der gebildeten Peroxide (Girotti und Kriska 2004).

6.1.2 Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff durch Psoralene

6.1.2.1 Methode

Die Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff durch Psoralene wurde nach der Methode von Kraljic und El Mohsni 1978 bestimmt. Histidin reagiert mit Singulett-Sauerstoff unter Bildung einer trans-annularen Zwischenstufe ([HistidinO₂]) zum cyclischen Endoperoxid. Bei Anwesenheit des gelben Farbstoffs *N,N*-Dimethyl-p-nitrosoanilin wird dieser durch die trans-annulare Zwischenstufe, die nur in der Gegenwart von Singulett-Sauerstoff entsteht, zu farblosen Produkten oxidiert (Abbildung 6.16). Die Zerstörung des Farbstoffs wird nicht durch weitere reaktive Sauerstoff-Spezies hervorgerufen (Pathak und Joshi 1984). Obwohl die Methode schon 1978 eingeführt wurde, stellt sie immer noch einen oft verwendeten Standard dar (Körner 2003, Körner 2002, Wulff et al. 1998, Vedaldi et al. 1995 und weitere).

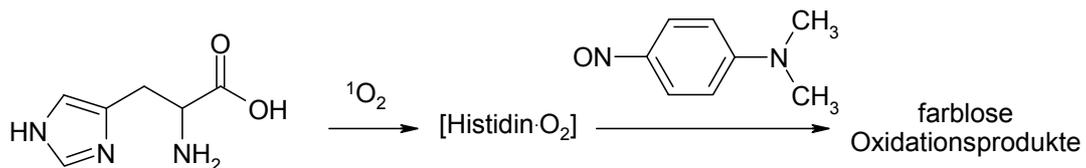


Abbildung 6.16 Indirekter Nachweis von Singulett-Sauerstoff durch Entfärbung des gelben Farbstoffs *N,N*-Dimethyl-p-nitrosoanilin

Substanz	Konzentration (mM)	Einwaage (g/l)
KH ₂ PO ₄	5,1	0,6941
Na ₂ HPO ₄	4,8	0,6814

Tabelle 6.1 Einwaagen 0,01 M Na⁺/K⁺-Phosphatpuffer pH 7

Die Bestimmung wurde in Na^+/K^+ -Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) durchgeführt, der direkt vor der Bestrahlung eine halbe Stunde lang mit reinem Sauerstoff (ca. 0,8 bar) begast und somit gesättigt wurde.

Zunächst wurden ca. 950 ml bidestilliertes Wasser zu den Salzen (Tabelle 6.1) gegeben und der pH-Wert der Lösung mit Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt. Anschließend wurde auf 1000 ml aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Der so hergestellte Puffer wurde eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt und vor Verwendung mit einem 0,2 μm Sterilfilter filtriert.

Die in Tabelle 6.2 aufgeführten Lösungen wurden jeweils frisch hergestellt.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Einwaage</i>
L-Histidinmonohydrochlorid-Monohydrat	0,1 M	Puffer	0,5241 g/25 ml
<i>N,N</i> -Dimethyl-p-nitrosoanilin	4 mM	Puffer	3,0024 mg/50 ml
Psoralene	1 mM	Methanol	entsprechend

Tabelle 6.2 Verwendete Lösungen für die Singulett-Sauerstoff-Bestimmung

Diese Lösungen wurden folgendermaßen in Mikroquarzküvetten pipettiert: 1760 μl Puffer, 20 μl *N,N*-Dimethyl-p-nitrosoanilin-Lösung, 200 μl Histidin-Lösung und 20 μl Psoralen-Lösung. Es ergeben sich somit nachstehende Endkonzentrationen: 4 μM *N,N*-Dimethyl-p-nitrosoanilin, 10 mM Histidin, 10 μM Psoralen-Derivat, 1% Methanol. Gleichzeitig wurden auch Blindwerte ohne Psoralen-Derivat (Zugabe von 20 μl Methanol) hergestellt, um das Eigenbleichen des *N,N*-Dimethyl-p-nitrosoanilin durch UVA-Bestrahlung zu quantifizieren.

Alle Küvetten wurden direkt nach dem Pipettieren und jede halbe Stunde über einen Bestrahlungszeitraum von insgesamt fünf Stunden gegen Puffer bei $\lambda = 440 \text{ nm}$ photometrisch vermessen. Bestrahlt wurde mit einer Heraeus Original Hanau Fluotest Lampe im Abstand von 20 cm. Die wirksame Bestrahlungsstärke betrug 3,5 mW/cm^2 . Es wurden mindestens 4 Bestimmungen durchgeführt.

Die Absorption vor Bestrahlungsbeginn wurde als 100%-Wert festgelegt und alle folgenden Absorptionen darauf bezogen.

6.1.2.2 Ergebnisse

In Abbildung 6.17 ist der zeitliche Verlauf der Absorption ohne und mit Psoralen während der Bestrahlungsdauer aufgeführt. Da *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin ein gewisses Eigenbleichen unter UVA-Bestrahlung zeigte, mussten die mit Psoralen erzielten Werte gegen das Eigenbleichen korrigiert werden. Die daraus gewonnenen Ergebnisse sind ebenfalls in Abbildung 6.17 aufgeführt und stellten letztendlich das Maß für die Singulett-Sauerstoff-Produktion durch Psoralen und UVA-Bestrahlung dar. Bei allen anderen Psoralen wurde ebenso verfahren.

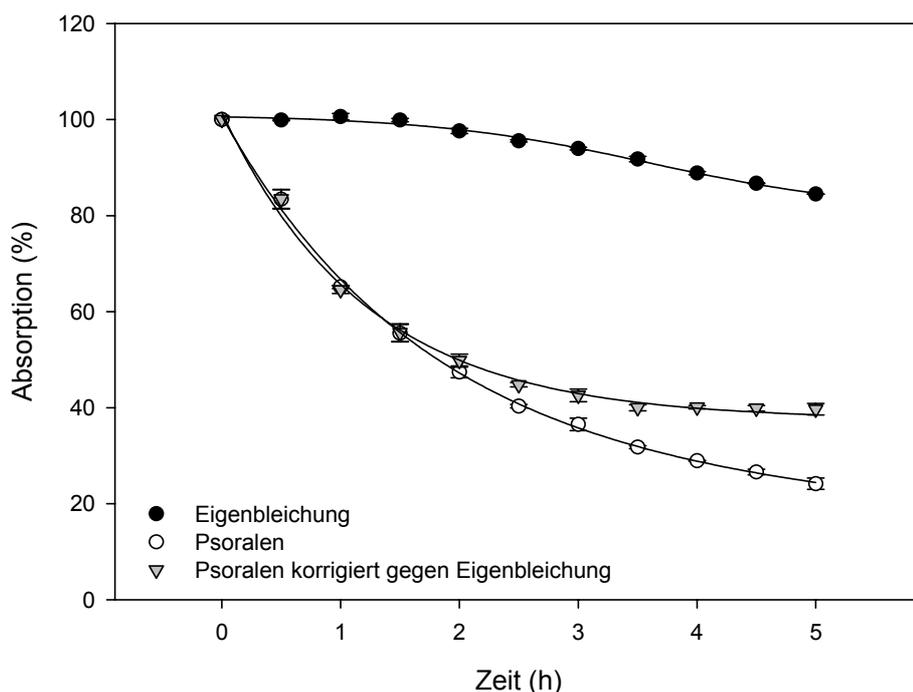


Abbildung 6.17 Zeitlicher Verlauf der Bleichung von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin durch Eigenabsorption, Psoralen und gegen Eigenbleichung korrigiertes Psoralen

Exemplarisch sind die korrigierten Verläufe der Absorptionsabnahme unter Anwesenheit von Psoralen, Trioxsalen und 8-MOP in Abbildung 6.18 aufgeführt.

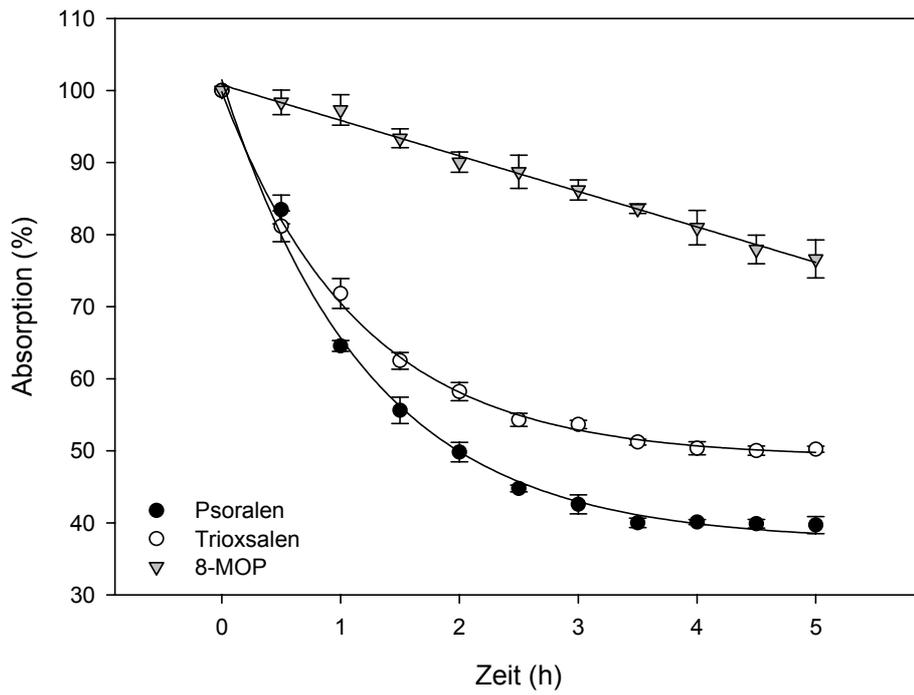


Abbildung 6.18 Korrigierter zeitlicher Verlauf der Absorptionsabnahme durch Psoralen, Trioxsalen und 8-MOP

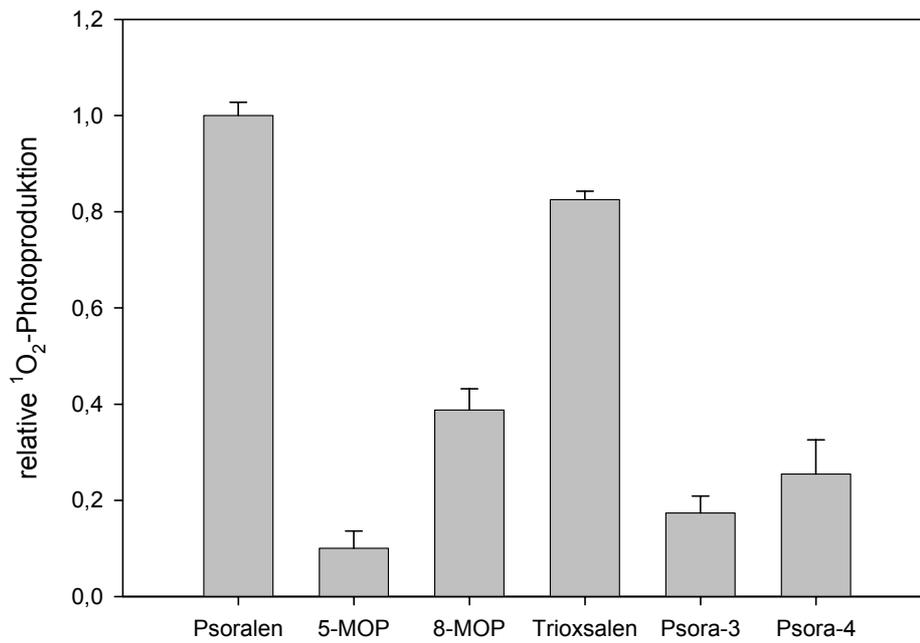


Abbildung 6.19 Relative Singulett-Sauerstoff-Photoproduktion durch Psoralene

Zum quantitativen Vergleich der verschiedenen Psoralene wird die Absorptionsabnahme nach fünf Stunden von Psoralen gleich 1 gesetzt und im Verhältnis dazu die Absorptionsabnahme der anderen Psoralene als relative Singulett-Sauerstoff-Photoproduktion berechnet. Daraus ergibt sich folgende Reihenfolge für das Ausmaß der Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff: Psoralen > Trioxsalen > 8-MOP > Psora-4 \approx Psora-3 \approx 5-MOP (Abbildung 6.19).

6.1.2.3 Diskussion

Die gewonnene Reihenfolge Psoralen > Trioxsalen > 8-MOP > 5-MOP stimmt mit den Ergebnissen von Potapenko 1991, Pathak und Joshi 1984 und Vedaldi et al. 1983 überein. Triplett-Quantenausbeuten dieser vier Psoralene zeigen ebenfalls die gleiche Sequenz auf (Potapenko 1991), woraus man schließen kann, dass die Triplett-Quantenausbeute einen direkten Einfluss auf die Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff ausübt. Für die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 ist eine sehr geringe Fähigkeit zur Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff, ähnlich wie bei 5-MOP, gefunden worden, die über die gleichen photophysikalischen Eigenschaften der drei Verbindungen zu erklären ist.

Dies ist besonders bedeutsam, da Psoralene u. a. mit der Produktion von Singulett-Sauerstoff starken Schaden anrichten können (Potapenko 1991). De Mol und Beijersbergen van Henegouwen berichteten 1981 bei einigen Psoralenen über eine Korrelation zwischen Singulett-Sauerstoff-Produktion und minimaler Erythem-Konzentration *in vivo*. Die in Kapitel 6.1.2 beschriebenen Reaktionen und die damit verbundenen Konsequenzen sind auch für Psoralene berichtet worden (Wamer et al. 1995, Zarebska 1994, Dall'Acqua und Martelli 1991, Potapenko 1991, Averbek 1989). In Zusammenhang mit den erzielten Ergebnissen kann man also davon ausgehen, dass die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 durch Singulett-Sauerstoff allein nur sehr schwache Photosensibilisierungsreaktionen hervorrufen können.

6.2 Photoproduktion von Superoxidradikalanionen

Das Superoxidradikalanion ist ein sehr wichtiger Vertreter aus der Gruppe der reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), da es zum einen den ersten Schritt in der Entstehungskette von reaktiven Sauerstoff-Spezies darstellt und zum anderen Ausgangsstufe für viele noch reaktivere Abkömmlinge ist. Zum Hydroperoxidradikal steht es in einem pH-abhängigen Gleichgewicht (Dean et al. 1997). Neben den in Abbildung 6.20 aufgeführten Molekülen, gehören im weiteren Sinn auch der in Kapitel 6.1 besprochene Singulett-Sauerstoff und das Ozon-Molekül zu den reaktiven Sauerstoff-Spezies.

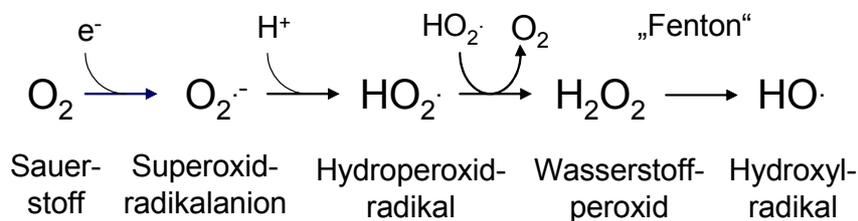


Abbildung 6.20 Reaktive Sauerstoff-Spezies (nach Stryer 1999b)

Photochemisch entstandene reaktive Sauerstoff-Spezies und Elektronentransferreaktionen können maßgeblich an Photosensibilisierungsprozessen beteiligt sein (Quintero und Miranda 2000). Da grundsätzlich alle reaktiven Sauerstoff-Spezies schädigende Wirkungen entfalten, existieren u. a. Schutzenzyme, die die Umwandlung in weniger reaktive Teilchen katalysieren. Beispielhaft sollen hier Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Peroxidasen genannt sein (Abbildung 6.21).

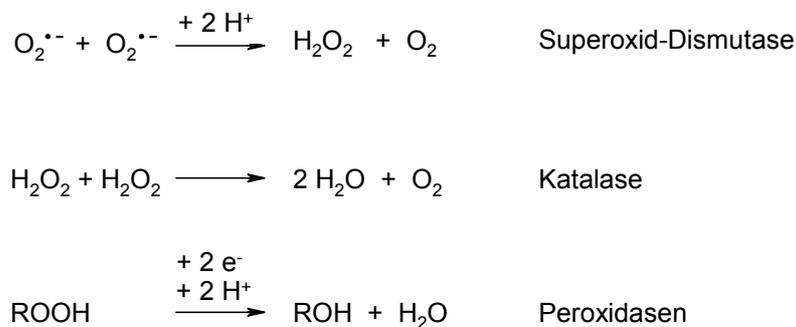


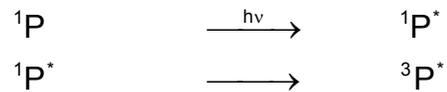
Abbildung 6.21 Entgiftung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (nach Stryer 1999b)

6.2.1 Eigenschaften von reaktiven Sauerstoff-Spezies

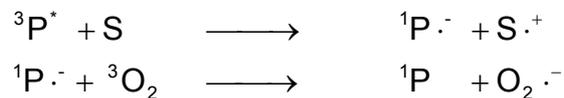
Freie Radikale und reaktive Sauerstoff-Spezies werden kontinuierlich im Laufe des physiologischen Stoffwechsels von Zellen gebildet. Gleichzeitig gibt es eine Reihe von enzymatischen (s. o.) und nicht-enzymatischen Schutzsystemen (z. B. die Vitamine A, C und E, Glutathion, Ubichinon und Flavonoide), die Zellen vor einem zu großen Schaden bewahren (Urso und Clarkson 2003). Es lässt sich in einem aeroben Stoffwechsel nicht vermeiden, dass bei Reduktionsprozessen Elektronen nicht auf die vorgesehenen Moleküle, sondern auf Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) übertragen werden, so dass die sehr reaktiven Superoxidradikalanionen und Wasserstoffperoxid entstehen (Abbildung 6.20). Für die Atmungskette in den Mitochondrien ist berichtet worden, dass bis zu zehn Prozent der NADH-Reduktionsäquivalente zugunsten von Superoxidradikalanionen und Wasserstoffperoxid verloren gehen. Wenn die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies die Reparaturkapazität überschreitet, kommt es zu pathophysiologischen Vorgängen wie Apoptose, Nekrose und entzündlichen Gewebeprozessen. Interessanterweise nutzen Makrophagen und neutrophile Zellen Superoxidradikalanionen als Abwehrmechanismus, so z. B. nach der Phagozytose von Bakterien im Rahmen der Immunreaktion. Weiterhin scheinen oxidative Prozesse eine Rolle in der Signaltransduktion in Epithelzellen zu spielen. Superoxidradikale können auch mit Nitrosylradikalen reagieren. Dabei bilden sich ebenfalls sehr potente Oxidationsmittel wie z. B. Peroxinitrit und weitere reaktive Stickstoff-Spezies (RNS, Marnett et al. 2003).

Aus Wasserstoffperoxid entstehen unter Beteiligung von Eisenionen Hydroxylradikale analog zur „Fenton“-Reaktion. Hydroxylradikale sind sehr starke Oxidationsmittel. Im Rahmen von radikalischen Reaktionen entwickeln sich viele andere reaktive Zwischenstufen und Verbindungen. Daran kann man erkennen, dass sehr komplexe Prozesse ablaufen (Marnett et al. 2003).

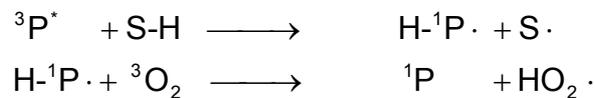
Bei der photochemischen Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies finden zunächst die Anregung des Photosensibilisators im Singulett-Zustand 1P und nachfolgend ein Intersystem-Crossing zum Triplett-Zustand $^3P^*$ statt:



Im Anschluss muss zwischen effektiven und ineffektiven Mechanismen für die Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies differenziert werden (Spikes 1989). Effektiv laufen folgende Reaktionen unter Beteiligung eines biologischen Substrats (S) ab: Elektronenentzug

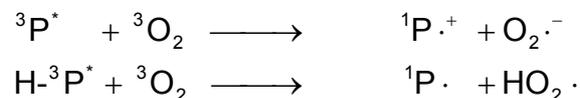


bzw. Wasserstoffatom-Entzug



Die entstandenen Substratradikale können ebenfalls weitere schädigende Reaktionen auslösen.

Weniger effizient läuft dagegen die direkte Übertragung von Elektronen bzw. Wasserstoffatomen des angeregten Photosensibilisatormoleküls auf Sauerstoff ab:



Generell erfolgt die photochemische Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies am besten, wenn geeignete biologische Substrate, Sauerstoff in geringer Konzentration und nicht-kovalente Komplexe aus Substrat und Photosensibilisator vorliegen (Spikes 1989).

6.2.2 Reaktionen von reaktiven Sauerstoff-Spezies mit biologischen Molekülen

Wie Singulett-Sauerstoff können reaktive Sauerstoff-Radikale, wie z. B. Superoxidradikalanionen, und davon abgeleitete Folgeprodukte mit biologischen Molekülen reagieren, diese verändern und damit ihre Funktion einschränken oder Schädigungen auslösen. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte und die damit verbundenen Konsequenzen sollen in den Kapitel 6.2.2.1 bis 6.2.2.3 erörtert werden.

6.2.2.1 Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen

Modifizierungen von Proteinen durch reaktive Sauerstoff-Spezies treten an peptidischen Bindungen, an nukleophilen und redoxempfindlichen Seitenketten auf. Beispiele für Reaktionen an Seitenketten sind in Abbildung 6.22 dargestellt.

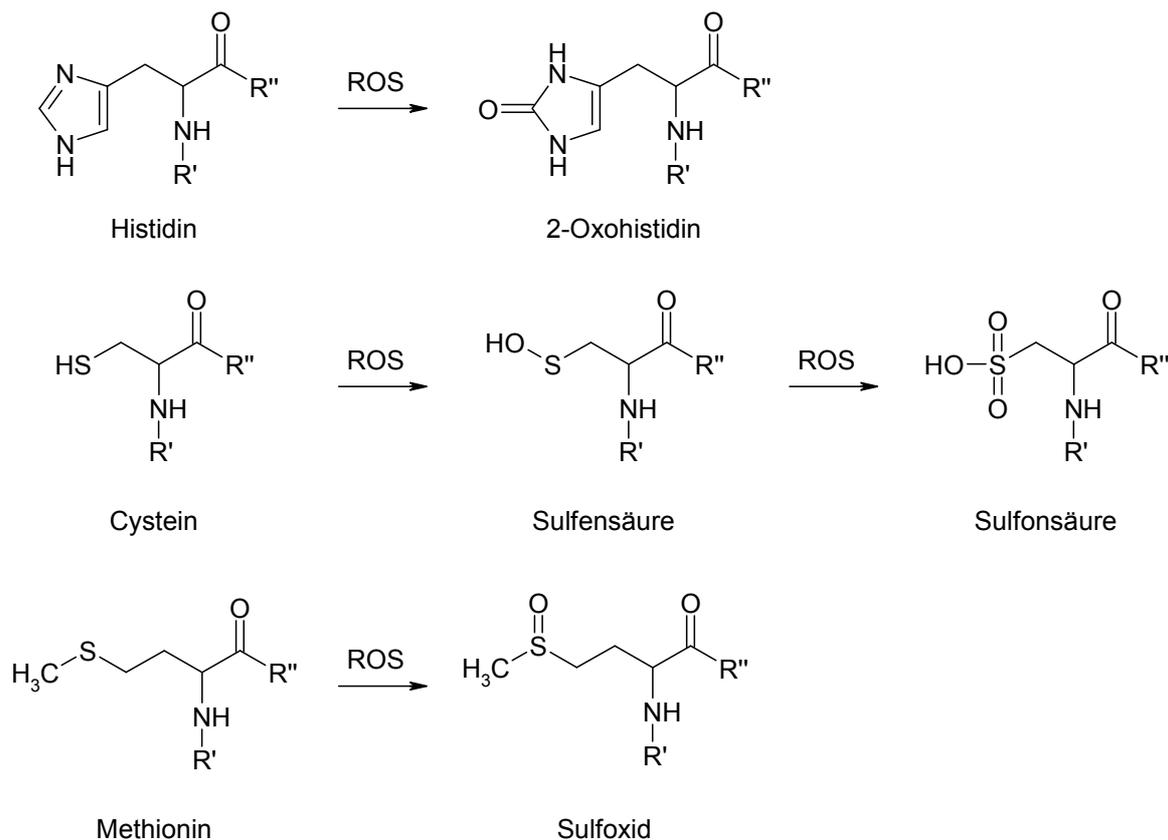


Abbildung 6.22

Reaktionen von reaktiven Sauerstoff-Spezies mit freien oder an Proteinen gebundenen Aminosäuren (nach Marnett et al. 2003)

In vielen Fällen ist der chemische Vorgang reversibel. Einige Protein-Derivate akkumulieren aber im Laufe der Lebenszeit eines Organismus.

Freie Radikale können außerdem Wasserstoffatome von α -Kohlenstoff-Atomen in Peptidbindungen entziehen. Dabei entsteht ein Proteinradikal, das mit einem weiteren in der näheren Umgebung vorhandenen Proteinradikal reagieren und somit eine kovalente Quervernetzung erzeugen kann. Alternativ bindet sich Sauerstoff an das α -Kohlenstoff-Radikal zu einer Peroxid-Zwischenstufe, woraus sich unter Imin-Bildung ein Hydroperoxidradikal abspaltet. Das Imin wird hydrolytisch gespalten und die peptidische Bindung bricht auf (Abbildung 6.23). Die freigesetzten gespaltenen Proteine mit Carbonylfunktion stellen einen Indikator für den intrazellulären Redoxstatus einer Zelle dar (Marnett et al. 2003).

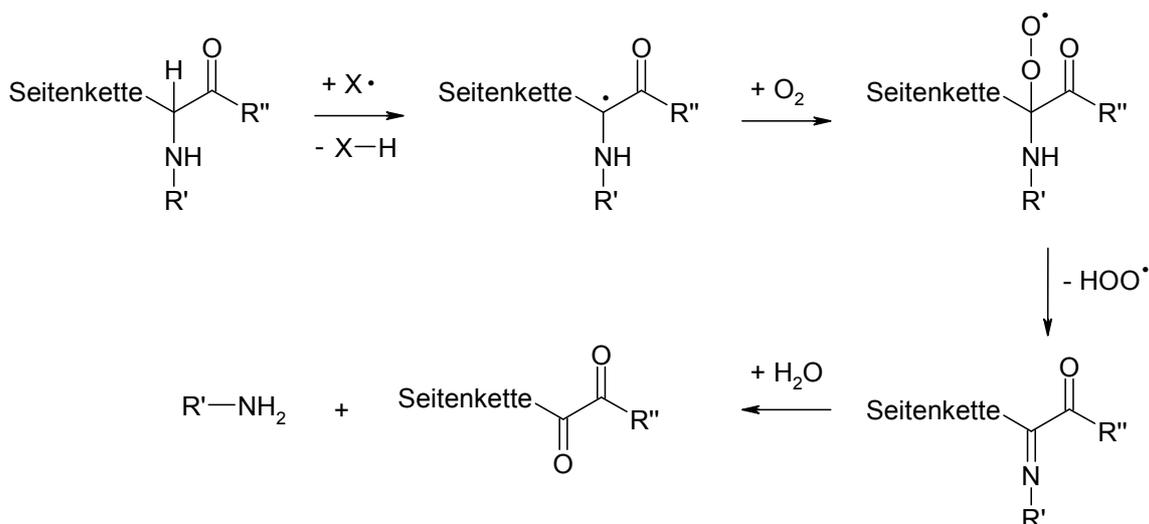


Abbildung 6.23 Spaltung der peptidischen Bindung durch Radikale (nach Dean et al. 1997)

Daneben finden viele andere, teilweise auch sehr komplexe Reaktionen statt. Durch reaktive Spezies werden Struktur-Proteine des Zytoskeletts, Membranproteine, Enzyme und Transkriptionsfaktoren angegriffen. Noch nicht vollständig sind die genauen Mechanismen und Folgen der Schädigungen aufgeklärt, obwohl viele Erkenntnisse gewonnen werden konnten (Marnett et al. 2003).

6.2.2.2 Reaktionen mit Nukleosiden und DNA

DNA-Schäden können durch Reaktionen von reaktiven Sauerstoff-Spezies mit den Nukleinbasen, den Desoxyribose-Resten oder den Phosphorsäureestern als Teile des DNA-Rückgrats hervorgerufen werden. Nicht reparierte DNA-Läsionen akkumulieren mit der Zeit und sind an der Entstehung von altersbedingten Krankheiten beteiligt (Marnett et al. 2003). Mutationen und DNA-Strangbrüche können ausgelöst werden, wobei die meisten Zellen Systeme besitzen, die Mutationen durch Basen-Ausschluss-Reparatur und Strangbrüche durch Reparaturenzyme beseitigen, um das Genom zu erhalten (Chatgililoglu und O'Neill 2001). Die Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms ($H\cdot$) stellt einen ersten Schritt in der Schädigung von Desoxyribose-Resten innerhalb der DNA dar und wird durch Hydroxylradikale, die u. a. aus Superoxidradikalanionen entstehen, und weitere Radikale initiiert. Je nachdem an welchem Kohlenstoff-Atom des Zuckers die Abstraktion erfolgt, resultieren unterschiedliche weitere Abbaureaktionen.

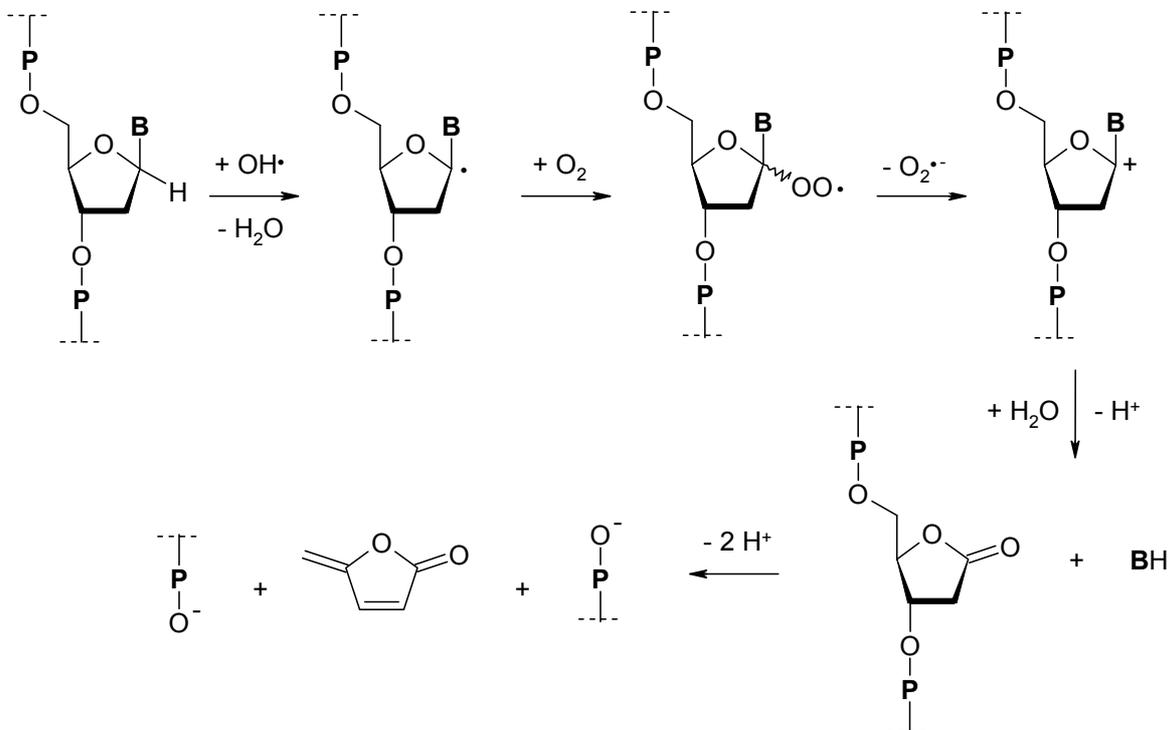


Abbildung 6.24

Abstraktion eines Wasserstoffatoms von Position C1 der Desoxyribose und Folgereaktionen (P = Phosphorsäure-Rest, B = Nukleinbase, nach Chatgililoglu und O'Neill 2001)

In Abbildung 6.24 werden die Reaktionen vorgestellt, die auf die Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms an Position C1 folgen können. Es kommt unter geeigneten Bedingungen zur Abtrennung der Nukleinbase vom Zucker und zum nachfolgenden DNA-Strangbruch. Im Zellkern konkurriert dieser Prozess aufgrund einer geringen Sauerstoff-Konzentration mit der Reaktion des initialen Radikals mit dem Radikalfänger Glutathion (GSH), wobei in dem resultierenden Nukleosid die Base am Zuckerrest in α - oder β -Stellung steht. Für das α -Anomer sind *in vitro* prämutagene Eigenschaften nachgewiesen worden.

Die Reaktionen, die nach Wasserstoffatomabstraktion an Position C4 ablaufen, werden in Abbildung 6.25 erörtert. Auch hier wirkt Glutathion möglichen Strangbrüchen entgegen. Die heterolytische Spaltung des primär entstandenen Radikals läuft auch unter aeroben Bedingungen ab. Das nach Wasseranlagerung an das Radikalkation entstandene Radikal wird ebenfalls durch Glutathion abgefangen.

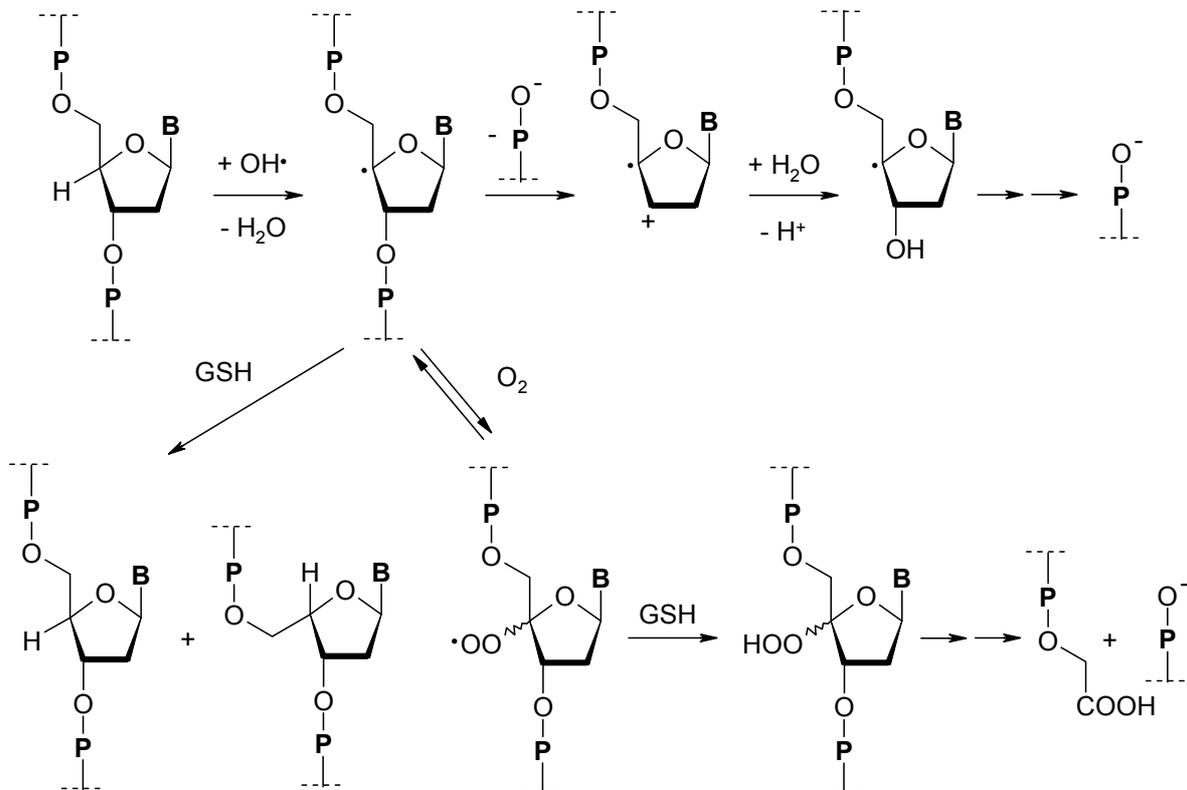


Abbildung 6.25

Abstraktion eines Wasserstoffatoms von Position C4 der Desoxyribose und Folgereaktionen (P = Phosphorsäure-Rest, B = Nukleinbase, GSH = Glutathion, nach Chatgililoglu und O'Neill 2001)

Die Reaktionen, die nach Wasserstoffatomabstraktion an Position C5 ablaufen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Abbildung 6.26). Unter anaeroben Bedingungen läuft eine intramolekulare Anlagerung an die elektronenreichen Purinbasen Adenin und Guanin ab. Unter Anwesenheit von Sauerstoff sind u. a. Peroxy- und Oxyradikale nachgewiesen worden. Die genauen Mechanismen dieser sauerstoffvermittelten Reaktionen müssen noch aufgeklärt werden.

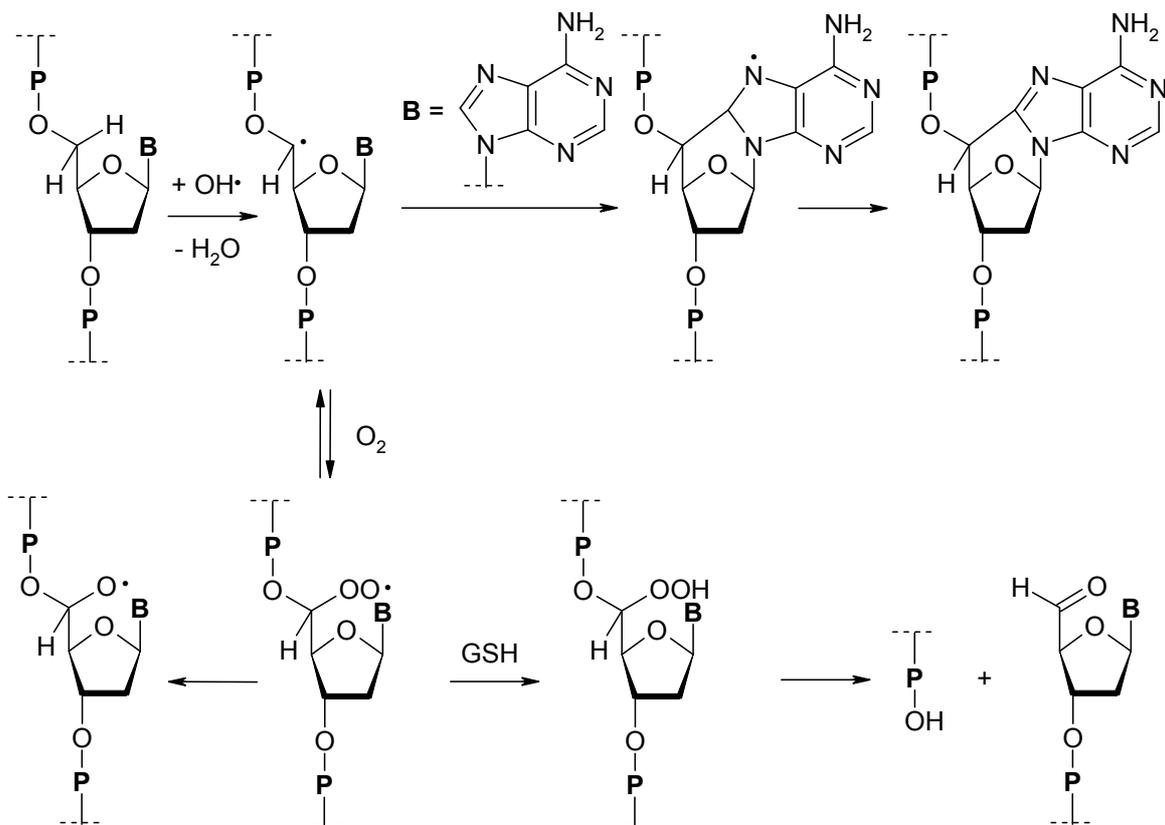


Abbildung 6.26

Abstraktion eines Wasserstoffatoms von Position C5 der Desoxyribose und Folgereaktionen (P = Phosphorsäure-Rest, B = Nukleinbase, GSH = Glutathion, nach Chatgililoglu und O'Neill 2001)

Sowohl Purin- als auch Pyrimidinbasen werden von Hydroxylradikalen angegriffen. Dabei bilden sich einige typische Reaktionsprodukte (Abbildung 6.27), die zum Teil auch als Biomarker für oxidativen Stress angesehen werden (Chatgililoglu und O'Neill 2001).

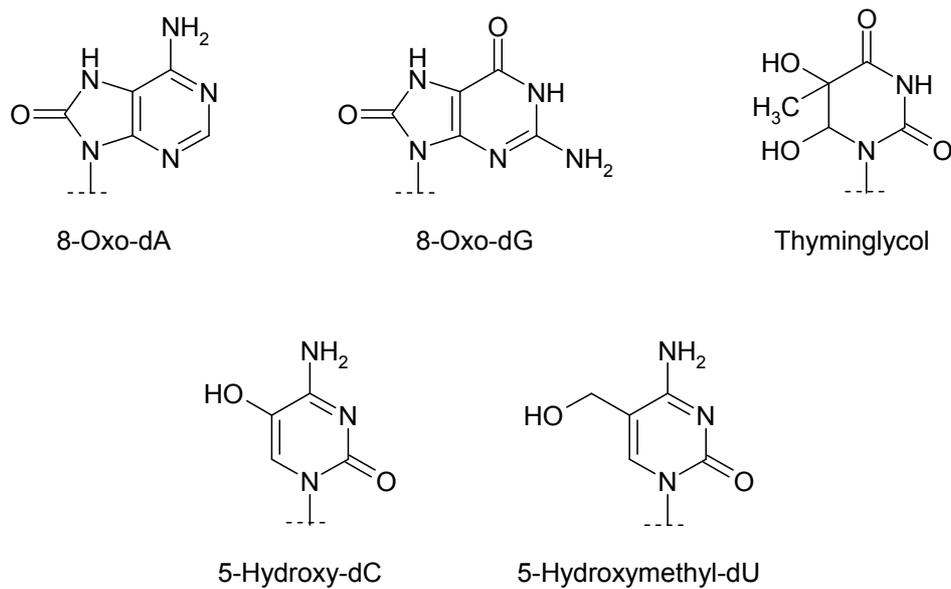


Abbildung 6.27 Durch Hydroxylradikale entstandene Nucleinbasenderivate (nach Marnett et al. 2003)

Einige mit den Modifikationen verbundene mutagene Konsequenzen sind in Tabelle 6.3 aufgeführt.

Nucleinbase	Modifikation	Mutation
Adenin	8-Oxo-dA	A → C
Guanin	8-Oxo-dG	G → A
Thymin	Thyminglycol	T → C

Tabelle 6.3 Mutationen während der Replikation nach Basenmodifizierung (Auswahl nach Marnett et al. 2003)

Durch radikalische Kettenreaktionen der Basen- bzw. Desoxyribose-Derivate finden unter geeigneten Bedingungen sehr umfangreiche Schädigungen statt (Chatgililoglu und O'Neill 2001). Neben den zum Teil reparablen Modifizierungen können bei einem großen Ausmaß der DNA-Schädigung Zellentartungen, Apoptose und Nekrose auftreten (Abbildung 6.28).

<i>Enzymatische Quellen</i>	<i>Nicht-enzymatische Quellen</i>
Cyclooxygenasen	Eisenreduktion durch Elektronenspender
Oxidasen	Ionisierende Strahlung
Lipoxygenasen	Ozon
NADPH-Cytochrom P450 Reduktase	Photodynamische Reaktionen

Tabelle 6.4 Auslöser der Lipidperoxidation (nach Girotti 1990)

Zunächst wird bei der radikalischen Lipidperoxidation ein Wasserstoffatom von einem ungesättigten Fettsäurerest entzogen. Diese Abstraktion kann durch photochemisch erzeugte reaktive Sauerstoff-Radikale oder durch direkten Entzug eines Wasserstoffatoms bzw. eines Elektrons und nachfolgender Protonen-Abspaltung erfolgen, wobei sowohl der Entzug von Wasserstoffatomen als auch der von Elektronen durch Photosensibilisatormoleküle im angeregten Triplett-Zustand ausgelöst werden kann. Aus rein radikalischer Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren bilden sich ausschließlich die konjugierten Hydroperoxo-Derivate (Abbildung 6.29). Dabei resultieren auch weitere Lipidradikale, die auch unter Lichtausschluss Hydroperoxo-Derivate bilden, so dass ein Teufelskreis entsteht, wenn geeignete Schutzmechanismen nicht existieren. Limitiert wird die Lipidperoxidation durch die Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff und die Anwesenheit von lipophilen Radikalfängern wie z. B. α -Tocopherol (Girotti 1990). Die entstandenen Hydroperoxide werden ebenfalls durch Ein-Elektronen-Reduktion (Zunahme der Schädigung, analog zur Abbildung 6.14) und Zwei-Elektronen-Reduktion (Entgiftung, analog zur Abbildung 6.15) umgesetzt (Girotti 1998). Über komplexe radikalische Mechanismen entstehen diverse Abbauprodukte (Vollhardt und Schore 2000). Malondialdehyd (MDA, Abbildung 6.30) bildet sich dabei als Hauptprodukt der Lipidperoxidation. Es liegt in wässriger Lösung als tautomeres β -Hydroxyacrolein vor und besitzt als neutrales Teilchen sowohl sehr stark elektrophile als auch nukleophile Eigenschaften (Marnett 2002). Diese Eigenschaften erlauben nicht nur Reaktionen mit zellulären Nukleophilen sondern auch Selbstkondensation unter Ausbildung von MDA-Oligomeren. Malondialdehyd selbst und einige MDA-Oligomere sind mutagen und karzinogen. Malondialdehyd reagiert unter Adduktbildung mit Adenin, Guanin und Cytosin (Abbildung 6.31).

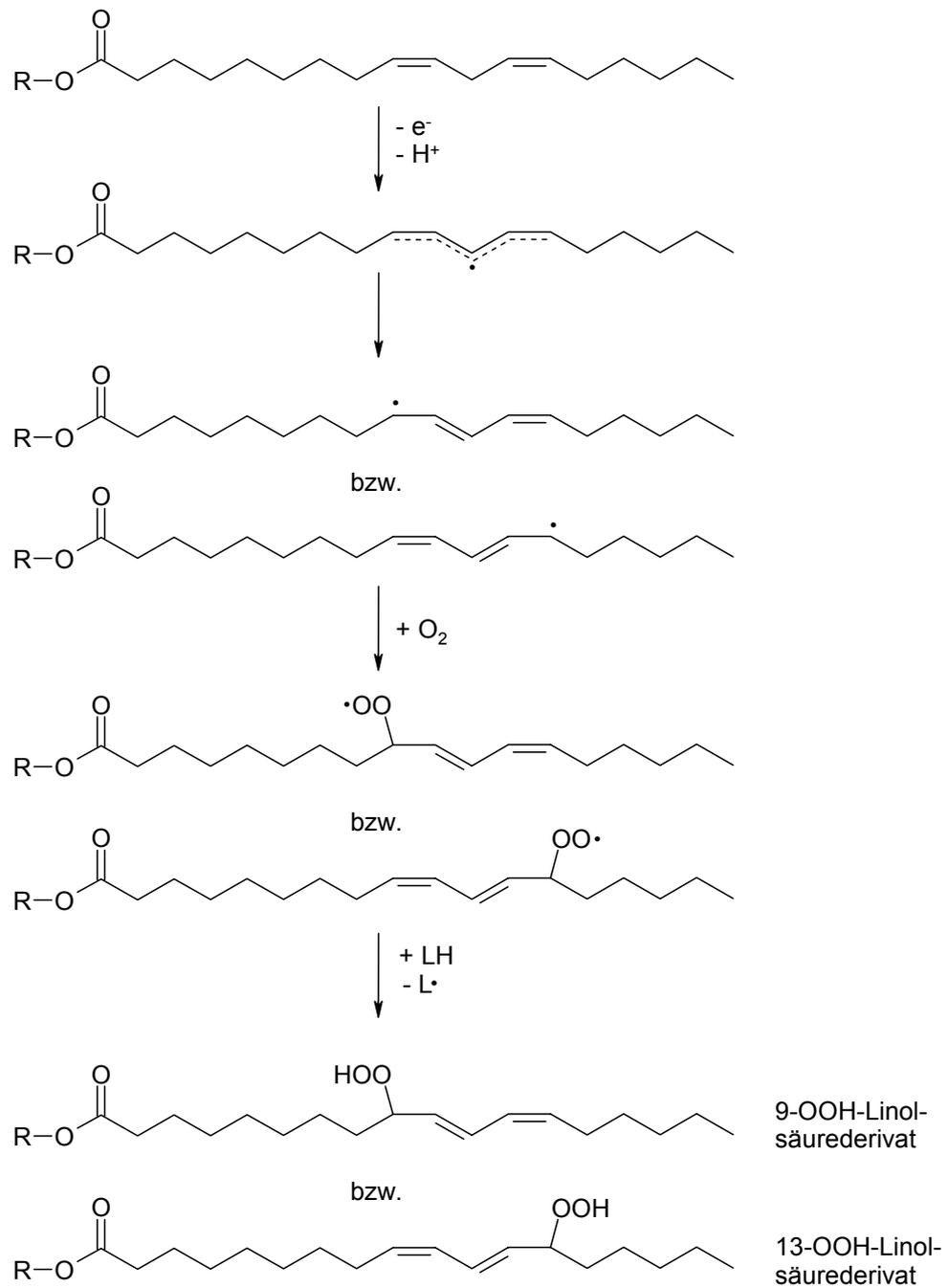


Abbildung 6.29 Radikalische Lipidperoxidation einer Linolsäuregruppe innerhalb eines Phospholipids

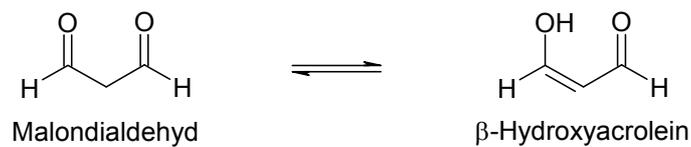


Abbildung 6.30 Malondialdehyd-Tautomerie

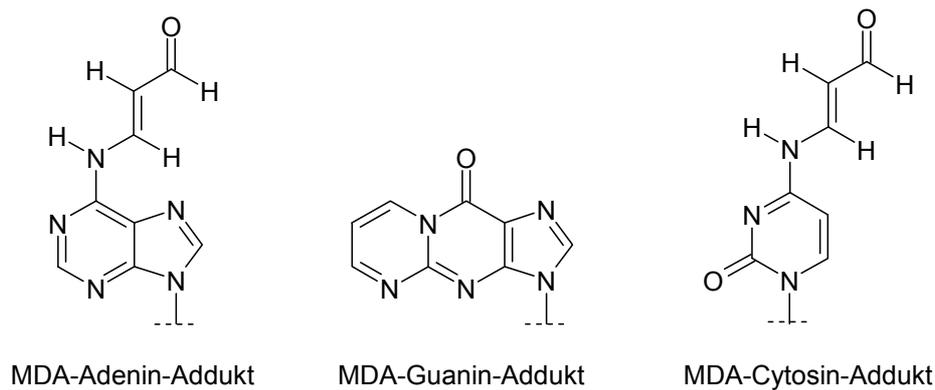


Abbildung 6.31 Monomere Addukte von Malondialdehyd (MDA) und Nukleinbasen (nach Marnett 2002)

Das MDA-Guanin-Addukt wird ca. fünffach schneller gebildet als das MDA-Adenin-Addukt, wohingegen das MDA-Cytosin-Addukt nur in Spuren erzeugt wird. Für MDA-Guanin-Addukte sind G→A-, G→T- und im geringen Ausmaß G→C-Mutationen gefunden worden. Damit existiert ein Zusammenhang zwischen Lipidperoxidation und genetischen Schädigungen (Marnett 2002). Malondialdehyd konnte ebenfalls auch in Membranen nachgewiesen werden, die mit Porphyrinen bzw. Psoralenen und UVA-Bestrahlung behandelt worden sind (Carraro und Pathak 1988). Malondialdehyd fungiert als ein weiterer Biomarker für den oxidativen Stress (Urso und Clarkson 2003).

Wirken reaktive Sauerstoff-Spezies auf Cholesterol ein oder werden bei photochemischen Prozessen Elektronen von Cholesterol-Molekülen entzogen, so entstehen in rein radikalischen Reaktionen die 7 α - und 7 β -Hydroperoxo-Derivate (Abbildung 6.32). Die entstandenen Cholesterol-Hydroperoxide weisen zytotoxische und mutagene Eigenschaften auf, z. B. durch Beeinträchtigung der Membranstruktur, aber auch durch anschließende Ein-Elektronen-Reduktion einschließlich weiteren radikalischen Abbaureaktionen (Girotti 1992).

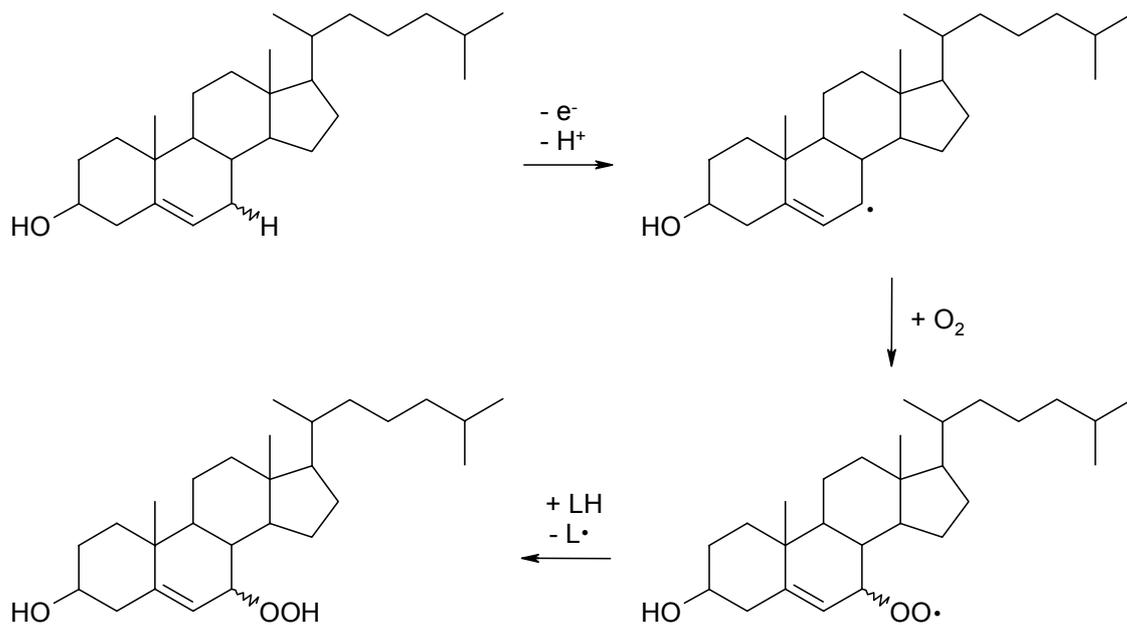


Abbildung 6.32 Peroxidation des Cholesterols zu den 7α - und 7β -Hydroperoxo-derivaten (nach Girotti 1990 und Girotti 2004)

6.2.2 Photoproduktion von Superoxidradikalanionen durch Psoralene

6.2.2.1 Methode

Das Ausmaß der Photoproduktion von Superoxidradikalanionen durch Psoralene wurde gemäß den Methoden von Beauchamp und Fridovich 1971 und Kirby und Fridovich 1982 ermittelt. Dabei nutzt man die Fähigkeit von Superoxidradikalanionen aus, den gelben Farbstoff Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT) zu einem blau gefärbten Formazan (FMZ) zu reduzieren (Abbildung 6.33).

Dieses Prinzip wird häufig zur Detektion von Superoxidradikalanionen, die aus photodynamischen Reaktionen stammen, ausgenutzt (Moore und Wang 1998). Man beobachtet die Zunahme der Absorption bei 560 nm durch das blaue Formazan. Sie stellt ein direktes Maß für die Photoproduktion von Superoxidradikalanionen dar (Beauchamp und Fridovich 1971).

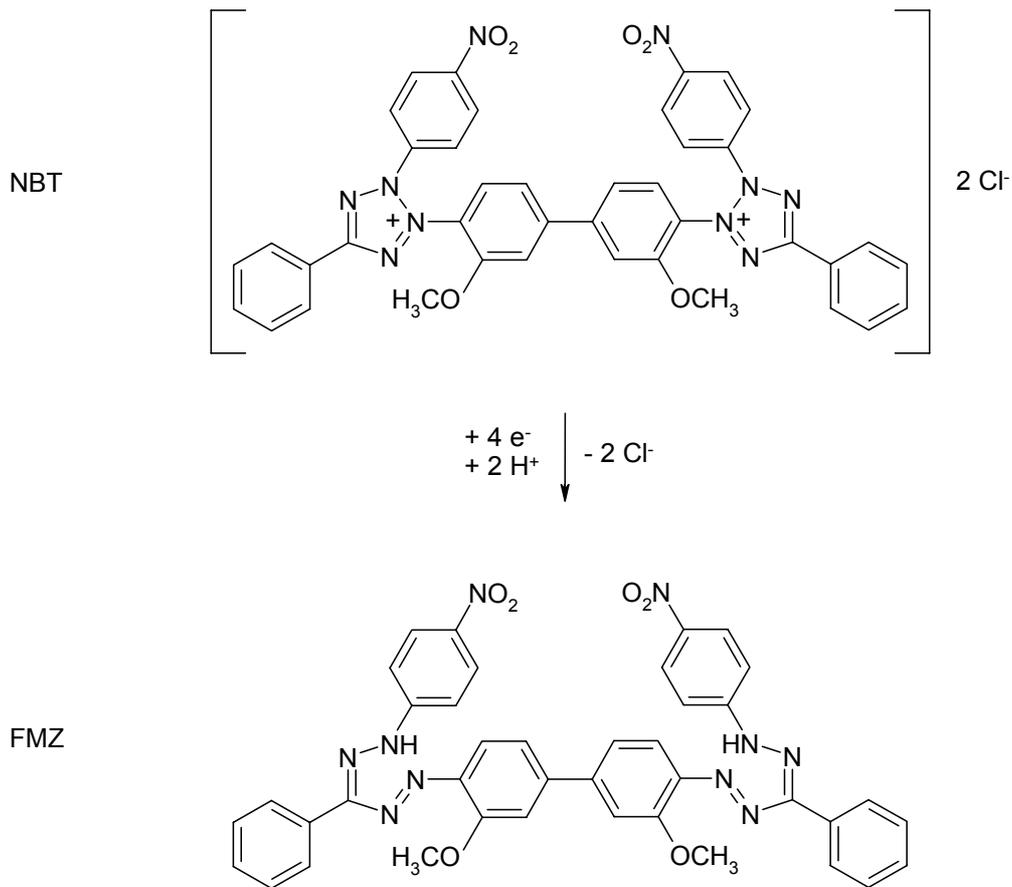
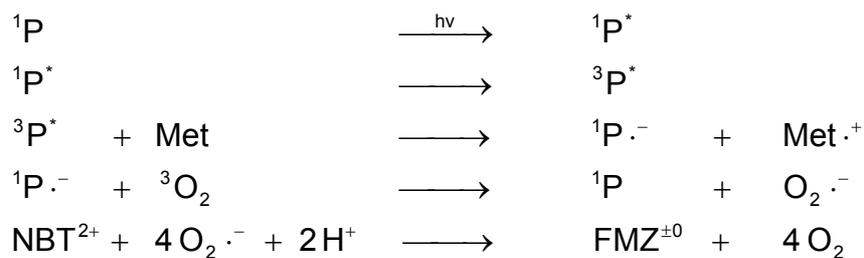


Abbildung 6.33 Reduktion von Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (nach Cooper 1981)

Grundsätzlich ist auch ein direkter Elektronentransfer zwischen einem angeregten Photosensibilisatormolekül und Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid möglich, wobei diese direkte Reduktion ohne Beteiligung von Superoxidradikalanionen eher bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen abläuft (Moore und Wang 1998). Als Elektronenspender dient die Aminosäure Methionin (Met), so dass man für den Gesamtprozess folgende Reaktionen formulieren kann:



Die dabei freigesetzten Methionin-Radikalkationen werden nach Anlagerung von Sauerstoff in radikalischen Folgereaktionen bis zum Methionin-Sulfoxid oxidiert (Dean et al. 1997). Die Selektivität auf Superoxidradikalanionen wurde bei Experimenten mit Hilfe des Enzyms Superoxiddismutase gezeigt.

Der folgende K^+ -Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,8) wurde verwendet (Tabelle 6.5):

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration (mM)</i>	<i>Einwaage (g/l)</i>
KH_2PO_4	1,3	0,1769
K_2HPO_4	8,6	1,4979

Tabelle 6.5 Einwaagen 0,01 M K^+ -Phosphatpuffer pH 7,8

Zunächst wurden ca. 950 ml bidestilliertes Wasser zu den Salzen gegeben und der pH-Wert der Lösung mit Phosphorsäure auf pH 7,8 eingestellt. Anschließend wurde auf 1000 ml aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Der so hergestellte Puffer wurde eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt und vor Verwendung mit einem 0,2 μm Sterilfilter filtriert.

Frisch hergestellt wurden die Lösungen, die in Tabelle 6.6 aufgeführt sind.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Einwaage</i>
Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid	1,5 mM	Puffer	6,1323 mg/5 ml
L-Methionin	10 mM	Puffer	14,921 mg/10 ml
Psoralene bzw. Riboflavin	1 mM	Methanol	entsprechend

Tabelle 6.6 Verwendete Lösungen für die Superoxidradikalanion-Bestimmung

Die Lösungen wurden folgendermaßen in Mikrotiterplatten mit 24 Löchern pipettiert: 840 μl Puffer, 100 μl Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid-Lösung, 50 μl L-Methionin-Lösung und 10 μl der Psoralen- bzw. Riboflavin-Lösung. Riboflavin als starker Photoproduzent von Superoxidradikalanionen diente als Positiv-Kontrolle (Pathak und Joshi 1984). Die Endkonzentrationen betragen: 150 μM Nitro-Blau-Tetrazolium-

Chlorid, 500 μM L-Methionin, 10 μM Psoralen-Derivat bzw. Riboflavin, 1% Methanol. Es wurden zusätzlich Blindwerte ohne Psoralen-Derivat bzw. Riboflavin vermessen, um die schwache Methionin-vermittelte Photoreduktion des Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid zu erfassen.

Sofort nach dem Pipettieren wurden Proben in Einmal-Halbmikroküvetten überführt und die Absorption bei 560 nm gegen Puffer gemessen. Die Küvetten sind nach der Messung mitsamt der Lösung verworfen worden. Die Mikrotiterplatten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einer Bestrahlungsstärke von 1,2 mW/cm^2 in einem Abstand von 37,5 cm unter der Heraeus Original Hanau Fluotest Lampe bestrahlt. Nach fünf, zehn, zwanzig und dreißig Minuten sind ebenfalls Proben nach Überführung in Einmal-Halbmikroküvetten photometrisch vermessen worden. Es wurden mindestens vier Bestimmungen durchgeführt.

6.2.2.2 Ergebnisse

Als Blindwert wurde die unter Bestrahlung schwache Methionin-vermittelte Eigenreduktion des Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid mit den eigentlichen Proben verrechnet, so dass man für Riboflavin und die Psoralene die letztendlich gültigen korrigierten Absorptionen erhielt (Abbildungen 6.34 und 6.35).

Zum Vergleich wurde die Absorption des Riboflavins nach 30 Minuten als 1 gesetzt und die relative Superoxidradikalanionen-Photoproduktion als Quotient der Absorptionen der Psoralen- und der Riboflavin-Proben nach 30 Minuten berechnet (Abbildung 6.36). Die Sequenz Riboflavin >> Psoralen > Psora-3 \approx Psora-4 > 5-MOP \approx 8-MOP wurde damit für den Umfang der Photoproduktion an Superoxidradikalanionen bestimmt.

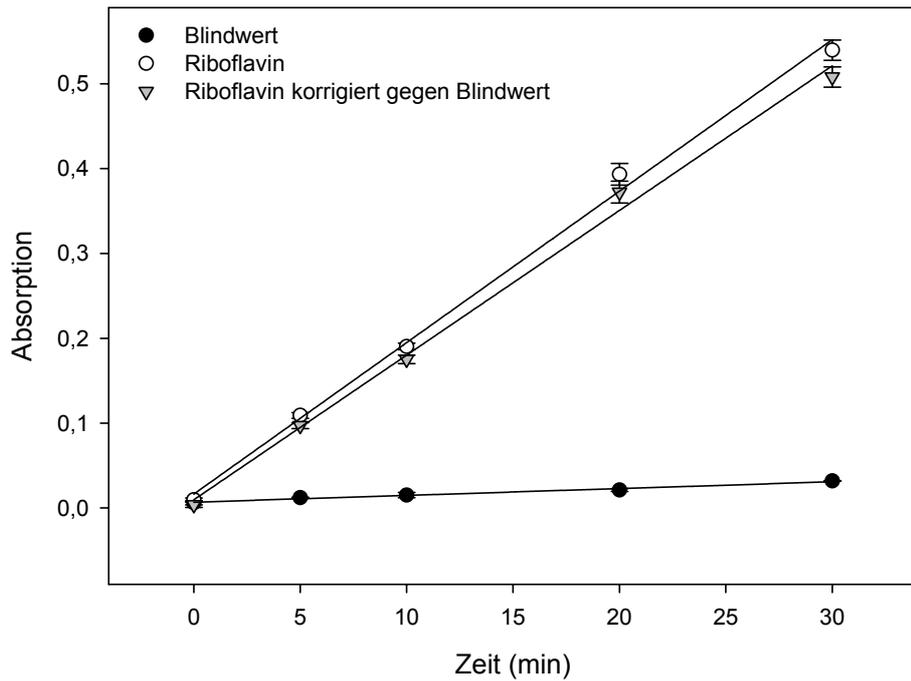


Abbildung 6.34 Zeitverlauf der Absorptionszunahme unter Bestrahlung durch Riboflavin bzw. Eigenreduktion des Nitro-Blau-Tetrazolium (Blindwert)

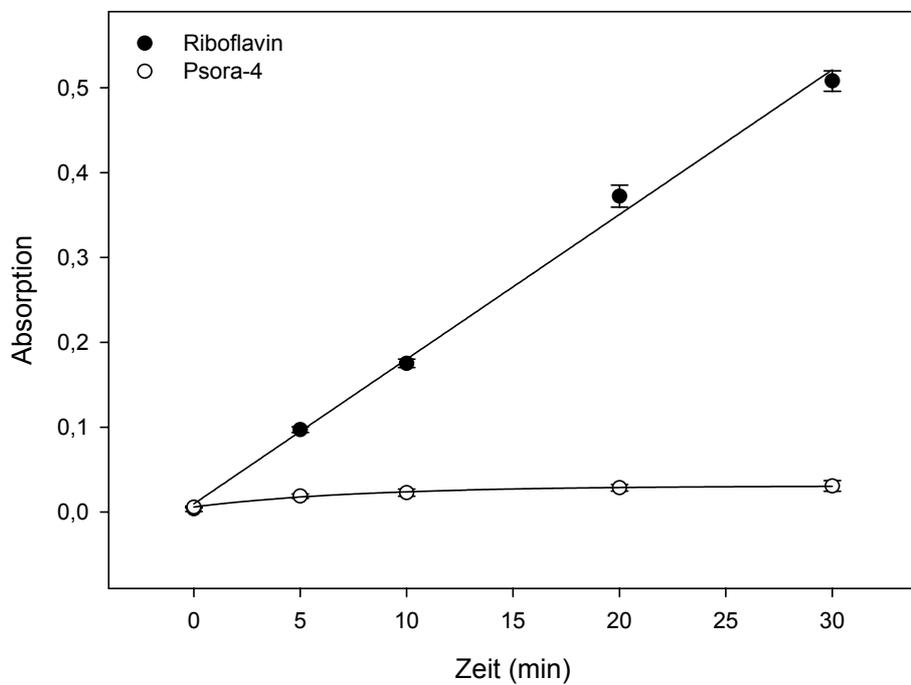


Abbildung 6.35 Korrigierter zeitlicher Verlauf der Absorptionszunahme durch Riboflavin und Psora-4 im Vergleich

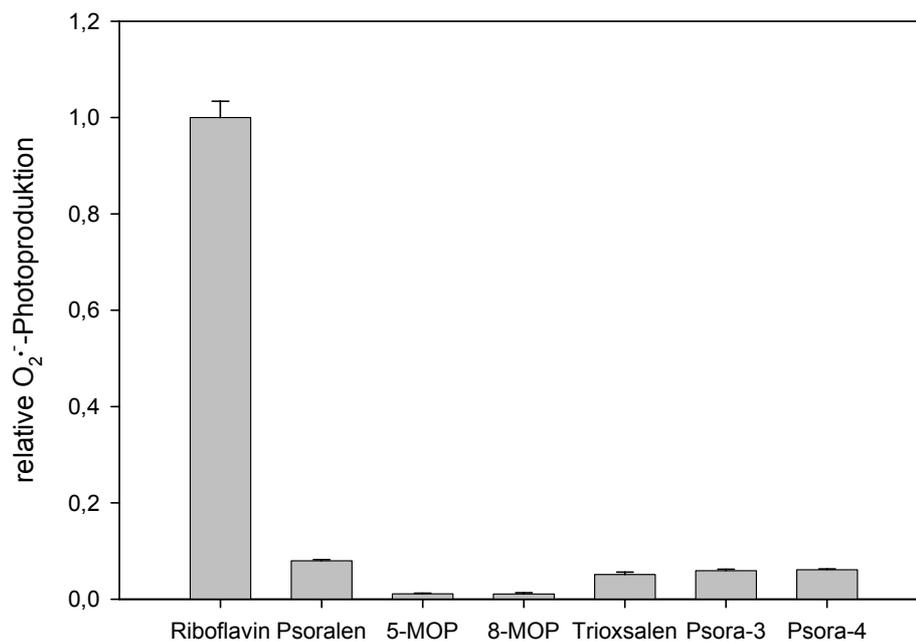


Abbildung 6.36 Relative Superoxidradikalanionen-Photoproduktion durch Riboflavin und Psoralene

6.2.2.3 Diskussion

Die Abfolge Riboflavin \gg Psoralen $>$ Trioxsalen $>$ 5-MOP \approx 8-MOP für die Photoproduktion von Superoxidradikalanionen konnte entsprechend den Ergebnissen von Pathak und Joshi 1984 reproduziert werden. Aufgrund der Verwendung eines Carbonat-Puffers (pH 10) beobachteten die Autoren deutlich höhere Intensitäten für alle untersuchten Psoralene.

Da man davon ausgehen kann, dass ein pH 7,8 Phosphat-Puffer deutlich näher an der physiologischen Situation als ein pH 10 Carbonat-Puffer liegt, scheinen Psoralene im Vergleich zu anderen Photosensibilisatoren unter Bestrahlung insgesamt eher schwach oder überhaupt nicht Superoxidradikalanionen zu produzieren. Die Bedeutung von Superoxidradikalanionen im Rahmen von Photosensibilisierungsreaktionen durch Psoralene vermag deswegen im Vergleich zu anderen möglichen Reaktionen, z. B. durch Singulett-Sauerstoff, untergeordnet zu sein. Llano et al. 2003 wiesen darauf hin, dass Superoxidradikalanionen als Quencher des Triplett-Zustands von Psoralenen auftreten und somit effektiv die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies unterbinden. Dass Psoralene nicht in der

Lage sind, reaktive Sauerstoff-Spezies wie Superoxidradikalanionen zu bilden, wurde auch von einer Reihe anderer Autoren gezeigt (z. B. Gasparro et al. 1997 und Knox et al. 1986). Für die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 kann man also ableiten, dass *in vivo* die Photoproduktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies keine bzw. nur eine sehr geringe Rolle spielt.

6.3 Quervernetzung von DNA

Die Photoaddition an Pyrimidin-Nukleinbasen stellt diejenige Reaktion von Psoralenen dar, über die am meisten bekannt ist (Averbeck 1989). Ein Beleg dafür ist sicherlich auch die Tatsache, dass ganze Bücher sich dieser Thematik annehmen (z. B. Psoralen DNA Photobiology Band 1, 1988, herausgegeben von F. P. Gasparro, CRC Press). Schon im Jahre 1966 wurde diese Reaktion zum ersten Mal nachgewiesen und als Erklärung für die Photosensibilisierung herangezogen (Musajo 1967). Seitdem erschienen sehr viele Studien, die dieses Thema bearbeiteten (Auswahl in Tabelle 6.7).

<i>Jahr</i>	<i>Autoren</i>	<i>Thema</i>
1969	Rodighiero et al.	Verhältnis Photosensibilisierung zur DNA-Photoreaktion
1971	Dall'Acqua et al.	DNA-Psoralen-Diaddukte (Quervernetzung)
1978	Bohr und Lerche	DNA-Psoralen-Diaddukte mit Elektronenmikroskop visualisiert
1979	Dall'Acqua et al.	Kinetik der Photoreaktion
1986	Averbeck und Papadopoulo	DNA-Psoralen-Diaddukte in Hefezellen genotoxischer als DNA-Psoralen-Monoaddukte
1987	Sage und Moustacchi	DNA-Addukte hauptsächlich an AT-reichen Stellen innerhalb der DNA
1988	Sasaki et al.	Aufnahme von Psoralenen in den Zellkern menschlicher Zellen
1989	Demaret et al.	Geometrie der interkalierten Psoralene
1991	Sage und Bredberg	ATAT/TATA Hauptort von Mutationen durch 8-MOP
1994	Aubin et al.	Abhängigkeit immunologischer Effekte von Psoralen-DNA-Bindung bei PUVA
1995	Gunther et al.	DNA-Psoralen-Diaddukte in Säugetierzellen genotoxischer als DNA-Psoralen-Monoaddukte
1997	Sastry et al.	DNA-Psoralen-Protein-Quervernetzung
1998	Cullinane und Bohr	keine Reparatur von DNA-Psoralen-Diaddukten in Säugetier-Mitochondrien
2000	Di Noto et al.	Photoreaktion ggü. synthetischen Oligonukleotiden
2001	Eichman et al.	Kristallstruktur von mit Psoralenen quervernetzter DNA
2003	Bessho	DNA-Doppelstrangbrüche durch Psoralen-DNA-Quervernetzung

Tabelle 6.7

Einige Studien zur Reaktion von Psoralenen mit DNA

6.3.1 Photoaddition von Psoralenen an DNA

Nachdem 1969 Rodighiero et al. zunächst einen Zusammenhang zwischen photosensibilisierender Aktivität und der Photoreaktivität gegenüber DNA diskutierten, konnte 1970 durch dieselbe Gruppe eine Korrelation zwischen diesen beiden Größen aufgestellt werden. Bis Anfang der achtziger Jahre galt die Meinung, dass die Photoreaktion in der Haut nur von der Fähigkeit zur Photoaddition an DNA abhängt (Vedaldi et al. 1983). Seitdem sind viele weitere Photoreaktionen von Psoralenen nachgewiesen worden, die ebenfalls für die Photosensibilisierung in der Haut verantwortlich sind.

Die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen Pyrimidin-Nukleinbasen und Psoralenen (8-MOP) unter Bestrahlung ist in Abbildung 6.37 dargestellt. Thymin ist diejenige Nukleinbase, die am häufigsten diese Photoaddition eingeht. Diese Reaktion findet seltener auch mit Cytidin statt. Purin-Basen werden normalerweise nicht angegriffen (Averbeck 1989). Als erstes entsteht ein nicht-kovalenter Komplex mit schwachen Bindungen zwischen 8-MOP und Thymin. Dazu tritt die C=C-Doppelbindung des Thymin mit der C=C-Doppelbindung aus dem Furanring oder aus dem Pyranring in Wechselwirkung. Dementsprechend resultieren unter UVA-Bestrahlung nach einer [2+2]-Photocycloaddition zwei verschiedene Reaktionsprodukte, das Furanring-Monoaddukt und das Pyranring-Monoaddukt. Ausschließlich das Furanring-Monoaddukt kann durch Absorption eines zweiten Photons mit einem weiteren Thymin-Molekül, das in der Regel Teil des gegenüberliegenden DNA-Einzelstrangs ist, eine zusätzliche [2+2]-Photocycloaddition zum Diaddukt eingehen und damit eine Quervernetzung der komplementären DNA-Einzelstränge („Interstrand Cross-Linking“) auslösen. Monoaddukte werden generell leichter gebildet als Diaddukte und die entstandenen Cyclobutan-Derivate, sowohl der Mono- als auch der Diaddukte, weisen bei Psoralenen meistens den *cis-syn*-Typ auf (Eichman et al. 2001, Averbeck 1989). Die [2+2]-Photocycloaddition findet aus dem angeregten Triplett-Zustand des jeweiligen Psoralens statt (Bensasson et al. 1978). Sowohl Mono- als auch Diaddukte sind für den Verlust von Zellfunktionen wie z. B. DNA-Replikation oder DNA-Transkription und für die Induktion von Mutationen verantwortlich (Moreno 1986), zeigen dies aber mit unterschiedlichen Intensitäten und Mechanismen.

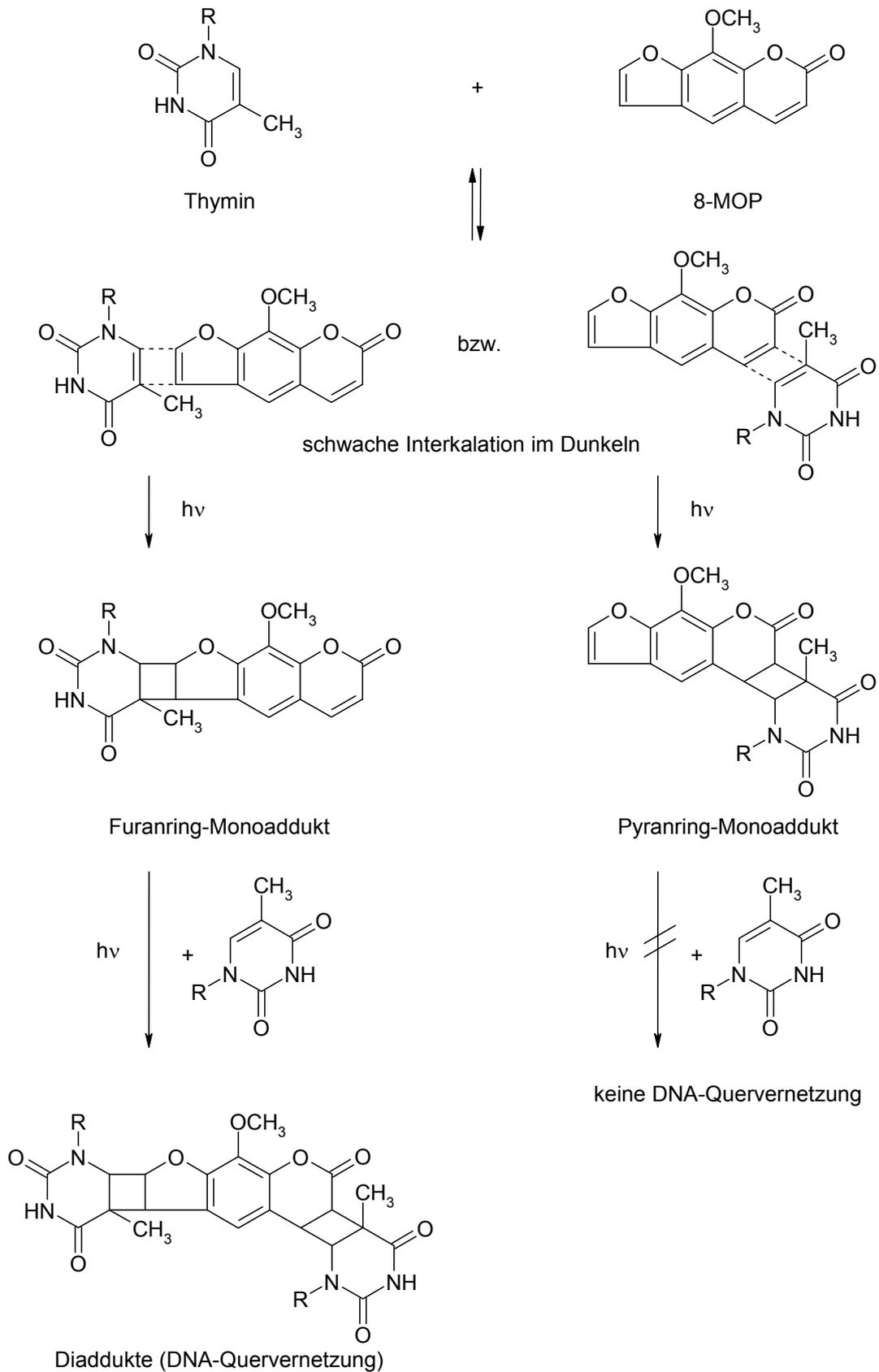


Abbildung 6.37 Photoaddition von 8-MOP an Thymin in DNA (R = DNA-Rückgrat, nach Averbeck 1989 und Johnson 1984)

Entscheidend ist deshalb, zwischen den Effekten, die durch Mono- und Diaddukte hervorgerufen werden, zu unterscheiden (Averbeck 1989).

Psoralene addieren sich in erster Linie an DNA-Stellen, die zum großen Teil aus AT-Sequenzen bestehen (Sage und Moustacchi 1987), dies gilt sowohl für Mono- als auch Diaddukte. Zusätzlich ist die DNA-Quervernetzung durch Diaddukte abhängig von den Nucleotiden, die sich in der direkten Nachbarschaft der AT-Sequenz befinden, und der weiteren Sequenz (Boyer et al. 1988). In Abbildung 6.38 soll schematisch die Ausbildung von Diaddukten in einer AT-Mehrfachabfolge, einem „Hot-Spot“ für Quervernetzung (Averbeck 1989), gezeigt sein.

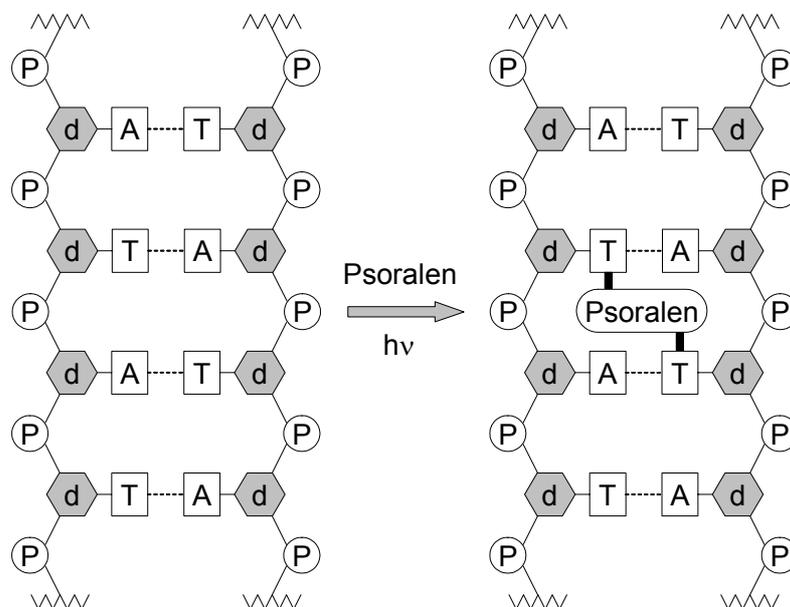


Abbildung 6.38 DNA-Quervernetzung durch Psoralene und UVA-Bestrahlung (P = Phosphat-Rest, d = Desoxyribose-Rest, A = Adenin-Rest, T = Thymin-Rest)

Wenn Psoralen-Derivate nur Monoaddukte und keine Diaddukte ausbilden können, so spricht man von monofunktionellen Psoralenen. Im Gegensatz dazu stehen die bifunktionellen Psoralene, die sowohl Monoaddukte als auch Diaddukte unter Bestrahlung erzeugen. Um kurzfristige (Photoirritation) und langfristige (Photokarzinogenität) Wirkungen eines Psoralen-Derivats abzuschätzen, muss bekannt sein, ob es sich bei derjenigen Verbindung um eine mono- oder bifunktionelle Verbindung handelt (Averbeck 1989).

Ob eine Verbindung eine Bifunktionalität aufweist, kann mit DNA-Phasenübergangsstudien nach Dall'Acqua et al. 1971 nachgewiesen werden.

6.3.2 Phasenübergangsverhalten von DNA

DNA liegt unter normalen Bedingungen als Doppelhelix vor, die sowohl durch die Basenpaarung als auch die Basenstapelung stabilisiert wird. Die beiden Stränge einer DNA-Doppelhelix trennen sich, wenn die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen gebrochen werden. Dies kann physiologisch durch Enzyme und experimentell durch Temperaturerhöhung oder Zugabe von Säuren bzw. Basen, die eine Ionisation der Nukleinbasen bewirken, erfolgen. Das Aufwinden der Doppelhelix wird Schmelzen genannt, dieser Vorgang ist in Abbildung 6.39 dargestellt.

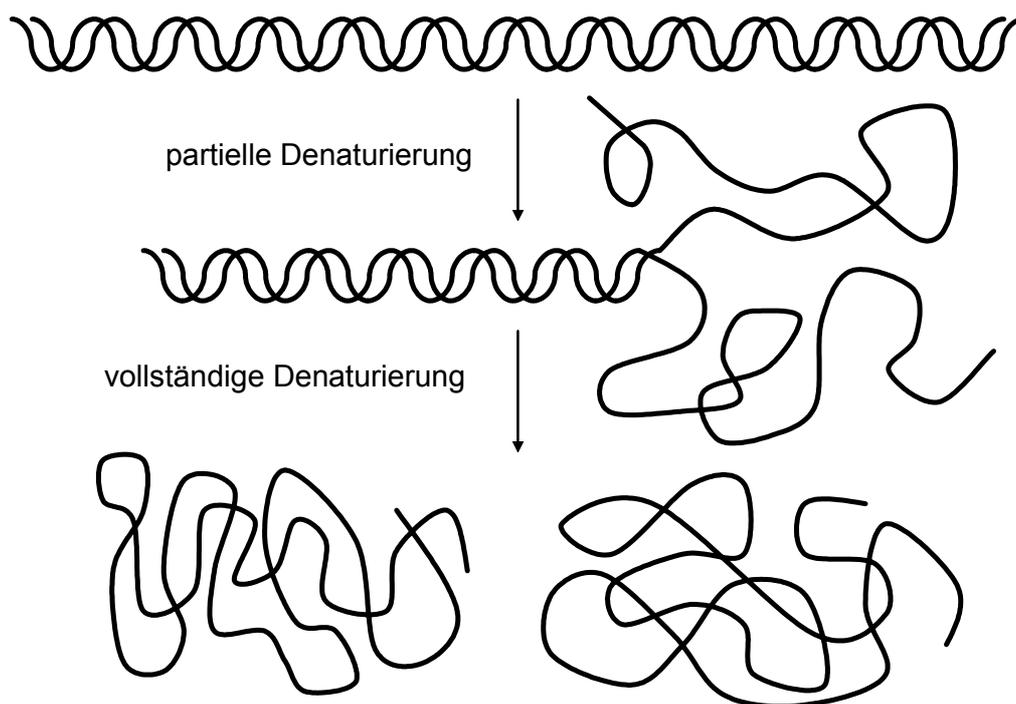


Abbildung 6.39 Phasenübergang (Denaturierung, Schmelzen) der DNA-Doppelhelix zu zwei getrennten DNA-Einzelknäueln durch Temperaturerhöhung (modifiziert nach Lehninger et al. 1994)

Die Schmelztemperatur (Schmelzpunkt, „Temperature of melting“, T_m -Wert) ist diejenige Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verloren gegangen ist bzw. die Hälfte aller Nukleinbasen ungepaart vorliegt. Sie hängt stark von der

Basenzusammensetzung ab. DNA mit vielen GC-Basenpaaren besitzt einen höheren Schmelzpunkt als DNA mit überwiegend AT-Basenpaaren, da GC-Basenpaare drei und AT-Basenpaare zwei Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen. Folglich schmelzen AT-reiche DNA-Bezirke zuerst (Stryer 1999a).

Lagern sich zwei DNA-Einzelstränge zu einer Doppelhelix zusammen, so stellt sich eine geringere Absorption ein (Hypochromie). Die übereinander gelagerte Stapelung der Purin- und Pyrimidin-Basen bewirkt eine geringere Übergangswahrscheinlichkeit der π -Elektronen in den angeregten Zustand und damit eine Abnahme des molaren Absorptionskoeffizienten (Stapeleffekt). Ferner spielen bei dem Stapeleffekt auch Dipol-Dipol-, Dispersions- und hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle. Dementsprechend kann man bei einer Denaturierung eine Absorptionzunahme beobachten (Hyperchromie). Üblicherweise wird die Absorption bei 260 nm gemessen, da in diesem Bereich auch die Absorptionsmaxima der Purin- und Pyrimidin-Basen liegen (Ebert 1992). Wird der Absorptionsverlauf gegen die Temperatur aufgetragen, erhält man typische sigmoidale Schmelzkurven. Der Schmelzpunkt ist diesbezüglich als die Temperatur definiert, bei der die halbmaximale Änderung der Absorption der Schmelzkurve erreicht wird (Winter und Noll 1998).

Eine Reihe von planaren, aromatischen Ringsystemen (Abbildung 6.40) können sich zwischen die Basenpaare der DNA einlagern. Diesen Vorgang bezeichnet man als Interkalation. Durch π -Elektronenwechselwirkungen zwischen den Aromaten und den Basen und möglicherweise auch durch hydrophobe Effekte wird die Konformation der DNA-Doppelhelix stabilisiert. Damit verschiebt sich der Schmelzpunkt zu höheren Temperaturen (Ebert 1992).

Gibt man Psoralene im Dunkeln in eine DNA-Lösung, so ergeben sich aufgrund der geringen Stärke der Wechselwirkungen meistens keine oder nur sehr marginale Veränderungen des Schmelzpunkts. Die klassischen Psoralene stellen deswegen in der Regel nur sehr schwache Interkalatoren dar. Der Schmelzpunkt erhöht sich jedoch bei bifunktionellen Psoralenen durch Ausbildung von DNA-Quervernetzung nach UVA-Bestrahlung. Da hier im Gegensatz zu den oben erwähnten klassischen Interkalatoren kovalente Bindungen aufgebaut werden, kann sich die DNA-

Doppelhelix auch bei höheren Temperaturen nicht mehr vollständig in Einzelstränge aufteilen. Daraus resultiert eine insgesamt schwächere Absorptionzunahme während der Denaturierung (Dall'Acqua et al. 1971). Die Verschiebung des Schmelzpunkts zu höheren Temperaturen nach Bestrahlung (ΔT_m) ist letztendlich das Maß für die Photoquervernetzung durch Psoralene.

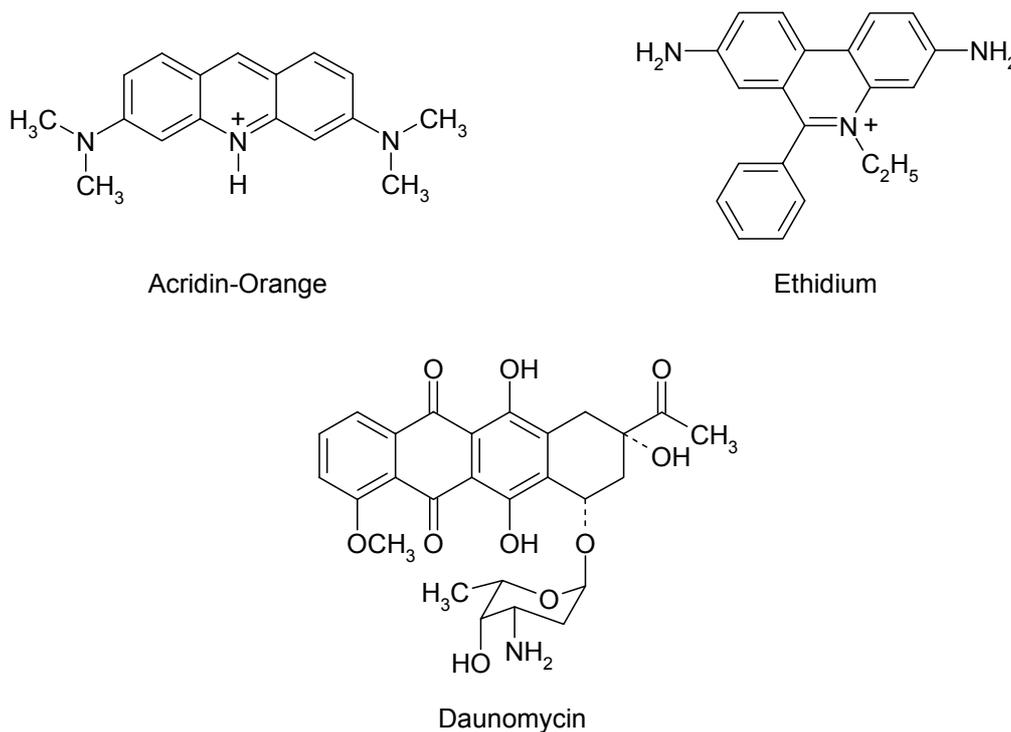


Abbildung 6.40 Eine Auswahl an Interkalatoren (nach Ebert 1992)

6.3.3 Quervernetzung von Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-DNA durch Psoralene

6.3.3.1 Methode

Die DNA-Quervernetzung durch Psoralene wurde leicht modifiziert nach der Methode von Dall'Acqua et al. 1971 gemessen, bei der man das Phasenübergangsverhalten von DNA unter Temperaturerhöhung untersucht. Die Bestimmung des Phasenübergangs und damit des Schmelzpunkts wurde in MOPS-Puffer (Morpholinopropansulfonsäure, 0,1 M, pH 7,2) durchgeführt, der gemäß Tabelle 6.8 hergestellt und vor Verwendung mit einem 0,2 μm Sterilfilter filtriert wurde.

<i>Substanz</i>	<i>Zugabe</i>
MOPS	2,093 g
bidestilliertes Wasser	95 ml
1 N NaOH	5 ml

Tabelle 6.8 Herstellung von 0,1 M MOPS-Puffer

Zur Herstellung der DNA-Stammlösung wurden 2,5 ml MOPS-Puffer zu 25 Einheiten Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT) hinzugefügt. Je 125 µl dieser primären Stammlösung wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -18°C gelagert. Von den Psoralenen wurde jeweils eine 1 millimolare Stammlösung in DMSO frisch hergestellt. Für eine Messung wurden die Lösungen in insgesamt sieben Mikroquarzküvetten entsprechend Tabelle 6.9 pipettiert.

<i>Nr.</i>	<i>Inhalt</i>	<i>Funktion</i>
1	2970 µl MOPS-Puffer 30 µl DMSO	Lösungsmittelabgleich und Messküvette für Thermometer
2	1960 µl MOPS-Puffer 20 µl Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-Lösung 20 µl DMSO	Schmelzpunkt DNA nach Bestrahlung
3	1960 µl MOPS-Puffer 20 µl Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-Lösung 20 µl DMSO	Schmelzpunkt DNA ohne Bestrahlung
4	1960 µl MOPS-Puffer 20 µl Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-Lösung 20 µl Psoralen-Lösung	Schmelzpunkt DNA + Psoralen nach Bestrahlung (I)
5	1960 µl MOPS-Puffer 20 µl Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-Lösung 20 µl Psoralen-Lösung	Schmelzpunkt DNA + Psoralen nach Bestrahlung (II)
6	1960 µl MOPS-Puffer 20 µl Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-Lösung 20 µl Psoralen-Lösung	Schmelzpunkt DNA + Psoralen ohne Bestrahlung (I)
7	1960 µl MOPS-Puffer 20 µl Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-Lösung 20 µl Psoralen-Lösung	Schmelzpunkt DNA + Psoralen ohne Bestrahlung (II)

Tabelle 6.9 Inhalt und Funktion der Mikroquarzküvetten

Die Probenküvetten enthielten damit 0,1 U/ml Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT), 1% DMSO und sofern vorhanden 10 μ M des jeweiligen Psoralens. Die Küvetten 1, 3, 6 und 7 wurden 30 Minuten im Dunkeln aufbewahrt, die Küvetten 2, 4 und 5 wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einer Bestrahlungsstärke von 3,5 mW/cm² in einem Abstand von 20 cm mit einer Heraeus Original Hanau Fluotest Lampe bestrahlt. Anschließend wurden alle Küvetten in den temperierbaren Küvetenschlitten des Photometers überführt und auf ca. 38°C vorgeheizt. Nachdem die Küvettenlösungen diese Temperatur erreichten, wurde langsam die Temperatur bis maximal 80°C gesteigert und gleichzeitig die Absorptionsänderung bei 260 nm gemessen.

6.3.3.2 Ergebnisse

Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-DNA, die nicht bestrahlt wurde, zeigte einen Schmelzpunkt von $48,5^{\circ}\text{C} \pm 0,7^{\circ}\text{C}$. Nach Bestrahlung dieser DNA ergab sich ein Schmelzpunkt von $49,2^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Typische Schmelzkurven der reinen DNA sind in Abbildung 6.41 dargestellt.

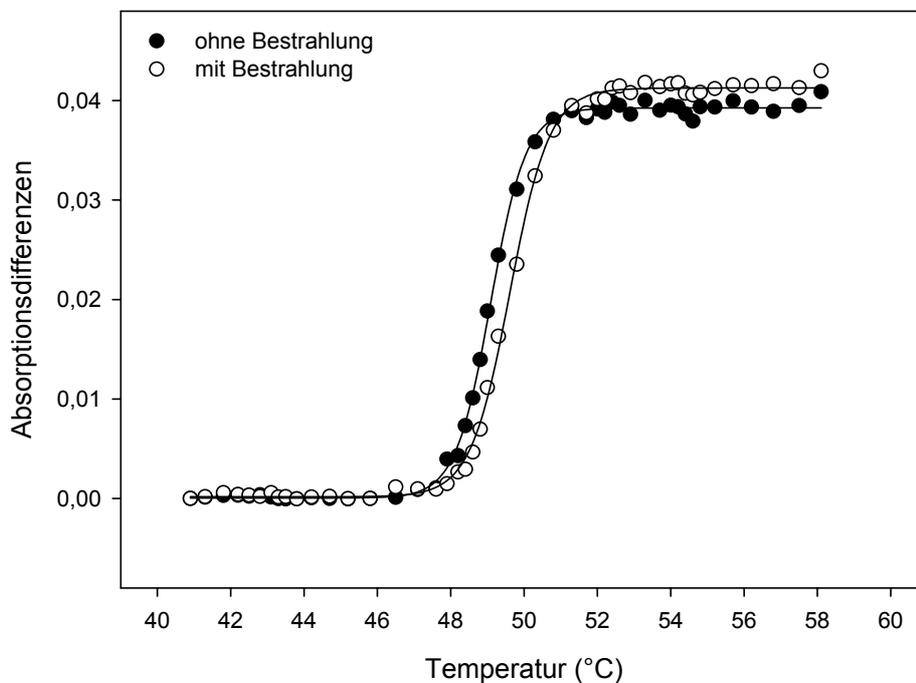


Abbildung 6.41 Schmelzkurven von Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT) ohne und mit Bestrahlung

Die Psoralene verschieben mit $+0,1^{\circ}\text{C}$ bis $+1,0^{\circ}\text{C}$ nach Inkubation im Dunkeln nur minimal den DNA-Schmelzpunkt zu höheren Temperaturen gegenüber unbestrahlter Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT)-DNA. In Relation zu diesen Schmelztemperaturen sind bei den verschiedenen Psoralenen unterschiedlich große Verlagerungen zu höheren Temperaturen nach Bestrahlung (Schmelzpunktdifferenzen ΔT_m in Abbildung 6.42) beobachtet worden. Schmelzkurven für Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT) nach Inkubation mit 5-MOP bzw. Psora-4, ohne und mit Bestrahlung, sind in den Abbildungen 6.43 und 6.44 dargestellt. Für Trioxsalen konnte aufgrund sehr starker DNA-Quervernetzung kein Schmelzpunkt für die Bestrahlungsinubation bestimmt werden. Die höchste Temperatur, bei der keine Helix-Knäuel-Umwandlung stattfand, wurde deshalb für die Berechnung einer minimalen Schmelzpunktdifferenz verwendet. Allgemein gilt, dass die Fähigkeit von Psoralenen zur Photoquervernetzung von DNA umso größer ist, je größer die Schmelzpunktdifferenz ist. Für Psora-3 und Psora-4 resultierte im Gegensatz zu allen anderen gemessenen Psoralenen kein Unterschied zwischen Dunkel- und Bestrahlungsinubation, beide Substanzen können also nicht oder in einem nur sehr geringen Ausmaß komplementäre DNA-Einzelstränge quervernetzen.

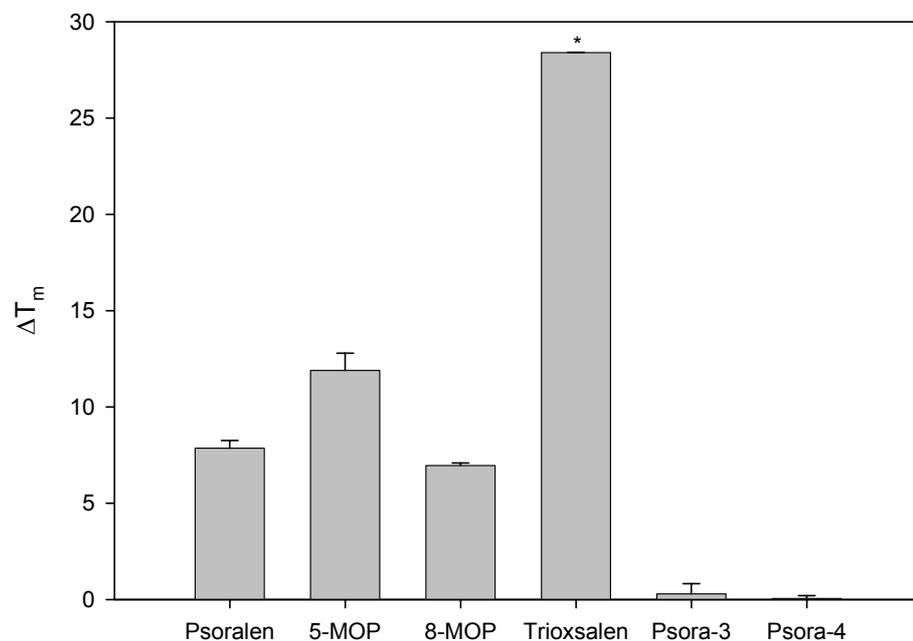


Abbildung 6.42 ΔT_m -Werte (Schmelzpunktdifferenzen zwischen Dunkel- und Bestrahlungsinubation, * = minimale Schmelzpunktdifferenz)

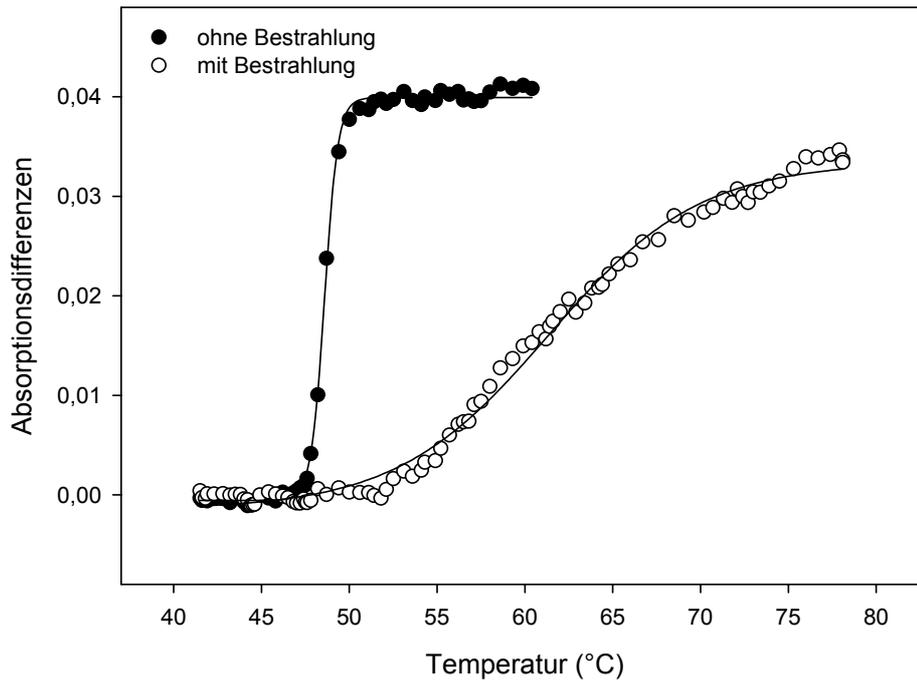


Abbildung 6.43 Schmelzkurven von Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT) nach Inkubation mit 5-MOP ohne und mit Bestrahlung

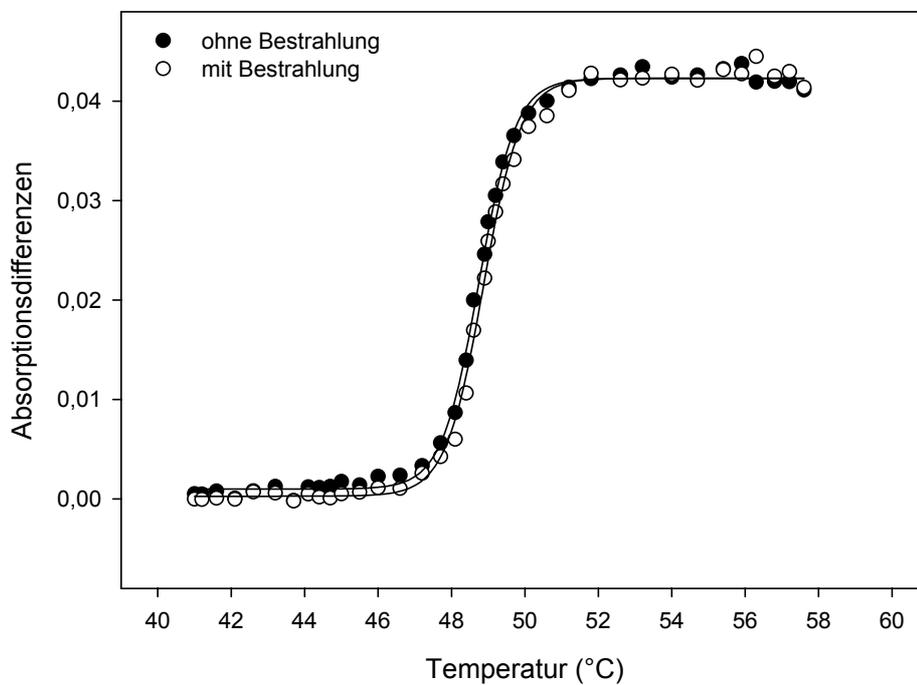


Abbildung 6.44 Schmelzkurven von Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT) nach Inkubation mit Psora-4 ohne und mit Bestrahlung

6.3.3.3 Diskussion

Die Photoaddition zwischen Psoralenen und DNA findet besonders stark in AT-reichen Regionen statt (Sage und Moustacchi 1987). Durch die Verwendung von DNA, die abwechselnd nur Adenin und Thymin enthält, konnte die Empfindlichkeit gesteigert werden. Gleichzeitig besitzt diese DNA einen gegenüber natürlicher DNA sehr geringen Schmelzpunkt. Dies ermöglichte eine geringere Temperaturbelastung der Proben und des Messsystems.

Die untersuchten Psoralene weisen sehr unterschiedliche Schmelzpunktdifferenzen (Abbildung 6.42) auf. Für 5-MOP, 8-MOP und Trioxsalen konnten Werte aus der Literatur reproduziert werden (Körner 2002, Wulff et al. 1998). Die große Schmelzpunktdifferenz für Trioxsalen wird ebenfalls durch die Tatsache bestätigt, dass Trioxsalen generell ein sehr großes Bindungsvermögen an DNA besitzt (Grossweiner 1984) und dass es die höchste Potenz zur Ausbildung von Quervernetzung besitzt (Szafarz 1986). Ebenfalls stimmt die in der Literatur für das Ausmaß der Quervernetzung beschriebene Reihenfolge Trioxsalen > Psoralen > 8-MOP (Szafarz 1986) mit den erzielten Ergebnissen überein.

Gemäß den Ergebnissen und analog zu Berichten aus der Literatur (Averbeck und Papadopoulo 1986, Szafarz 1986) können die Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP und Trioxsalen somit alle als bifunktionell bezeichnet werden. Psora-3 und Psora-4 sind dagegen monofunktionelle Psoralene, da die gemessenen Schmelzpunktdifferenzen sich nicht wesentlich von Null unterscheiden. Für die Beurteilung der Photosensibilisierung durch Psora-3 und Psora-4 ist dies besonders bedeutsam, da monofunktionelle Psoralene geringere photoirritative und photokarzinogene Eigenschaften zeigen (Averbeck 1989).

Aufgrund des großen Platzbedarfs der sperrigen Phenylalkoxy-Reste an Position 5 wird wahrscheinlich die Dunkelinterkalation und damit auch die Quervernetzung der DNA durch die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 verhindert. Dieser Zusammenhang ist für Bergamottin beschrieben worden (Ashwood-Smith et al. 1992). Bergamottin ist ein Molekül, das den Verbindungen Psora-3 und Psora-4 sehr ähnelt, da es ebenfalls an Position 5 mit einem sperrigen Alkoxy-Rest substituiert ist.

Die mit Psora-3 und Psora-4 vergleichbare Geometrie stützt also die oben aufgeführte Hypothese.

6.4 Photolyse von Membranen

Die Zellmembran stellt ein wichtiges Ziel innerhalb von Zellen dar, das im Rahmen von Photosensibilisierungsreaktionen angegriffen wird (Johnson 1984). Als erste postulierten Kittler und Löber 1984, dass Psoralene Membranen unter Bestrahlung beeinträchtigen können. Für die Verbindungsklasse der Psoralene sind mittlerweile Schädigungen von vielen Membrankomponenten nachgewiesen worden (Dall'Acqua und Martelli 1991, Potapenko 1991, Zarebska 1994, Zarebska et al. 1998, Zarebska et al. 2000). Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass Psoralene sich zu einem großen Anteil in der Lipidfraktion von Zellen, den Membranen, aufhalten (Moreno et al. 1982, Beijersbergen van Henegouwen et al. 1989). Bevor ein Photosensibilisatormolekül den Zellkern erreichen kann, stellt die Zellmembran eine erste Barriere und damit auch einen Angriffspunkt für photochemische Prozesse dar (Zarebska 1994). Als Modell für die Membranschädigung wurde der Einfluss von Psoralenen auf Erythrozyten unter UVA-Bestrahlung untersucht.

6.4.1 Aufbau von Biomembranen

Membranen sind für die Funktionstüchtigkeit von Zellen unabdingbar. Die Membranen umschließen die Zellen und trennen sie damit von ihrer äußeren Umgebung. Sie sorgen auch innerhalb einer Zelle für eine Unterteilung in verschiedene Kompartimente bzw. Organellen.

Trotz sehr unterschiedlicher Funktionen besitzen alle biologischen Membranen eine gemeinsame Grundstruktur. Die typische Biomembran besteht aus einer dünnen Schicht von Lipiden und Proteinen, die hauptsächlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Deswegen sind Membranen dynamische, fluide Strukturen, deren Bestandteile sich in der Regel innerhalb der Membran bewegen können. Die Lipidmoleküle bauen eine durchgehende Doppelschicht von ca. 5 nm Dicke auf (Abbildung 6.45), die für die meisten wasserlöslichen Moleküle relativ undurchlässig ist.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Lipidfraktion von Zellen ist das Cholesterol (Abbildung 6.9). Besonders die Membran eukaryotischer Zellen enthält Cholesterol in größeren Mengen. Es dient zur Verstärkung der Permeabilitätsbarriere durch die Lipid-Doppelschicht. Die Hydroxylgruppe des Cholesterols orientiert sich in der Doppelschicht zu den polaren Kopfgruppen der Phospholipide, gleichzeitig interagiert der starre Steroidring mit den Kohlenwasserstoffketten und immobilisiert sie teilweise (Abbildung 6.45). Ferner verhindert Cholesterol auch die Zusammenlagerung und Kristallisation der Kohlenwasserstoffketten (Alberts et al. 2004).

Glykolipide, die aus Fettsäuren und verschiedenen Kohlenhydraten aufgebaut sind, findet man ausschließlich auf der nicht-zytosolischen Seite der Lipiddoppelschicht. Sie sind sehr wichtig für die Wechselwirkungen einer Zelle mit ihrer Umgebung. Für die meisten spezifischen Funktionen von Membranen sind jedoch Proteine verantwortlich. Der Proteinanteil einer Zellmembran beträgt ca. 50%. Die Proteine können unterschiedlich mit der Membran assoziiert sein. In der Regel liegt der in der Membran gebundene Anteil als α -Helix vor. Membranproteine tragen oft Kohlenhydratketten auf der extrazellulären Seite, die den Zellmantel, die sogenannte Glykocalyx, bilden (Alberts et al. 2004).

6.4.2 Photoreaktionen von Psoralenen mit Membrankomponenten

Psoralene können unter Bestrahlung mit den verschiedensten Bestandteilen einer Membran reagieren. Hierbei muss man hierbei zwischen den Reaktionen unterscheiden, die nur in Anwesenheit von Sauerstoff ablaufen, und denen, die auch in Abwesenheit von Sauerstoff stattfinden.

Als erstes sollen die Peroxidationen von Membranbestandteilen diskutiert werden. Psoralene oxidieren sowohl ungesättigte Fettsäuren, Cholesterol als auch Proteine, die sich in der Membran aufhalten. Diese Reaktionen laufen nach einem Typ I- (Elektronentransferreaktionen, Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Radikalen und H_2O_2 , Kapitel 6.2) und nach einem Typ II-Mechanismus (Entstehung von Singulett-Sauerstoff, Kapitel 6.1) ab. Peroxidierete Lipide sind weiterhin in der Lage, Quervernetzungen mit Proteinen und Aminosäuren auszubilden. Als Konsequenz verändert sich die Membranfluidität, Ionen können leichter die Membran passieren,

Enzyme und Rezeptoren werden inaktiviert und die Lyse von Zellen wird eingeleitet (Zarebska 1994).

Es konnte 1984 zum ersten Mal gezeigt werden, dass Psoralene nicht nur mit DNA, sondern auch mit Fettsäuren kovalente Photoaddukte erzeugen können (Kittler und Löber 1984). Im Verlauf weiterer Studien wurden die genauen Strukturen dieser Produkte aufgeklärt (z. B. Caffieri et al. 1987, Specht et al. 1988, Specht et al. 1989, Caffieri et al. 1994). Exemplarisch sei hier aufgeführt, dass der Pyranring des 8-MOP mit Linolensäure aus einem Phospholipid unter Bestrahlung zu einem Cyclobutanderivat reagiert (Abbildung 6.46). Dabei werden mehrere Stereoisomere gebildet. Es sind auch Addukte aus Psoralen-Abbauprodukten und ungesättigten Fettsäuren nachgewiesen worden (Zarebska et al. 2000).

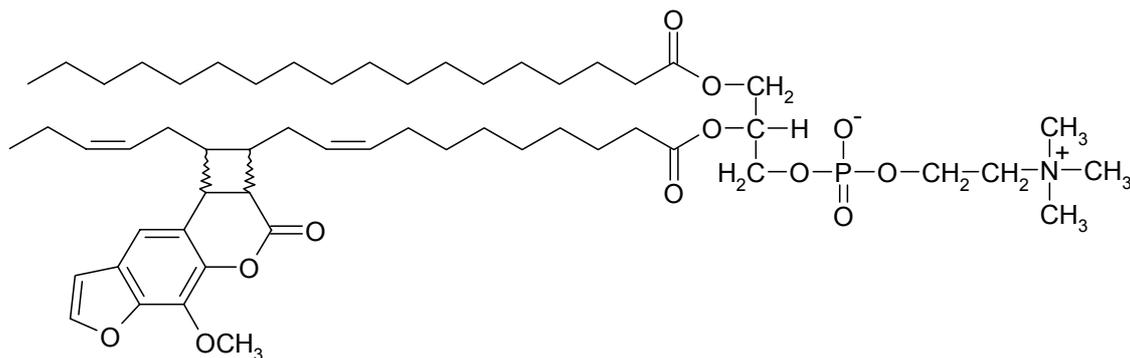


Abbildung 6.46 Cyclobutanaddukt aus 8-MOP und Phosphatidylcholin (nach Dall'Acqua und Martelli 1991, Caffieri et al. 1994, Zarebska 1994, Zarebska et al. 2000)

Die Cyclobutanderivate lösen verschiedene Effekte aus. Neben der physikalischen Veränderung der Membranfluidität (Zarebska et al. 1998), die bis zur Lyse von Zellen und zur damit verbundenen Erythembildung führt (Zarebska 1994), werden die Cyclobutanderivate auch für die Stimulierung der Melanogenese verantwortlich gemacht (Zarebska et al. 2000, Caffieri et al. 1994). Die Cyclobutanderivate sind *in vivo* wahrscheinlich stabil genug, um eine Signaltransduktions-Kaskade anzustoßen. In einem ersten Schritt muss vermutlich das Fettsäure-Psoralen-Cycloaddukt aus dem dazugehörigen Phospholipid durch die Phospholipase A₂ abgetrennt werden. Es wird angenommen, dass die freigesetzten Cycloaddukte Diacylglycerol im Sinne eines Zweiten Botenstoffs („Second Messenger“)

nachahmen und entsprechend über Stimulierung der Proteinkinase C die Melanogenese und damit die Pigmentierung anregen (Zarebska 2000).

6.4.3 Photohämolyse von porcinen Erythrozyten

Erythrozyten (Abbildung 6.47) dienen als gutes Modell zur Bestimmung von Membranschäden (Potapenko 1991), da sie keine künstliche, sondern eine natürliche Membran mit allen relevanten Biomolekülen (Lipide, Peptide und Kohlenhydrate) aufweisen. Da Psoralene unterschiedliche Triplett-Quantenausbeuten in Abhängigkeit von der jeweiligen Mikroumgebung zeigen (Sousa und Sá e Melo 1996), ist es im Sinne einer Korrelation zum *in vivo* Verhalten vorteilhaft, Membranschäden mit einem Modell zu bestimmen, das im Aufbau möglichst mit den natürlichen Bedingungen übereinstimmt. Da Erythrozyten keinen Zellkern aufweisen, können etwaige Schäden an der DNA nicht zur indirekten Auflösung der Zelle führen. Weiterhin ist die Membranauflösung leicht durch Messung des freigesetzten Hämoglobins quantifizierbar. Die in Kapitel 6.4.2 beschriebenen Reaktionen rufen die Lyse von Erythrozyten hervor (Zarebska 1994).

Die Hämolyse von porcinen Erythrozyten wurde nach Inkubation mit dem jeweiligen Psoralen im Dunkeln und unter UVA-Bestrahlung gemessen, um etwaige Dunkelreaktionen einbeziehen zu können. Der Messvorgang wird in Abbildung 6.48 für die Bestrahlungsinubation erläutert. Nach Zugabe des Psoralens werden die Erythrozyten bestrahlt. Dabei kommt es zu der erläuterten Durchlässigkeit der Erythrozytenmembran für Ionen. Aufgrund von Konzentrationsgefällen strömen nun Natriumionen in die Zelle und einige Kaliumionen aus der Zelle hinaus. Der starke Strom der Natriumionen bewirkt solange einen Transport von Wasser in die Zelle, bis die Membran der Zelle maximal gedehnt ist. Ein weiterer Wassereinstrom lässt dann die Zelle platzen und das lösliche, intrazelluläre Hämoglobin wird in die umgebende Lösung freigesetzt. Durch Zentrifugation trennt man die suspendierten Zellbestandteile ab und misst im Überstand das freigesetzte Hämoglobin.

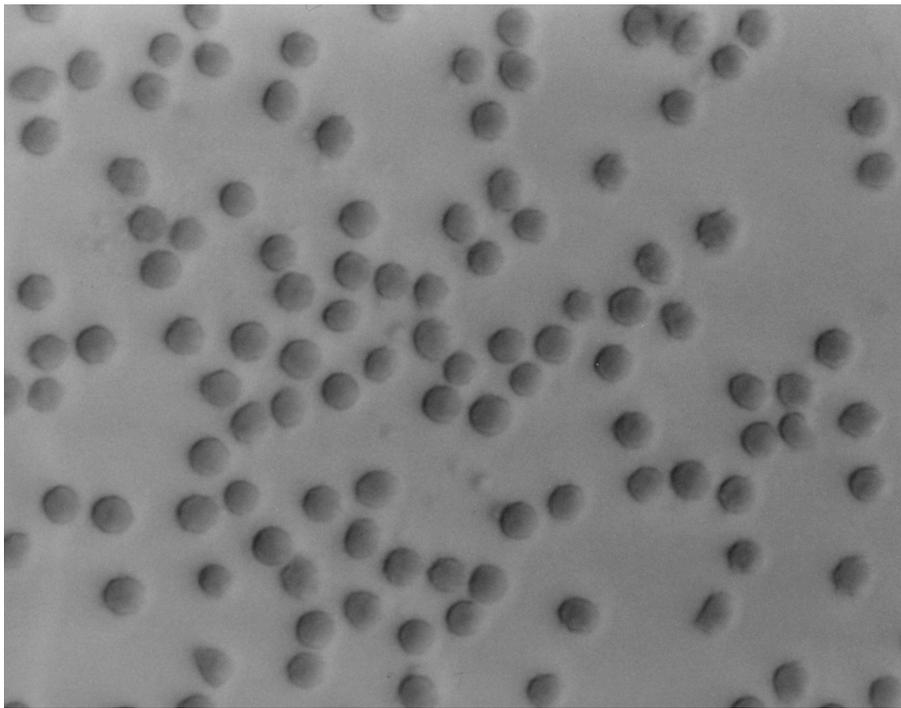


Abbildung 6.47 Mikroskopische Aufnahme einer porcinen Erythrozyten-Suspension in PBS-Puffer

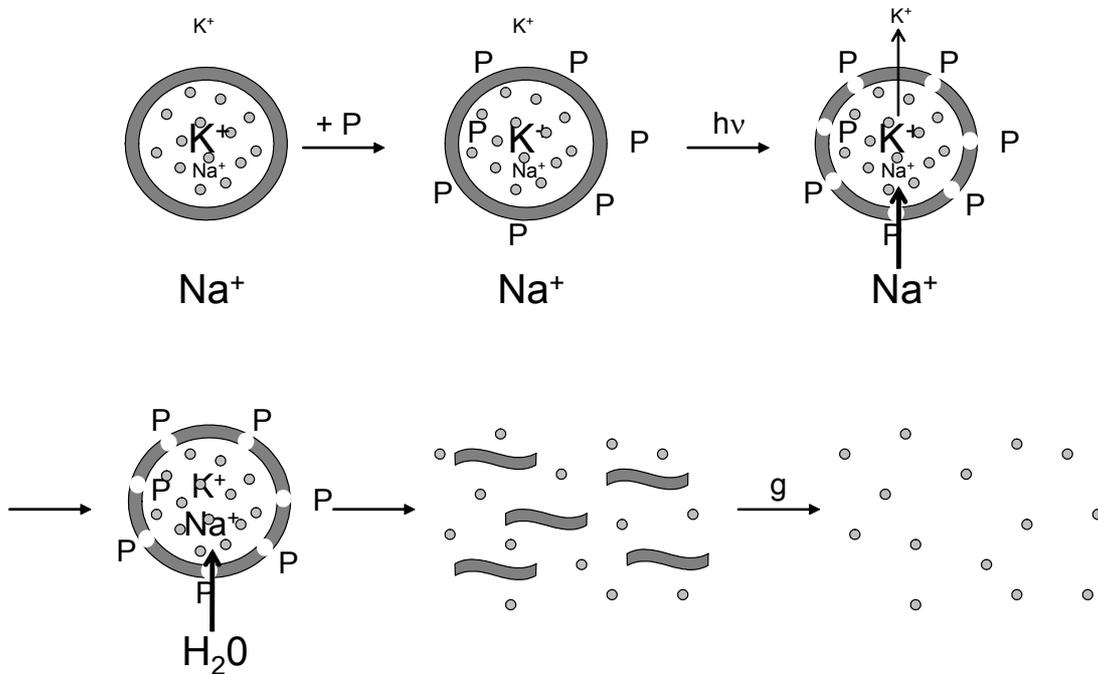


Abbildung 6.48 Schematische Darstellung der Photohämolyse eines Erythrozyten durch ein Photosensibilisatormolekül, P und Messung des freigesetzten Hämoglobins nach Zentrifugation, g (modifiziert nach Johnson 1984 und Potapenko 1991)

6.4.3.1 Methode

Die Hämolyse wurde leicht verändert nach der Methode von Pape et al. 2001 bestimmt. Es wurde mit physiologischem PBS-Puffer („Phosphate buffered Saline“, Zusammensetzung in Tabelle 6.10) gearbeitet, der mit bidestilliertem Wasser hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,4 wurde. Über die Verwendungszeit von einer Woche wurde er bei 2 bis 8°C im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch mit einem 0,2 µm Sterilfilter filtriert.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration (mM)</i>	<i>Einwaage (g/l)</i>
Na ₂ HPO ₄	22,2	3,1515
KH ₂ PO ₄	5,6	0,7621
NaCl	123,3	7,2060
Glucose · H ₂ O	10,0	1,9212

Tabelle 6.10 Einwaagen PBS-Puffer pH 7,4

Die Schweine-Erythrozyten wurden folgendermaßen gewonnen. Das arterielle Blut von gerade gekeulten deutschen Hausschweinen wurde in zwei 250 ml Zentrifugiergefäßen aufgefangen, in denen sich jeweils eine Lösung aus 20 ml Leitungswasser und ca. 380 mg Na-EDTA zur Gerinnungshemmung befand. Die Gefäße wurden verschlossen und bis zur weiteren Bearbeitung vorsichtig geschwenkt. Um die Blutkörperchen vom Plasma abzutrennen, wurde das Blut zehn Minuten in einer Beckman J2-21M/E Zentrifuge, die auf 4°C gekühlt war, bei 2800 Umdrehungen pro Minute (1200 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand auf ca. 200 ml Gesamtvolumen mit PBS-Puffer aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Bis der Überstand nach Zentrifugation ausreichend klar war, schlossen sich zwei oder drei analoge Waschgänge an. Zur konzentrierten Zellsuspension wurde zuletzt PBS-Puffer hinzugefügt, bis ein Gesamtvolumen von ca. 150 ml pro Gefäß vorlag. Sechs 100 ml Uringefäße wurden mit jeweils ca. 50 ml Erythrozytensuspension befüllt und während der Verwendungszeit von maximal vier Tagen zwischen 2 und 8°C im Kühlschrank aufbewahrt und regelmäßig geschwenkt,

um der Sedimentation der Blutkörperchen entgegenzuwirken und die Homogenität zu erhalten.

Vor Verwendung wurde die Erythrozytensuspension nochmals aufbereitet. Je 6 ml wurden in vier 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3000 Umdrehungen pro Minute (1000 g) in einer Heraeus Sepatech Medifuge über einen Zeitraum von zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den hämolysierten Zellen wurde entfernt und 4 ml PBS-Puffer hinzugefügt. Dieser Waschvorgang wiederholte sich zwei- bis dreimal. Die Suspensionen wurden in einem 50 ml Reagenzrohr vereinigt und PBS-Puffer wurde hinzugefügt, bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde. Zur Kontrolle der Zelldichte wurden drei Lösungen aus 900 µl bidestilliertem Wasser, 75 µl PBS-Puffer und 25 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt, zur Erlangung ausreichender Hämolyse geschüttelt und in einer Heraeus Sepatech 17S Biofuge bei 3000 Umdrehungen pro Minute (805 g) fünf Minuten zentrifugiert. Zu 500 µl des jeweiligen Überstands wurden 500 µl einer Lösung aus neun Volumenteilen bidestilliertem Wasser und einem Volumenteil PBS-Puffer, die auch als Lösungsmittelabgleich verwendet wurde, pipettiert und die resultierende Lösung bei 576 nm (Abbildung 6.49) photometrisch vermessen. Die gewünschte Zelldichte der Ausgangssuspension lag vor, wenn der Mittelwert der Absorption der drei gemessenen Lösungen zwischen 1,05 und 0,95 lag.

Anschließend wurde in einem 100 ml Uringefäß eine Arbeitssuspension aus 53,85 ml PBS-Puffer und 150 µl eingestellter Ausgangssuspension hergestellt. Zur Bestimmung der vollständigen Hämolyse wurde eine Hämolyselösung aus 8,975 ml bidestilliertem Wasser und 25 µl eingestellter Ausgangssuspension verwendet.

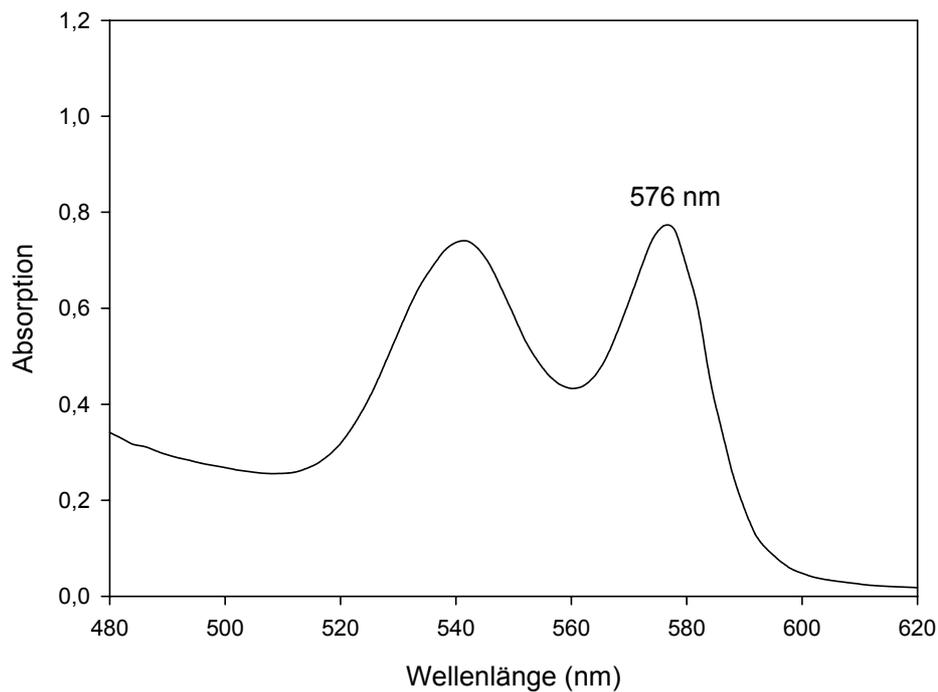


Abbildung 6.49 Hämoglobin: Absorptionsspektrum im Bereich zwischen 480 und 620 nm und längswelliges Absorptionsmaximum

	1	2	3	4	5	6
A	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S1	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S2	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S3	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S4	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S5	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S6
B	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S1	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S2	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S3	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S4	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S5	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S6
C	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S1	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S2	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S3	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S4	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S5	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl S6
D	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl DMSO	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl DMSO	900 µl AS 50 µl PBS 50 µl DMSO	900 µl HL 50 µl BW 50 µl DMSO	900 µl HL 50 µl BW 50 µl DMSO	900 µl HL 50 µl BW 50 µl DMSO

Tabelle 6.11 Beschickung der Mikrotiterplatten (AS = Arbeitssuspension, HL = Hämolyse­lösung, S1-S6 = Substanz-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen in DMSO, PBS = PBS-Puffer, BW = bidestilliertes Wasser)

Je eine Mikrotiterplatte mit 24 Löchern à 3,6 ml wurde für die Bestrahlungs- und die Dunkelinkubation gemäß Tabelle 6.11 befüllt. Die Löcher D1 bis D3 beinhalteten Kontrollproben für 0% Hämolyse, die Löcher D4 bis D6 Proben für 100% Hämolyse. Die resultierende Erythrozytendichte betrug $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter und DMSO lag als Lösungsvermittler in einer Endkonzentration von 5% vor. Die zu vermessenden Substanzen lagen in den Spalten 1 bis 6 in für die Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven geeigneten Konzentrationen vor. Die entsprechenden Konzentrationsbereiche wurden zunächst in einer Grobtitration ermittelt und anschließend für die Feinbestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve verwendet. Vor der Inkubation sind die Mikrotiterplatten 30 Sekunden auf einem Heidolph Titramax geschüttelt worden, damit die Suspensionen ausreichend homogen waren.

Eine durchgängig auf 25°C temperierte Mikrotiterplatte wurde 60 Minuten lang mit einer Bestrahlungsstärke von $3,5 \text{ mW/cm}^2$ in einem Abstand von 7 cm von zwei Philips Sunlamp TL 36 D 25/09N Lampen bestrahlt und anschließend 30 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Die andere Mikrotiterplatte, ebenfalls auf 25°C temperiert, wurde über 90 Minuten im Dunkeln aufbewahrt.

Nach der Inkubation wurden die Lösungen quantitativ aus den Mikrotiterplatten in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und in einer Heraeus Sepatech 17S Biofuge zehn Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute (805 g) zentrifugiert. Die Überstände der Lösungen ohne Substanz (0% Hämolyse-Kontrollproben) wurden als Lösungsmittelabgleich verwendet und die Überstände der restlichen Proben bei 416 nm (Abbildung 6.50) vermessen. Im Verhältnis zu den Absorptionen der 100% Hämolyse-Proben wurde für die Substanzproben das Ausmaß der Hämolyse in Prozent berechnet. Unter Verwendung der resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurden die Konzentrationen, die 50% Hämolyse verursachen (H_{50}), für die Bestrahlungs- und die Dunkelinkubation bestimmt.

Zur Abgrenzung des hämolytischen Potenzials der Verbindungen im Dunkeln von demjenigen, das den photochemischen Reaktionen entspringt, wurde der Photohämolysefaktor (PHF) als Quotient aus den H_{50} -Werten ohne und mit UVA-Bestrahlung berechnet.

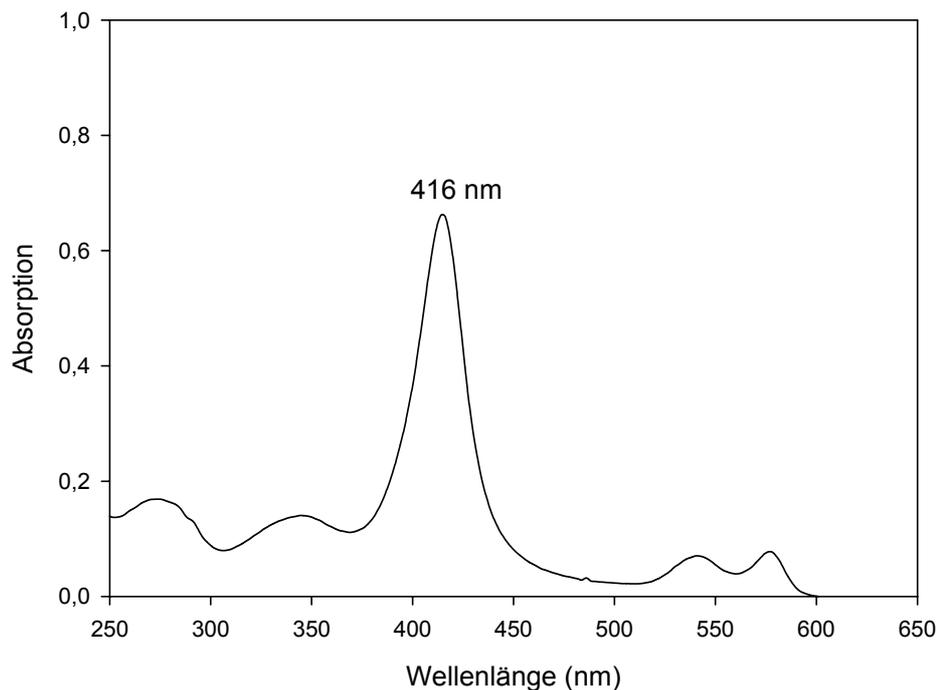


Abbildung 6.50 Hämoglobin: Absorptionsspektrum im Bereich zwischen 250 und 650 nm und intensivstes Absorptionsmaximum im sichtbaren Lichtbereich

Wenn im löslichen Konzentrationsbereich einer Verbindung keine ausreichende Hämolyse in der Dunkelinkubation feststellbar war, wurde ein minimaler Photohämolysefaktor ($> \text{PHF}$) mit der höchsten verwendeten Konzentration der Dunkelinkubation (c_{max}) berechnet. Neben den Psoralenen wurden auch Natriumlaurylsulfat (SDS) und Ketoprofen als Negativ- bzw. Positivkontrolle vermessen (Pape et al. 2001).

6.4.3.2 Ergebnisse

Die Verbindungen zeigten sehr unterschiedliche H_{50} -Werte (Abbildung 6.51) und Photohämolysefaktoren (Abbildung 6.52). Beispielhaft sind für die Verbindungen Psoralen und Psora-3 die Konzentrations-Hämolyse-Kurven der Bestrahlungs- und Dunkelinkubation in den Abbildungen 6.53 und 6.54 dargestellt. Für das Ausmaß der Photohämolyse ergab sich gemäß den Photohämolysefaktoren nachstehende Reihenfolge: Ketoprofen (Positivkontrolle) \gg 8-MOP \approx Psoralen $>$ Trioxsalen $>$ 5-MOP \approx Psora-4 \approx Psora-3 $>$ SDS (Negativkontrolle).

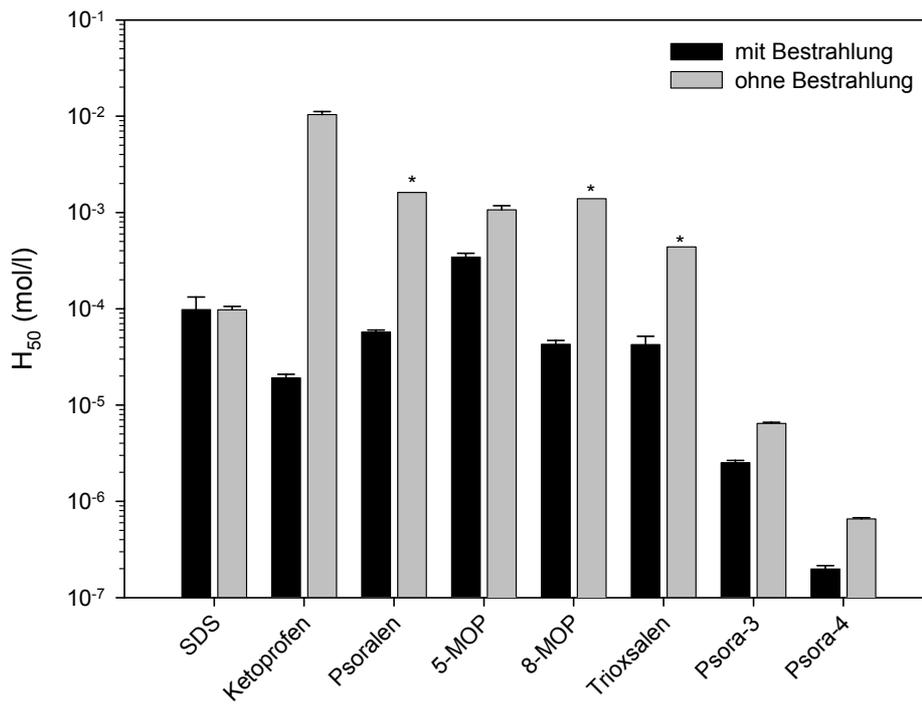


Abbildung 6.51 H₅₀-Werte für Bestrahlungs- und Dunkelinkubationen (* = C_{max})

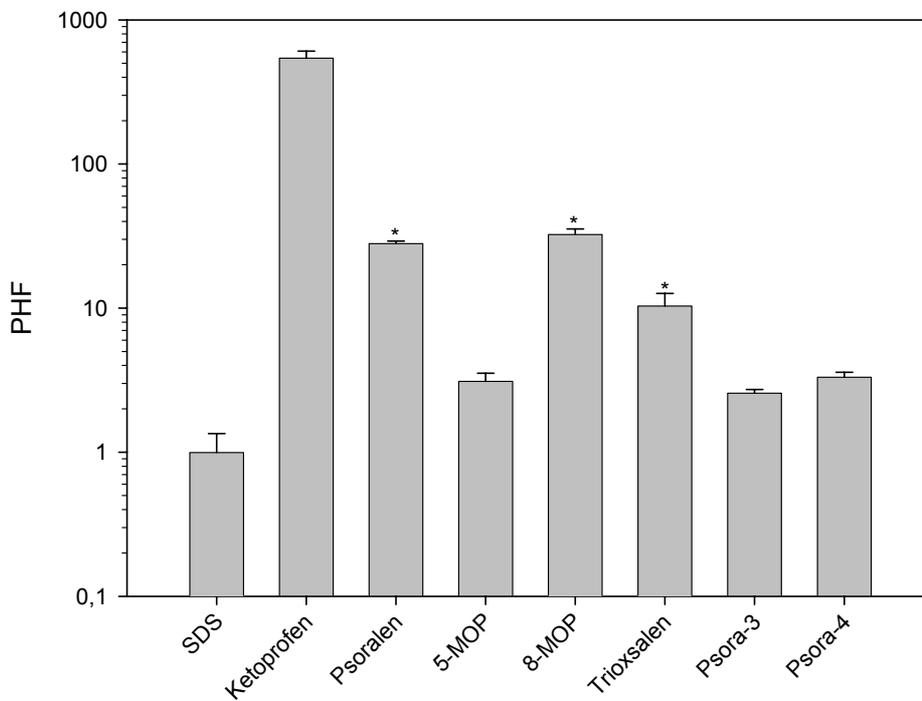


Abbildung 6.52 Photohämolysefaktoren (* = minimaler PHF)

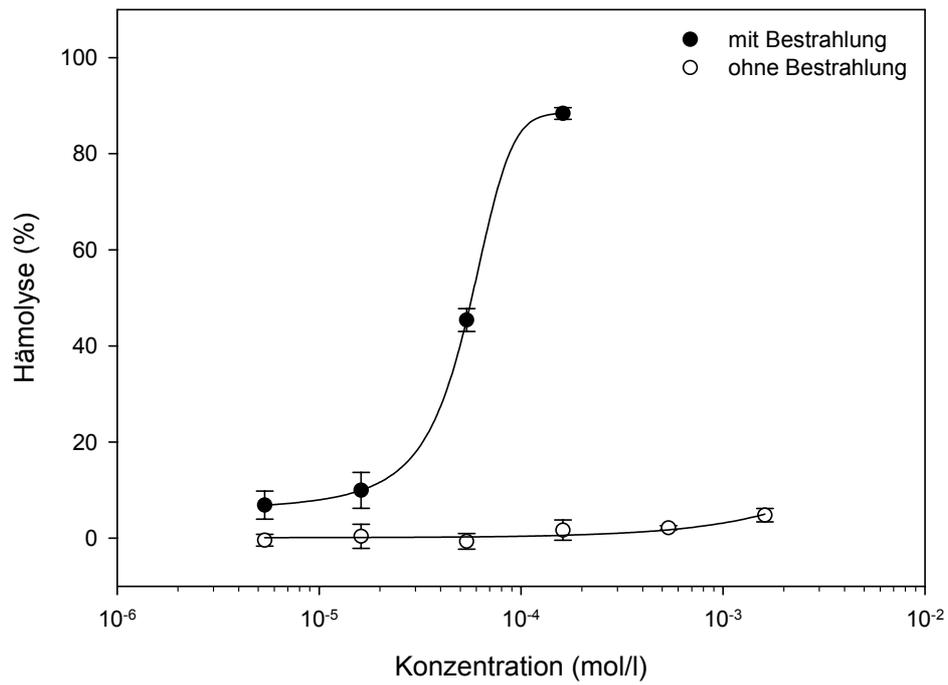


Abbildung 6.53 Psoralen: Konzentrations-Hämolyse-Kurve

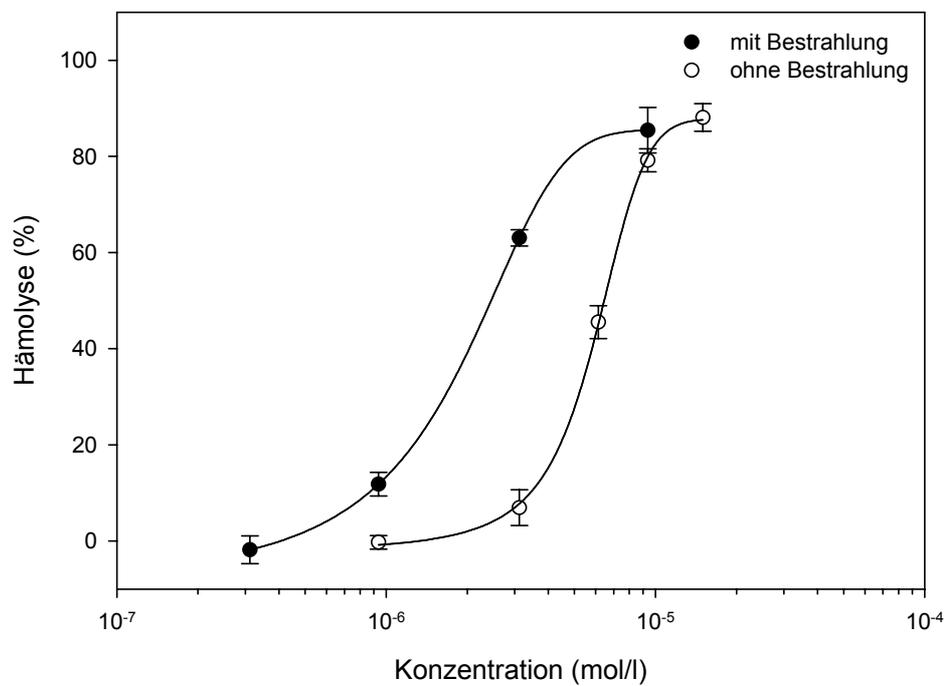


Abbildung 6.54 Psora-3: Konzentrations-Hämolyse-Kurve

6.4.3.3 Diskussion

Die Photohämolyssefaktoren werden als Maß für die Beurteilung der Photoreaktivität gegenüber Membranen herangezogen (Pape et al. 2001). Je größer der Unterschied in den H_{50} -Werten zwischen Dunkel- und Bestrahlungsinkubation und somit auch der dazugehörige Photohämolyssefaktor ist, desto photoreaktiver ist eine Verbindung.

Natriumlaurylsulfat (SDS) zeigte mit einem Photohämolyssefaktor von $1,0 \pm 0,4$ keinen Unterschied zwischen Dunkel- und Bestrahlungsinkubation (siehe auch Abbildung 6.51) und erfüllte damit die Funktion als Negativkontrolle. Für Ketoprofen ergab sich die größte Differenz zwischen beiden Inkubationen mit einem Photohämolyssefaktor von 544 ± 64 und erwies sich deswegen als Positivkontrolle.

Für die Verbindungen 5-MOP, Psora-3 und Psora-4 sind sehr ähnliche Photohämolyssefaktoren um den Wert 3 bestimmt worden. Sie unterscheiden sich von Psoralen, 8-MOP und Trioxsalen, bei denen deutlich höhere Photohämolyssefaktoren zwischen 10 und 32 resultierten. Deswegen geht man davon aus, dass Psoralen, 8-MOP und Trioxsalen größeren Schaden an Membranen anrichten. Vedaldi et al. 1988 und Dall'Acqua et al. 1987 zeigten, dass Psoralen und Trioxsalen gegenüber 5-MOP ein größeres photohämolysches Potenzial besitzen. Da Membranen besonders empfindlich auf die Einwirkung von Singulett-Sauerstoff reagieren (Pape et al. 2001), kann diese Divergenz mit Hilfe der unterschiedlichen Photoproduktion an Singulett-Sauerstoff erklärt werden. 5-MOP, Psora-3 und Psora-4 erzeugen unter Bestrahlung wenig Singulett-Sauerstoff (Abbildung 6.19) und bewirken nur geringe Membranschäden an Erythrozyten, wohingegen Psoralen, 8-MOP und Trioxsalen stärkere Photoproduzenten von Singulett-Sauerstoff darstellen und dementsprechend umfangreicheren Membranschaden auslösen können.

Die im Vergleich zu den anderen Psoralenen niedrigeren H_{50} -Werte von Psora-3 und Psora-4 können mit Hilfe der Lipophilie der Verbindungen erklärt werden. Durch die Substitution mit einem langen, unpolaren Phenylalkyl-Rest am C5-Sauerstoff erhöht sich die Lipophilie (Abbildung 6.55).

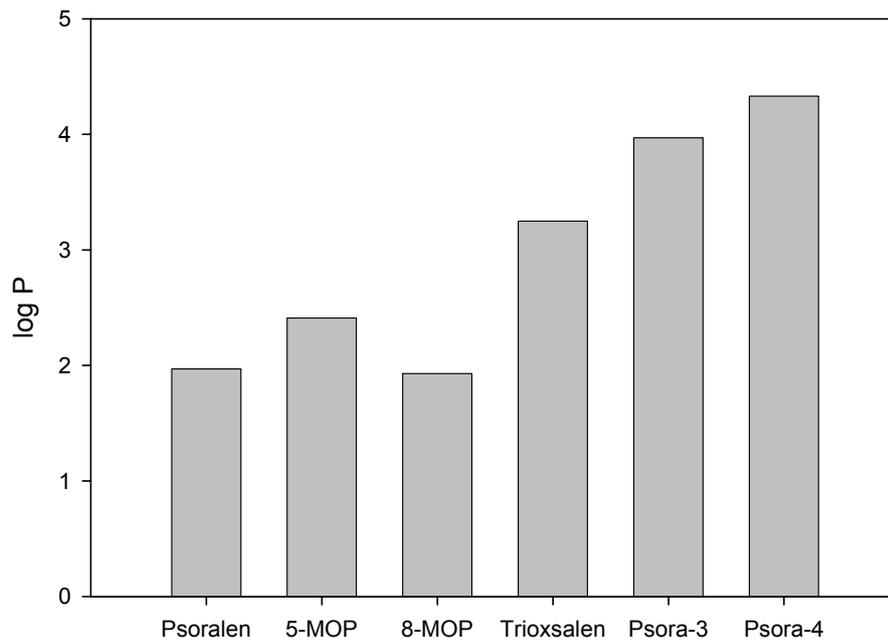


Abbildung 6.55 Lipophilie der untersuchten Psoralene (nach Caffieri 2001 und Vennekamp et al. 2004)

Je lipophiler eine Verbindung ist, desto eher lagert sie sich in einem wässrigen Medium in eine Membran ein. Dabei wird die Membranfluidität verändert und gegebenenfalls die Membran aufgelöst. Die Hämolyse der Erythrozyten durch die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 fand nur bei der verwendeten geringen Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter statt. Bei höheren Zelldichten, wie z. B. der im Blut des Menschen vorliegenden $5 \cdot 10^9$ Zellen pro Milliliter (Swenson 1993), wurde sowohl ohne als auch mit Bestrahlung keine Hämolyse beobachtet.

Bezüglich der Beurteilung des photoirritativen Potenzials der Verbindungen Psora-3 und Psora-4 kann man zusammenfassen, dass ein gewisser, jedoch schwacher Membranschaden entstehen und dieser zu einer möglichen Photosensibilisierung *in vivo* beitragen kann. Dass kein beträchtlicher Membranschaden auftritt, ist nicht nur für photoirritative Reaktionen von Bedeutung, sondern auch für eventuell ablaufende photokarzinogene Prozesse, da Membranabbauprodukte mutagene Eigenschaften besitzen können (siehe auch Kapitel 6.2.2.3).

6.5 Photoproteinbindung

Die Photoproteinbindung von Psoralenen soll aus drei Gründen betrachtet werden. Zum ersten können Proteine ihre Funktionstüchtigkeit verlieren, nachdem sie kovalente Bindungen mit Psoralenen eingegangen sind. Unter geeigneten Bedingungen ergeben sich auch zytotoxische Effekte (Schmitt et al. 1995). Zum zweiten sind photochemisch entstandene Psoralen-Proteinaddukte die erste Voraussetzung für die Ausbildung von photoallergischen Reaktionen (Schmitt et al. 1995, Pendlington und Barrat 1990). Zum dritten spielt die Psoralen-Photoproteinbindung für die Entstehung von Katarakten (Durchsichtigkeitsverluste des Auges), die außerdem auch durch photodynamische Reaktionen gefördert wird, eine große Rolle (Midden 1988, Davies und Truscott 2001). Die Linsentrübung ist eine besonders ernste Langzeitnebenwirkung der PUVA-Therapie (Midden 1988), tritt aber eher selten auf (See und Weller 1993).

6.5.1 Bekannte Photokonjugationen von Psoralenen mit Proteinen

Über die Photoreaktionen von Psoralenen mit Proteinen ist noch nicht viel bekannt (Sastry 1997). 1974 wurde von Mizuno et al. zum ersten Mal die These aufgestellt, dass Psoralene auch mit Proteinen photochemische Reaktionen eingehen. 1976 wiesen Meffert et al. nach, dass 8-MOP mit Proteinen aus epidermalen Zellen stabile Konjugate ausbildet. Schließlich belegten Yoshikawa et al. 1979, dass 8-MOP sich in einer sauerstoffabhängigen Photoreaktion kovalent an bestimmte Proteine addiert. 1983 wurde von Granger und Helene dargelegt, dass 8-MOP in An- oder Abwesenheit von Sauerstoff eine kovalente Bindung mit dem Enzym *E. coli* DNA Polymerase I eingeht und gleichzeitig dabei das Enzym inaktiviert. Mehrfachreaktionen eines Psoralens mit benachbarten Untereinheiten eines Proteins ermöglichen auch starke intramolekulare Quervernetzungen, wobei diese Reaktionen sauerstoffabhängig sind, sich deutlich von der bekannten DNA-Quervernetzung unterscheiden und nicht notwendigerweise zur Inaktivierung von Enzymfunktionen führen müssen (Schiavon und Veronese 1986). Die Erzeugung von Protein-Quervernetzungen durch Psoralene und UVA-Strahlung wurde auch durch Hornicek et al. 1985 und Malinin et al. 1986 bestätigt. Da die Protein-Quervernetzung über andere Mechanismen abläuft als die DNA-Quervernetzung, kann ein im Sinne der

DNA-Quervernetzung monofunktionelles Psoralen durchaus Proteine unter Bestrahlung quervernetzen (Schmitt et al. 1995). Daneben ist auch über DNA-Psoralen-Protein-Quervernetzung (Sastry et al. 1997) und Lipid-Psoralen-Protein-Quervernetzung (Zarebska 1994) berichtet worden.

Psoralene addieren sich unter Bestrahlung ebenfalls an einzelne Aminosäuren. Tryptophan und Tyrosin stellen vermutlich Aminosäuren in Proteinen dar, die spezifisch durch Psoralene angegriffen werden (Schmitt et al. 1995). Die erste Isolierung eines Aminosäure-Psoralen-Photoaddukts aus einem Protein gelang Sastry im Jahre 1997. Die genaue Struktur konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es ist aber sicher, dass es sich um ein Tyrosin-Photoaddukt handelt.

Grundsätzlich geht man davon aus, dass zwei mögliche Mechanismen für die Bildung von Photokonjugaten aus Psoralenen und Proteinen existieren, zum einen die Reaktionen, die unter Beteiligung von Singulett-Sauerstoff und anderen reaktiven Sauerstoff-Sauerstoff-Spezies ablaufen, zum anderen die Reaktionen, bei denen ein Psoralen bzw. ein Psoralenradikal direkt mit dem Protein reagiert (Sastry 1997). Generell können die Konjugate neben der eventuellen Entstehung von antigenen Eigenschaften eine Enzymaktivität oder bei membranständigen Proteinen auch eine Zerstörung der Zellintegrität zur Folge haben (Schmitt et al. 1995).

6.5.2 Photoallergische Reaktionen

Eine photoallergische Reaktion kann als immunologische Konsequenz *in vivo* nach Kontakt mit einem Photosensibilisator und UV-Strahlung auftreten. Der Photosensibilisator kann sowohl dermal als auch systemisch appliziert werden. Eine Reihe von antimikrobiell wirksamen Agenzien, Duftstoffen, chemischen Sonnenschutzfiltern und Nicht-Steroidalen Antirheumatika sind imstande, photoallergische Reaktionen auszulösen (Spielmann et al. 2000).

Patienten mit einer Photoallergie entwickeln Ekzeme mit Erythemen, Papeln, Gefäßinfiltration und leiden gelegentlich auch unter Blasenbildung. Histologisch ist die Haut durch epidermale Spongiose, Exozytose und starke Infiltration von mononukleären Zellen in die Dermis gekennzeichnet (Tokura 2003).

Da eine Photoallergie eine immunologische Fehlfunktion darstellt, muss zunächst eine auslösende Chemikalie mit einem Protein unter Bestrahlung zum Photoantigen reagieren. Dabei existieren zwei unterschiedliche Reaktionswege (Abbildung 6.56).

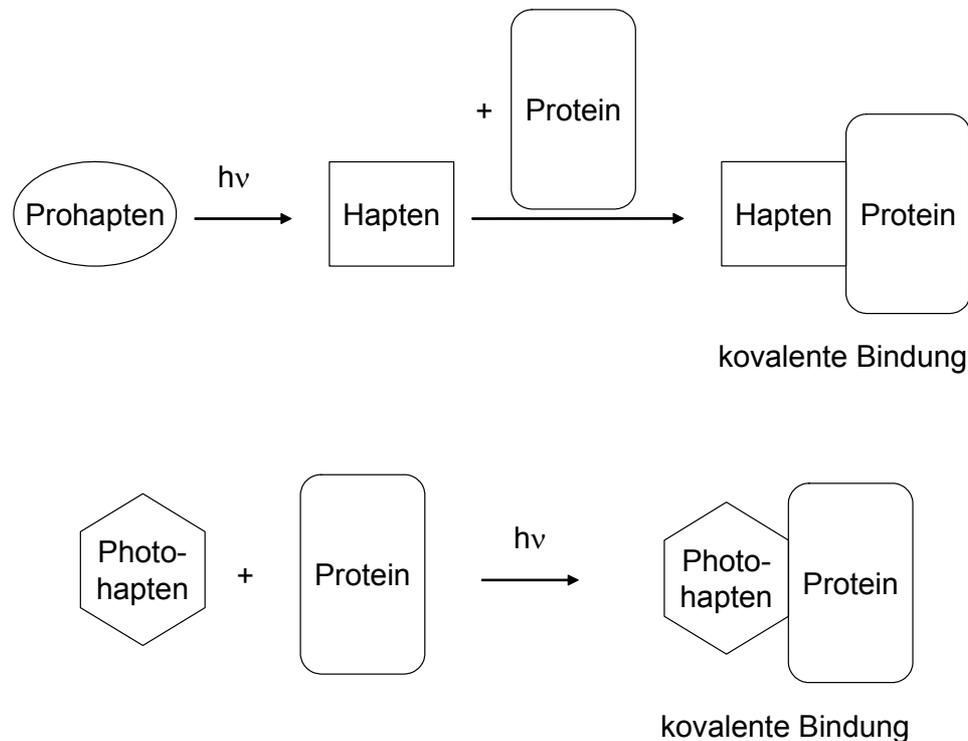


Abbildung 6.56 Möglichkeiten zur Entstehung eines Photoantigens (modifiziert nach Tokura 2003)

Die meisten Substanzen, die eine Photoallergie auslösen können, gehören zum zweiten Typ und binden damit unter Bestrahlung direkt an das Protein.

Modifizierte Proteine aus Zellen der Epidermis gehen Bindungen zu MHC Typ II-Molekülen („Major Histocompatibility Complex“) ein. Langerhans-Zellen präsentieren die gebildeten Antigene in der Epidermis, regen auf diese Weise T-Zellen an und lösen damit die Sensibilisierung aus. Ebenfalls wandern die Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen während der Sensibilisierungsphase zu den Lymphknoten. Während der akuten Phase lösen Mastzellen die Hautreaktion aus. Die photoallergische Reaktion wird aber auch durch Suppressor-Zellen gegenreguliert (Tokura 2003).

6.5.3 Photoproteinbindung der Psoralene an humanem Serumalbumin

6.5.3.1 Methode

Die Bindung der Psoralene an humanem Serumalbumin in An- und Abwesenheit von UVA-Strahlung wurde analog zu der von Diembeck und Pape 1995 vorgeschlagenen Methode bestimmt.

Die Messungen wurden in 0,01 M Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4 durchgeführt. Dazu wurde 1,211 g Tris-Base in ca. 900 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst, mit Titrisol-HCl-Lösung pH 7,4 eingestellt, auf genau 1000 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, der pH-Wert geprüft und gegebenenfalls korrigiert. Der fertige Puffer wurde eine Woche lang im Kühlschrank bei 2 bis 8°C aufbewahrt und vor Verwendung mit einem 0,2 µm Sterilfilter filtriert.

Folgende Lösungen wurden frisch hergestellt (Tabelle 6.12).

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Einwaage</i>
humanes Serumalbumin	2 mg/ml	Puffer	20 mg/10 ml
Psoralene	0,3 mM	DMSO	entsprechend

Tabelle 6.12 Verwendete Lösungen für die Bestimmung der Proteinbindung

Je 900 µl der Albumin-Lösung bzw. des Tris-Puffer wurden in Mikrotiterplatten mit 24 Löchern vorgelegt und dazu 100 µl der jeweiligen Psoralen-Lösung hinzugegeben. Die Endkonzentrationen betragen 1,8 mg/ml humanes Serumalbumin, 30 µM Psoralen-Derivat und 10% DMSO. Eine Mikrotiterplatte wurde 150 Minuten mit einer Bestrahlungsstärke von 3,5 mW/cm² im Abstand von 7 cm unter zwei Philips Sunlamp TL 36 D 25/09N Lampen bestrahlt. Eine zweite Mikrotiterplatte wurde über 150 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Beide Mikrotiterplatten wurden über den gesamten Zeitraum auf 20°C temperiert. Im Anschluss wurden die Lösungen beider Mikrotiterplatten quantitativ in Amicon Centrifree Ultrafiltrationseinheiten überführt, die einen Cellulosefilter besitzen, der Moleküle mit Molekulargewichten oberhalb von 30.000 Dalton nicht passieren lässt. Da das verwendete humane Serumalbumin ein

Molekulargewicht von 66.478 Dalton besitzt, wurde es einschließlich der daran gebundenen Psoralen-Moleküle bei der anschließenden Zentrifugation über 20 Minuten und 4300 Umdrehungen pro Minute (2000 g) in einer Heraeus Sepatch Medifuge auf dem Filter zurückgehalten. Photometrisch wurde das Ultrafiltrat mit dem nicht-gebundenen Anteil bei dem Absorptionsmaximum der jeweiligen Substanz vermessen und in Bezug auf die eingesetzte Lösung indirekt die Proteinbindung in Prozent berechnet. Ebenfalls wurden Kalibriergeraden der jeweiligen Substanzen vermessen.

6.5.3.2 Ergebnisse

Die Proteinbindung der Psoralene an humanem Serumalbumin mit und ohne Bestrahlung ist in Abbildung 6.57 dargestellt. 5-MOP und 8-MOP zeigten eine deutliche Zunahme der Proteinbindung nach Bestrahlung, wohingegen die Proteinbindung von Psora-3 und Psora-4 nach Bestrahlung auf dem sehr hohen Niveau der Dunkelproteinbindung blieb.

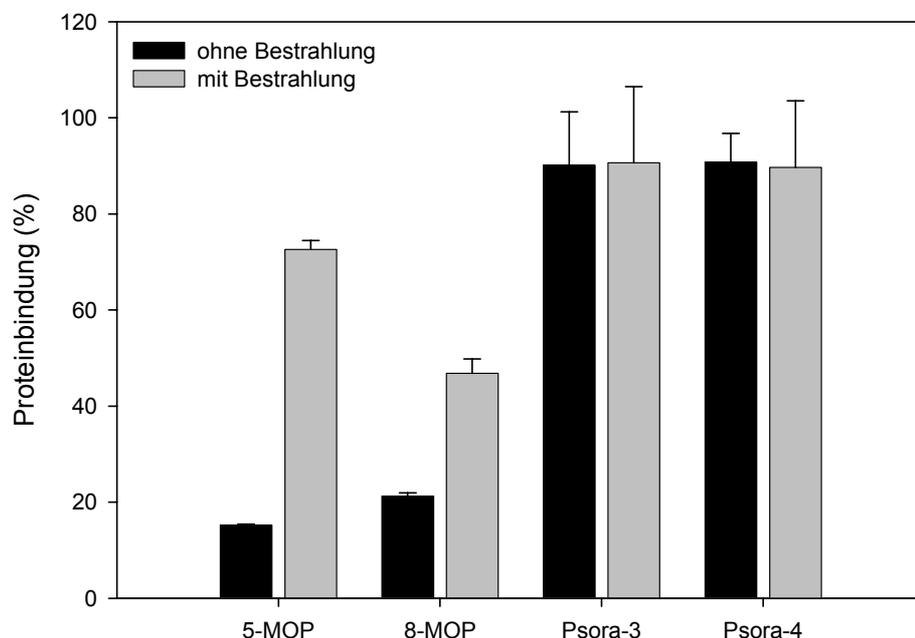


Abbildung 6.57 Proteinbindungen der Psoralene im Dunkeln und nach Bestrahlung

Eine typische Kalibriergerade ist in Abbildung 6.58 dargestellt.

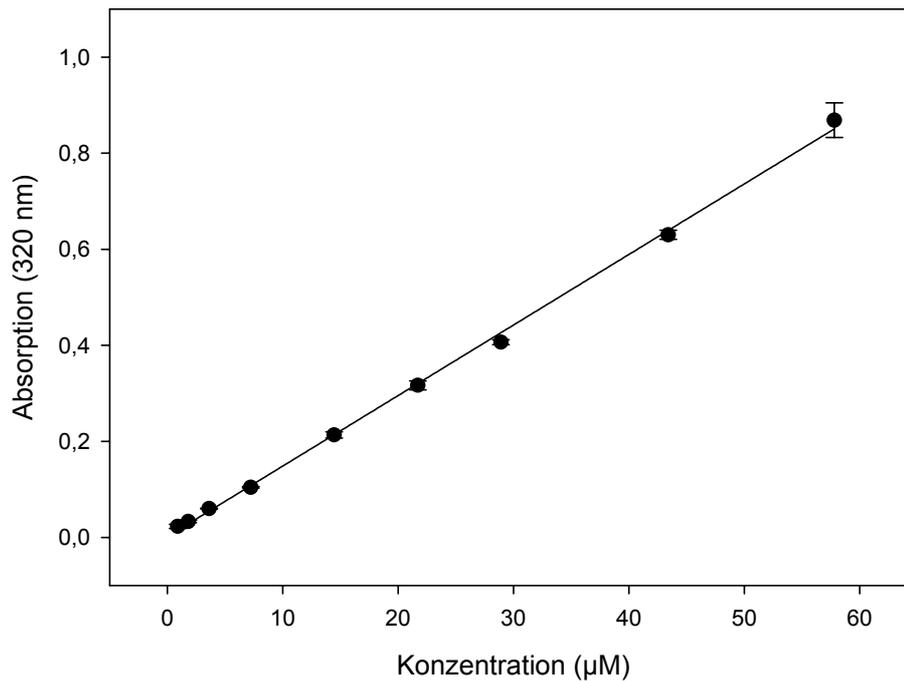


Abbildung 6.58 Kalibriergerade Psora-4

6.5.3.3 Diskussion

Für 8-MOP wurde eine Zunahme der Proteinbindung nach Bestrahlung gefunden, wie sie in der Literatur beschrieben wurde (Diembeck und Pape 1995). Die schon im Dunkeln hohe Proteinbindung der Verbindungen Psora-3 und Psora-4 kann sicherlich über die höhere Lipophilie (Abbildung 6.55) erklärt werden. Da nach Bestrahlung die Proteinbindung bei beiden Verbindungen nicht zunahm, kann eine starke kovalente Photoproteinbindung zunächst ausgeschlossen werden. Möglich ist, dass bereits im Dunkeln bestehende, nicht-kovalente Proteinbindungen durch Bestrahlung in kovalente Bindungen umgeformt werden. Aufgrund der hohen Lipophilie lagern sich Psora-3 und Psora-4 in einem zellulären System eher in Membranen als in einzelne zytosolische Proteine ein (Membranreaktivität siehe Kapitel 6.4).

Bezüglich der Beurteilung des photoallergischen Potenzials muss man neben der Photoproteinbindung auch die Fähigkeit der Verbindungen zur Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff betrachten. Substanzen, die photoallergische Reaktionen hervorrufen können, binden unter Bestrahlung stark an Proteine und produzieren

keinen Singulett-Sauerstoff. Substanzen, die sowohl Photoproteinbindung als auch Singulett-Sauerstoff-Produktion zeigen, besitzen dagegen ein photoirritatives und eher kein photoallergisches Potenzial (Lovell and Jones 2000). Für die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 lässt sich daher ableiten, dass sie kein bzw. nur ein sehr geringes photoallergisches Potenzial aufweisen, weil sie erstens keine ausgeprägte Photoproteinbindung und zweitens eine gewisse Fähigkeit zur Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff offenbaren. Bestätigt wird diese Annahme auch durch die Feststellungen zur prospektiven Identifikation von Photoallergen (Barrat et al. 2000). Dabei wird die These aufgestellt, dass eine Substitution mit Alkoxy-Gruppen an Position C5 des Psoralen-Grundkörpers die Wahrscheinlichkeit von photoallergischen Reaktionen deutlich erniedrigt.

Allgemein werden durch Psoralene nur sehr selten Photoallergien hervorgerufen (Schempp et al. 2002, Ravenscroft et al. 2001, Korffmacher et al. 1994, Takashima et al. 1991, Weissmann et al. 1980, Ljunggren 1977), so dass man davon ausgehen kann, dass die Inzidenz von photoallergischen Reaktionen bei einer Verwendung von Psora-3 oder Psora-4 als Arzneistoff, gerade bei Strahlungsvermeidung, ebenfalls sehr klein ausfällt.

7 Photobiologische Untersuchungen

In vitro-Untersuchungen mit zellulären Systemen ermöglichen Prognosen über die photosensibilisierende Potenz *in vivo*. Mit dem 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest steht ein validiertes *in vitro*-System mit einer sehr guten Korrelation zur *in vivo*-Photoirritation zur Verfügung, das sogar für die schnelle Prüfung einer großen Anzahl von Verbindungen („High Throughput Screening“, HTS) modifiziert wurde (Jones und King 2003). Weitere *in vitro*-Methoden, z. B. zur Bestimmung der Photogenotoxizität, wurden entwickelt und zeigen zum Teil gute Korrelationen zur *in vivo*-Photokarzinogenität (Brendler-Schwaab et al. 2004).

7.1 Photozytotoxizität

Die Photozytotoxizität der Verbindungen Psora-3 und Psora-4 wurde mit Hilfe des 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest nach Richtlinie 2000/33/EG, OECD-Testrichtlinie 432 und GLP-Bedingungen unter der Leitung von Frau Dr. Susann Richert, Abteilungsleiterin Toxikologie der Institute Dr. Schrader, Max-Planck-Straße 6, 37603 Holzminden, bestimmt.

7.1.1 Testprinzip

Der 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest basiert auf dem Vergleich der Zytotoxizität eines Stoffs, die er mit und ohne Exposition einer nicht-toxischen Strahlungsdosis (UVA/Vis) zeigt. Die Zytotoxizität ist bei diesem Test als konzentrationsabhängige Reduzierung der Aufnahme des Vitalfarbstoffs Neutralrot, 24 Stunden nach der Bestrahlung, definiert.

Balb/c-3T3-Mäusefibroblasten wurden zwecks Bildung einer einzelligen Schicht („Monolayer“) 24 Stunden kultiviert. Zwei Mikrotiterplatten mit 96 Löchern wurden mit acht verschiedenen Konzentrationen einer zu testenden Substanz eine Stunde lang vorinkubiert. Im Anschluss wurde eine der beiden Platten 50 Minuten bestrahlt, während die andere über den gleichen Zeitraum im Dunkeln aufbewahrt wurde. In beiden Platten wurde das Medium mit der Substanz durch ein Kulturmedium ersetzt und nach weiteren 24 Stunden die Zellviabilität durch Neutralrot-Aufnahme bestimmt.

Die relative Zellviabilität, ausgedrückt als Prozentsatz unbehandelter Negativkontrollen, wurde für jede der acht Testkonzentrationen berechnet. Um das photoirritative Potenzial vorherzusagen, wurden die EC_{50} -Werte, d. h. die Konzentrationen, die die Zellviabilität um 50% vermindern, der Konzentrations-Vitalitäts-Kurven von Dunkel- und Bestrahlungsinkubation miteinander verglichen. Dies geschah durch die Berechnung des Photoirritationsfaktors (PIF).

$$PIF = \frac{EC_{50}(\text{ohne Bestrahlung})}{EC_{50}(\text{mit Bestrahlung})}$$

Die Daten der Konzentrations-Vitalitäts-Kurven wurden ebenfalls durch das Computerprogramm Phototox 2.0 (Peters und Holzhütter 2002) analysiert, welches den sogenannten mittleren Photoeffekt („Mean Photo Effect“, MPE) berechnet. Die Berechnung des mittleren Photoeffekts beruht auf einem Vergleich der Wirkungen mit und ohne Bestrahlung über den gesamten verwendeten Konzentrationsbereich.

Für beide Betrachtungsarten wurden Prädiktionsmodelle aufgestellt, nach denen man die *in vivo*-Eigenschaften prognostiziert (Tabelle 7.1).

<i>Prädiktion in vivo</i>	<i>PIF</i>	<i>MPE</i>
nicht photoirritativ	< 2	< 0,1
eventuell photoirritativ	> 2 und < 5	> 0,1 und < 0,15
photoirritativ	≥ 5	≥ 0,15

Tabelle 7.1 Prädiktionsmodelle für die Vorhersage der *in vivo*-Photoirritation (nach OECD-Testrichtlinie 432)

Der genaue Ablauf der Untersuchungen ist im Prüfbericht (Projekt-Nr. CCT-03-028, Auftrags-Nr. 232-CCT-03-176-03-293) aufgeführt.

7.1.2 Ergebnisse

Exemplarisch sind die Konzentrations-Vitalitäts-Kurven der Positivkontrolle Chlorpromazin in Abbildung 7.1 aufgeführt.

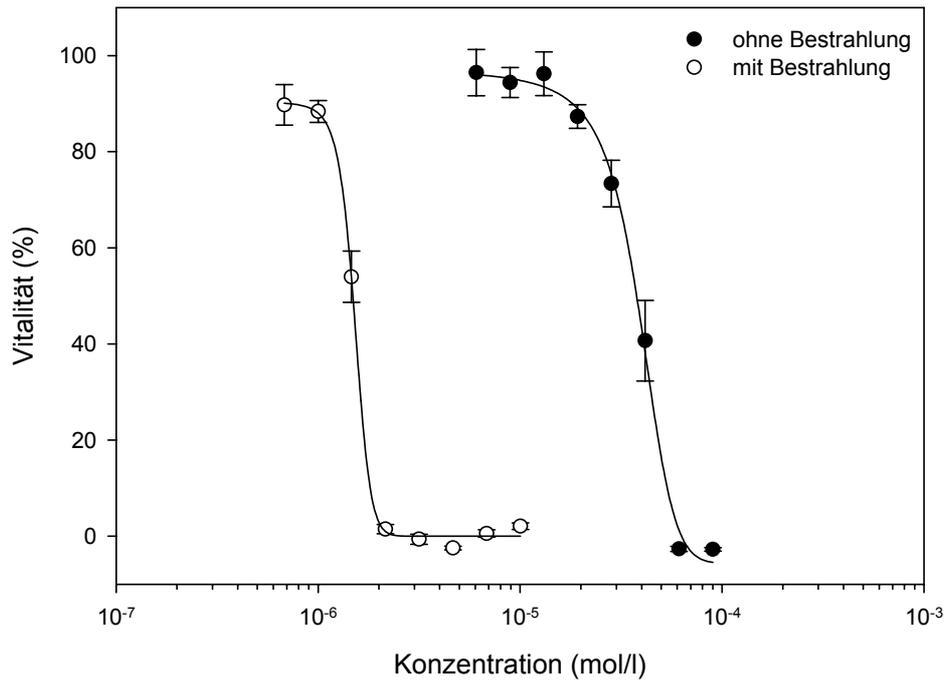


Abbildung 7.1 Konzentrations-Vitalitäts-Kurven der Positivkontrolle Chlorpromazin

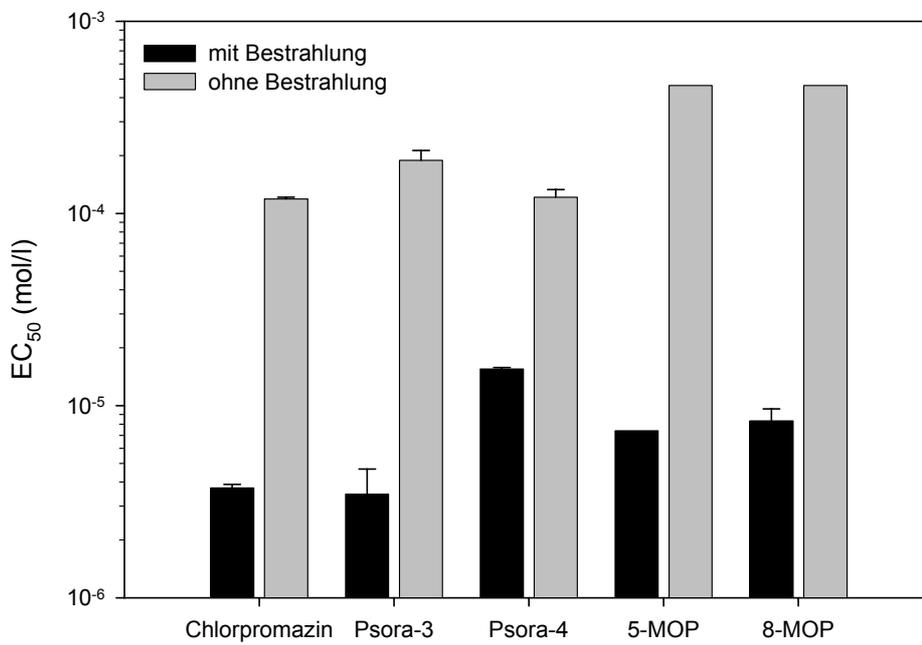


Abbildung 7.2 EC₅₀-Werte (5-MOP und 8-MOP nach Okamoto et al. 1999)

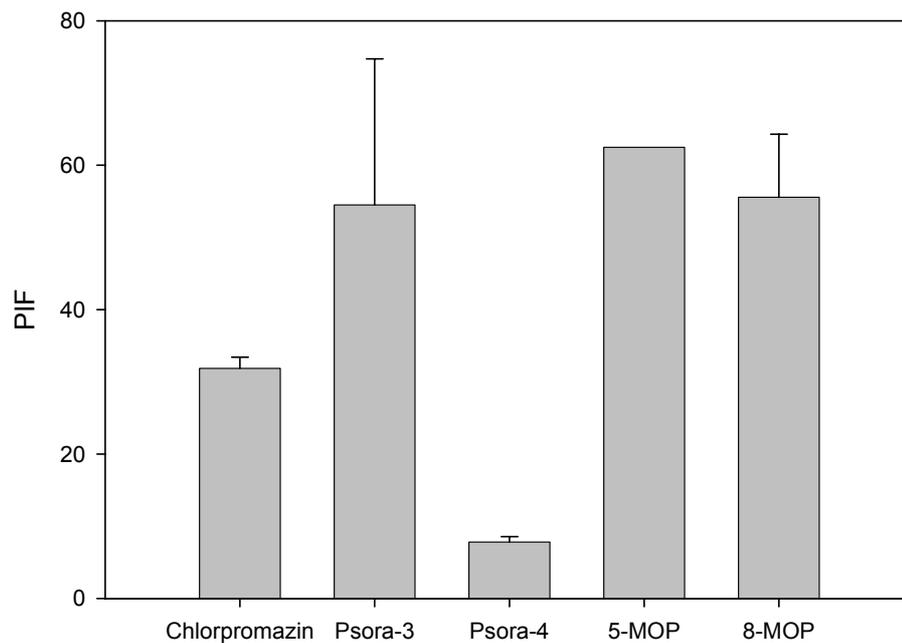


Abbildung 7.3 Photoirritationsfaktoren (5-MOP und 8-MOP nach Okamoto et al. 1999)

Verbindung	MPE
Chlorpromazin	0,679
Psora-3	0,507
Psora-4	0,387

Tabelle 7.2 Mittlere Photoeffekte (MPE)

Alle Verbindungen zeigten Unterschiede zwischen den Bestrahlungs- und Dunkelinkubationen (Abbildung 7.2). Der größte EC_{50} -Wert nach Bestrahlung wurde mit 16 $\mu\text{mol/l}$ für die Verbindung Psora-4 gemessen. Für alle Verbindungen resultierten bei den Dunkelinkubationen EC_{50} -Werte im oberen mikromolaren Bereich. Psora-4 wies den kleinsten Photoirritationsfaktor mit 7,83 und den kleinsten mittleren Photoeffekt mit 0,387 auf (Abbildung 7.3 und Tabelle 7.2).

7.1.3 Diskussion

Chlorpromazin füllte nach beiden Prädiktionsmodellen (Tabelle 7.1) die Funktion der Positivkontrolle aus (Abbildung 7.3 und Tabelle 7.2). Psora-3 und Psora-4 offenbarten ein *in vitro* photozytotoxisches Verhalten. Entsprechend den Prädiktionsmodellen muss deswegen gefolgert werden, dass beide Substanzen *in vivo* Photoirritationen auslösen.

Der 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest ist zur Bestimmung, ob eine Substanz *in vivo* Photoirritationen zeigt, entwickelt worden. Die photoirritative Potenz lässt sich jedoch nicht direkt aus den Ergebnissen ableiten. Zum Vergleich können höchstens die EC₅₀-Werte der Verbindungen nach Bestrahlung herangezogen werden. Diese Differenzierung sollte jedoch nur in großen Schritten durchgeführt werden. Bezüglich der *in vitro*-Photozytotoxizität kann z. B. ein gewisser Unterschied zwischen Psora-4 (16 µmol/l) und Psora-3 (3 µmol/l) oder 8-MOP (7 µmol/l) festgestellt werden. Da die Differenzen relativ gering sind, bleibt zu klären, ob diese Tatsache für das *in vivo*-Verhalten eine Rolle spielt.

7.2 Photogenotoxizität

Die Photogenotoxizität der Verbindungen Psora-3 und Psora-4 wurde unter der Leitung von Herrn Dr. Peter Kasper, Abteilungsleiter Genetische Toxikologie des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte, Kurt-Georg-Kiesinger Allee 3, 53175 Bonn, bestimmt. Untersucht wurden die Substanzen im Photomikrokerntest (Kersten et al. 1999, Kersten et al. 2002) und im Photocometassay (Brendler-Schwaab et al. 2004, SOP „*In vitro* Photo-Comet Assay for the Detection of photogenotoxic Drugs“ der „Collaborative Study on *in vitro* Photogenotoxicity Tests“ vom 21. Februar 2003).

7.2.1 Photomikrokerntest

7.2.1.1 Testprinzip

Mikrokerne („Micronuclei“) bilden sich, wenn Zentromere oder Spindelfasern verändert vorliegen oder falls Chromosomenbrüche aus DNA-Strangbrüchen resultieren. Im Laufe einer Mitose entstehen sie durch Kondensation von azentrischen Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen, die keine Verbindungen zum Spindelapparat haben. Mikrokerne verbleiben in einer Tochterzelle. Sie sehen aus wie normale Zellkerne, sind aber kleiner als diese und besitzen keine Verknüpfung über Kern-Plasmabrücken zu den eigentlichen Zellkernen. Mit einer geringen Häufigkeit entstehen spontan Mikrokerne, z. B. bei Knochenmarkszellen mit der Inzidenz 1:1000. Löst eine Verbindung klastogene (Chromosomenbrüche) oder aneugene (Veränderung der Chromosomenzahl) Effekte aus, so nimmt die Anzahl an Mikrokernen zu. Im Vergleich zum Chromosomenaberrationstest ist der Mikrokerntest schneller und einfacher durchzuführen und zeigt eine bessere statistische Aussagekraft (Kersten et al. 1999, Brusik und Müsch 2004, Neumann 2004).

Die Ausbildung von Mikrokernen wurde in V79-Lungenzellen des chinesischen Hamsters untersucht. Die Zellen wurden zunächst 6 Stunden in Kulturmedium präinkubiert. Das Kulturmedium wurde entfernt und durch PBS-Puffer mit der Testsubstanz und einem Lösungsmittel ersetzt. Nach einer halben Stunde im Dunkeln wurden die Zellen mit einem Atlas MTS Suntest CPS⁺ Sonnensimulator

bestrahlt. Im Anschluss wurde das Behandlungsmedium entfernt und die Zellen für weitere 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert, getrocknet und angefärbt.

Neben der Anzahl der Mikrokerne wurde zur Abschätzung der Zytotoxizität auch der Proliferationsindex (PI) bestimmt. Dazu wurde verglichen, wie viele Zellhaufen sich aus einer, zwei, drei bis vier oder fünf bis acht Zellen zusammensetzten.

Eine Substanz wird als photogenotoxisch eingestuft, wenn sie mindestens 7,3% Mikrokerne erzeugt und sie im Vergleich zu Blindwerten mit Bestrahlung eine mindestens doppelt so große Anzahl an Mikrokernen ausbildet. Photozytotoxische Effekte lösen eine Abnahme des Proliferationsindex im Vergleich zu Blindwerten mit Bestrahlung aus (Kersten et al. 2002).

7.2.1.2 Ergebnisse

Ohne Bestrahlung wurde bei 5-MOP, Psora-3 und Psora-4 keine Veränderung der Anzahl der Mikrokerne und des Proliferationsindex gegenüber dem Blindwert mit Lösungsmittel gemessen. Unter Bestrahlung zeigte die Positivkontrolle 5-MOP eine Zunahme der Zellen mit Mikrokernen und eine Abnahme des Proliferationsindex im Vergleich zum Blindwert mit Lösungsmittel und Bestrahlung.

Die konzentrationsabhängigen Effekte, die durch Psora-3 und Psora-4 unter Bestrahlung ausgelöst wurden, sind in den Abbildungen 7.4 und 7.5 zusammengefasst.

Zum Vergleich sind in Abbildung 7.6 die niedrigsten Konzentrationen („Lowest observed Effect Concentration“, LOEC) aufgeführt, die insgesamt mehr als 7,3% und gegenüber dem Blindwert mehr als doppelt so viele Mikrokerne ausbilden. Psora-4 unterscheidet sich mit einem LOEC-Wert von 3,2 $\mu\text{mol/l}$ stark von 5-MOP mit 10 nmol/l .

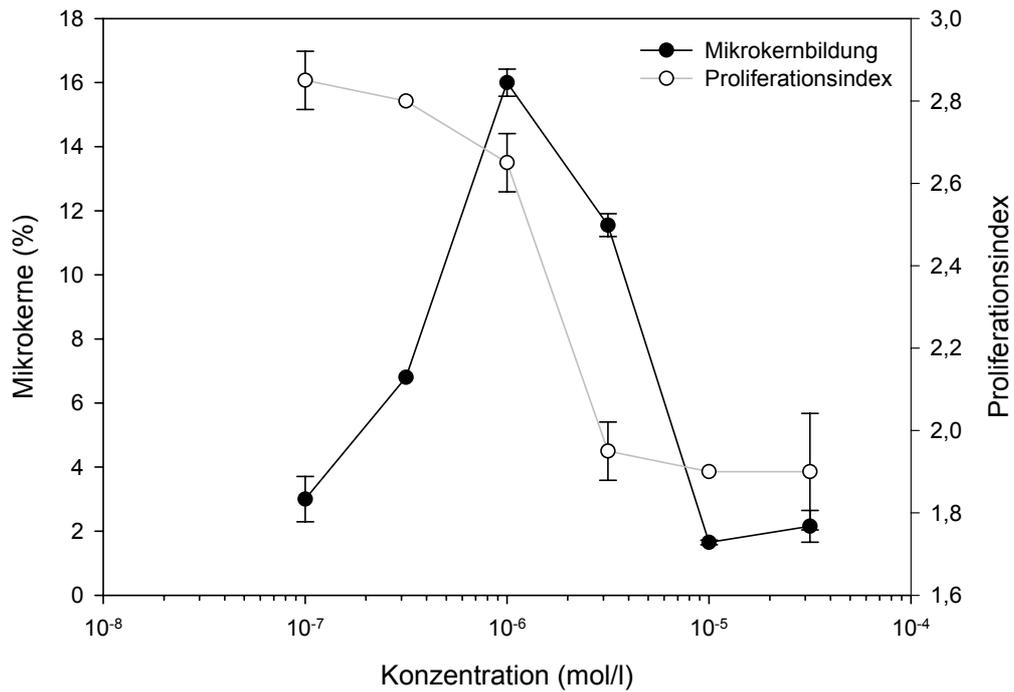


Abbildung 7.4

Psora-3: Verlauf der Mikrokernbildung und des Proliferationsindex unter Bestrahlung (18,45 mJ/cm² UVB, 600 mJ/cm² UVA)

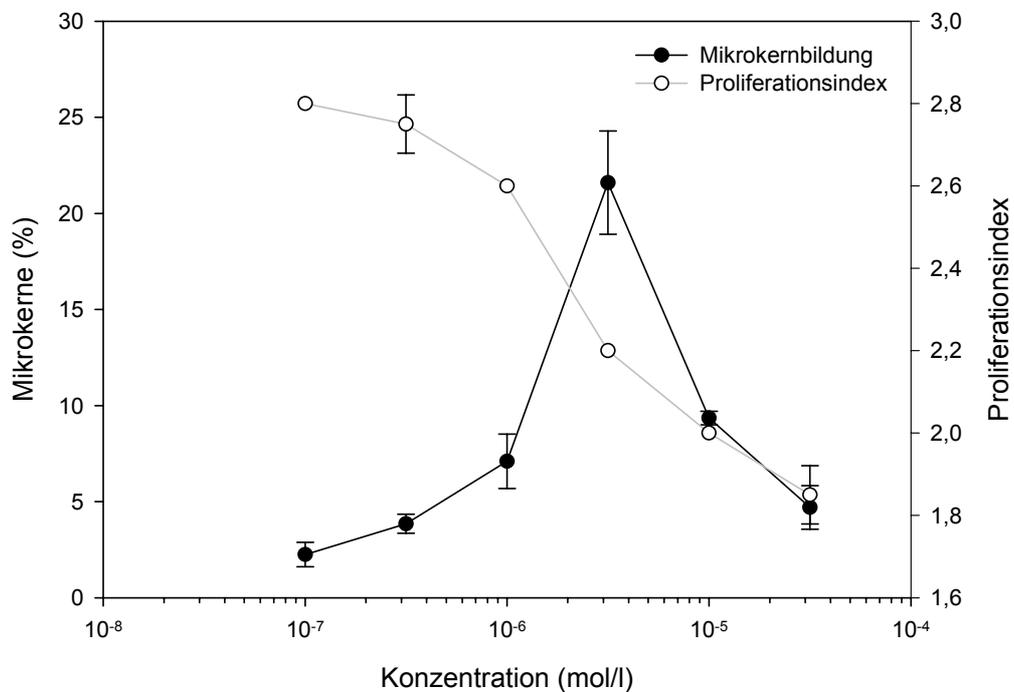


Abbildung 7.5

Psora-4: Verlauf der Mikrokernbildung und des Proliferationsindex unter Bestrahlung (18,45 mJ/cm² UVB, 600 mJ/cm² UVA)

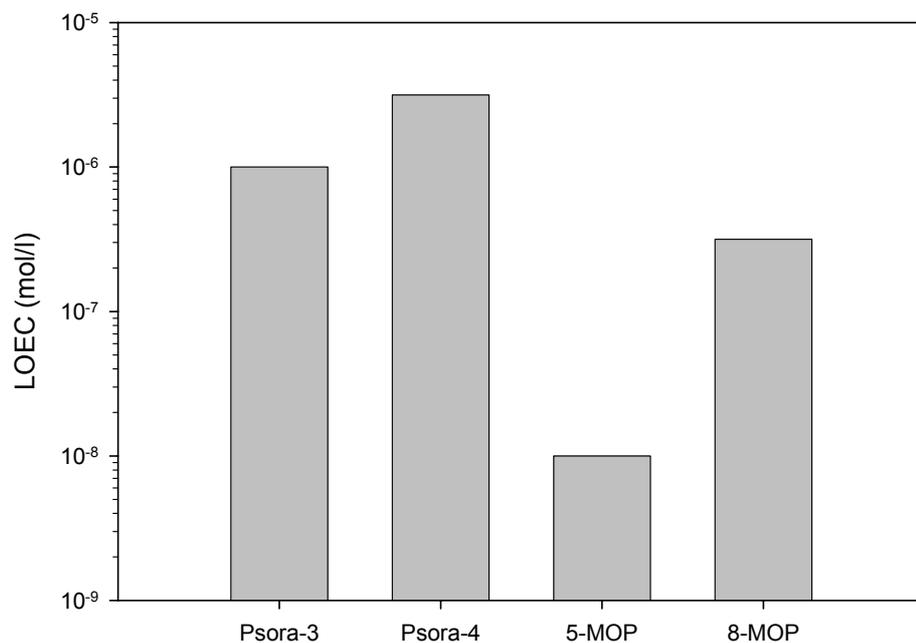


Abbildung 7.6 LOEC-Werte unter Bestrahlung (5-MOP und 8-MOP nach Kersten et al. 2002 mit 10 mJ/cm² UVB und 400 mJ/cm² UVA)

7.2.1.3 Diskussion

Die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 bildeten unter Bestrahlung im unteren mikromolaren Bereich Mikrokerne. Bei höheren Konzentrationen erfolgte eine Abnahme der Mikrokerne, die man durch die zunehmende Photozytotoxizität entsprechend den Proliferationsindizes erklären kann. Aufgrund der Mikrokernentstehung und der guten Korrelation zwischen *in vitro*-Photogenotoxizität und *in vivo*-Photokarzinogenität im Tierversuch (Kersten et al. 2002), muss man annehmen, dass Psora-3 und Psora-4 ein photokarzinogenes Potenzial besitzen.

Auffällig ist der große Unterschied zwischen den Verbindungen 5-MOP und Psora-4. Unter Bestrahlung werden bei Psora-4 Mikrokerne erst bei eindeutig höheren Konzentrationen erzeugt. Diese Tatsache kann über die Monofunktionalität der Verbindung Psora-4 in Bezug auf die Quervernetzung von komplementären DNA-Einzelsträngen erklärt werden. Einige Studien weisen bifunktionellen Psoralenen wie 5-MOP stärkere photogenotoxische Eigenschaften zu (siehe Kapitel 6.3).

7.2.2 Photocometassay

7.2.2.1 Testprinzip

Mit Hilfe des Cometassays können DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche in Zellen bestimmt werden. Zellen werden auf Objektträgern in Agarose eingebettet und anschließend lysiert. Im Zuge einer Elektrophorese treten DNA-Bruchstücke aus der Zelle aus, wandern entsprechend ihrer Ladung und Größe und bilden einen durch Anfärbung sichtbaren „Kometenschweif“. Der Test wird auch als Einzelzellgelelektrophorese („Single Cell Gel Electrophoresis“, SCGE) bezeichnet. Unter neutralen Lyse-Bedingungen werden Doppelstrangbrüche, unter alkalischen Lyse-Bedingungen zusätzlich auch Einzelstrangbrüche beobachtet. Ausgewertet werden die Länge des Kometen („Tail Length“, TL), der DNA-Gehalt, der aus dem Zellkern in den Kometen ausgetreten ist („Tail Intensity“, TI), gemessen als Fluoreszenz des Kometenschweifs im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz, und das „Tail Moment“ (TM) als Produkt aus „Tail Length“ und „Tail Intensity“ (Neumann 2004).

Zur Bestimmung der Photogenotoxizität wurden V79-Lungenzellen des chinesischen Hamsters herangezogen, die 24 Stunden vor der Behandlung auf Mikrotiterplatten mit Kulturmedium präinkubiert wurden. Das Kulturmedium wurde entfernt und das Behandlungsmedium einschließlich Testsubstanzen und Lösungsmittel hinzugegeben. Vor der Bestrahlung wurden die Mikrotiterplatten 20 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. An die Bestrahlung schloss sich eine Postinkubation im Dunkeln für zehn Minuten an. Das Behandlungsmedium wurde entfernt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Trypsin-Lösung von den Mikrotiterplatten abgelöst und in Kulturmedium und Puffer aufgenommen. Ein Teil der Zellsuspension wurde zentrifugiert und der gewonnene Überstand verworfen. Der Bodenkörper mit den Zellen wurde in niedrigschmelzender Agarose-Lösung suspendiert und auf präparierte Agarose-Objektträger getropft. Die Objektträger wurden gekühlt, in eine alkalische Lyse-Lösung getaucht und in eine Elektrophoresekammer überführt. Nach der Elektrophorese wurden die Agarose-Schichten mit Neutralisations-Puffer gespült und getrocknet. Die DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt. Die Auswertung der Kometen erfolgte unter einem Fluoreszenz-Mikroskop. Die Zytotoxizität der

Verbindungen wurde per Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Kontrollexperimente ohne Substanzen wurden ebenfalls durchgeführt.

Eine Verbindung ist als photogenotoxisch einzustufen, wenn einer Zunahme der Kometenlänge um mindestens 25% gegenüber dem Lösungsmittelblindwert auftritt. Die mitlaufende Positivkontrolle (Chlorpromazin) muss eine Zunahme von mindestens 30% auslösen.

7.2.2.2 Ergebnisse

Psora-3 und Psora-4 verursachten unter Bestrahlung im Vergleich zu dem Lösungsmittelblindwert keine Zunahme der Kometenlänge (Abbildung 7.7).

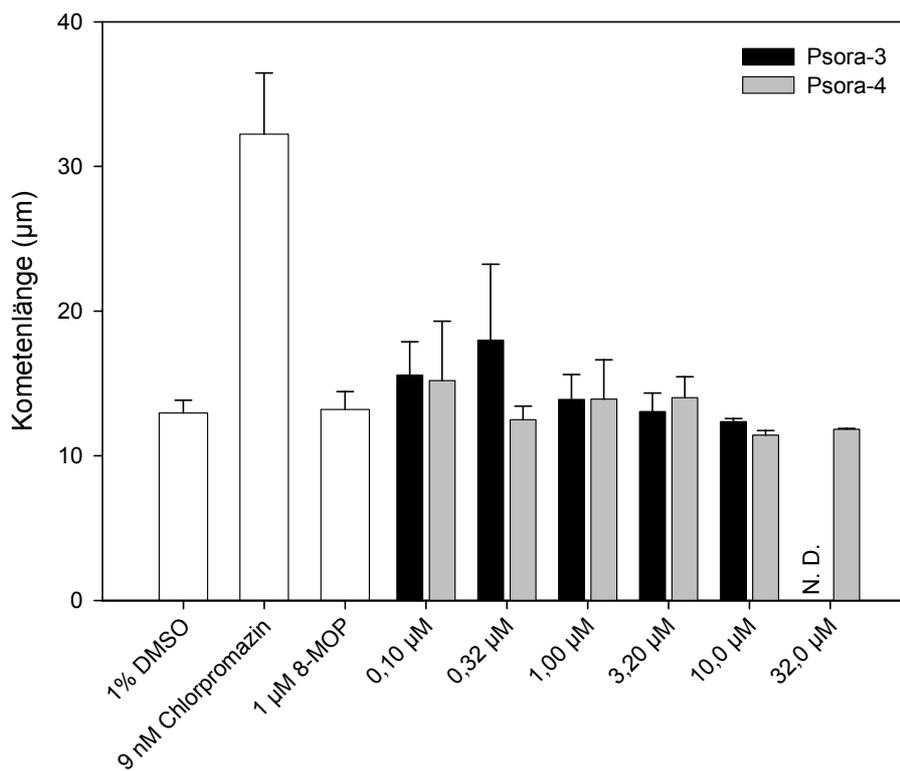


Abbildung 7.7 Kometenlängen der untersuchten Verbindungen unter Bestrahlung (N. D. = nicht durchgeführt)

Die gleichzeitige Inkubation mit Psora-3 (10 µM) bzw. Psora-4 (32 µM) und Chlorpromazin (9 nM) führte gegenüber einer Chlorpromazin-Inkubation zu einer Abnahme der Kometenlänge bis auf die Länge der Lösungsmittelkontrolle. Der

gleiche Effekt wurde durch 8-MOP bereits bei einer Konzentration von 1 μM verursacht (nicht abgebildet).

7.2.2.3 Diskussion

Die mit Chlorpromazin gewonnenen Ergebnisse erfüllten die Anforderungen an die Positivkontrolle. Obwohl 8-MOP photogenotoxische Eigenschaften aufweist, sind diese im Photocometassay nicht detektierbar. 8-MOP kann prinzipiell zwar Strangbrüche auslösen, gleichzeitig wird aber eine Migration in das Agarose-Gel und damit die Kometenbildung durch DNA-Quervernetzung verhindert (Brendler-Schwaab et al. 2004).

Psora-3 und Psora-4 erzeugten ebenfalls keine Kometen. Diese Ergebnisse stehen zunächst in Übereinstimmung mit denen zur DNA-Quervernetzung (Kapitel 6.3) und denen zum Photomikrokerntest (Kapitel 7.2.1). Jedoch weisen die Kombinationsexperimente mit Chlorpromazin stark darauf hin, dass Psora-3 und Psora-4 ebenfalls DNA quervernetzen können, da die Chlorpromazin-induzierte Kometenbildung inhibiert wurde. Hier findet wahrscheinlich eine andere Art als die der bislang für die Psoralene beschriebenen Quervernetzung von zwei komplementären Einzelsträngen in einer DNA-Doppelhelix statt (Abbildung 7.8).

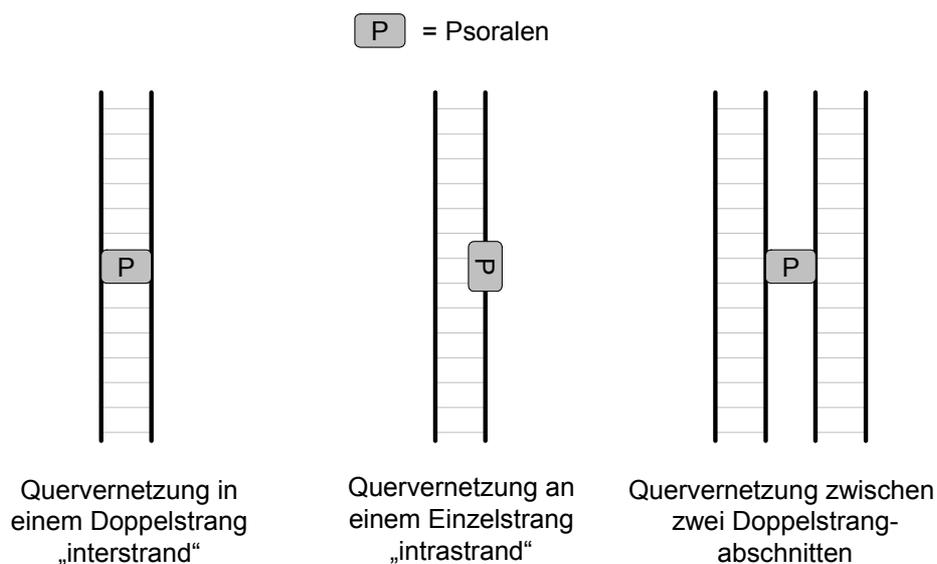


Abbildung 7.8

Potenzielle DNA-Quervernetzungstypen

Vermutlich reagieren Psora-3 und Psora-4 mit zwei verschiedenen Doppelstrangabschnitten, wofür die Dunkelinterkalation, die durch sperrige Substituenten inhibiert wird, in eine DNA-Doppelhelix keine Voraussetzung wäre. Die Quervernetzung an einem DNA-Einzelstrang kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Mit diesen beiden Reaktionstypen, die bislang nicht explizit für Psoralene beschrieben und auch nicht von der in Kapitel 6.3 beschriebenen Methode erfasst wurden, könnte die Hemmung der Migration von DNA-Fragmenten erklärt werden. Demzufolge sind Psora-3 und Psora-4 keine rein monofunktionellen Psoralene. 4',5'-Dihydropsoresalen (Abbildung 5.1) ist ein Beispiel für ein rein monofunktionelles Psoralen, bei dem eine zweite [2+2]-Photocycloaddition aufgrund des Fehlens einer zweiten reaktiven Doppelbindung ausgeschlossen werden kann.

Somit ergibt sich für die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 ein photogenotoxisches Potenzial, da sie in zellulären Systemen DNA quervernetzen können. Im Vergleich zu 8-MOP findet diese Quervernetzung jedoch erst bei höheren Konzentrationen statt.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 auf ihre photosensibilisierenden Eigenschaften nach aktuellen Empfehlungen und Richtlinien untersucht. Der Vergleich mit den bekannten, ebenfalls untersuchten Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP und Trioxsalen lässt verschiedene Folgerungen zu.

Betrachtet man mechanistisch die einzelnen Reaktionen, die zur Photosensibilisierung führen, so reagieren Psora-3 und Psora-4 unter Bestrahlung schwächer als die anderen Psoralene (Tabelle 8.1).

	<i>Psoralen</i>	<i>5-MOP</i>	<i>8-MOP</i>	<i>Trioxsalen</i>	<i>Psora-3</i>	<i>Psora-4</i>
$^1\text{O}_2$	++++	+	++	+++	+	+
$\text{O}_2^{\cdot-}$	++	+	+	+	+	+
<i>DNA</i>	+	++	+	++++	-	-
<i>Membran</i>	+++	+	+++	++	+	+
<i>Protein</i>	N. D.	++	+	N. D.	-	-

Tabelle 8.1

Photoreaktivitäten der untersuchten Psoralene ($^1\text{O}_2$ = Singulett-Sauerstoff-Produktion, $\text{O}_2^{\cdot-}$ = Superoxidradikalanionen-Produktion, DNA = „Interstrand Cross-Linking“, Membran = Photolyse von Erythrozyten, Protein = Proteinbindung, klassifizierte Ergebnisse entsprechend den Kapiteln 6.1 bis 6.5, N. D. = nicht durchgeführt)

In Hinblick auf Struktur-Photoaktivitätsbeziehungen kann man schließen, dass die Reaktionen, die eher von den photophysikalischen Eigenschaften bestimmt werden, bei Psora-3 und Psora-4 genauso stark bzw. schwach ablaufen wie bei 5-MOP, das eine identische Photophysik aufweist und von den oben aufgeführten Referenzverbindungen das Psoralen mit den schwächsten photoirritativen Eigenschaften *in vivo* darstellt. Psora-3 und Psora-4 zeigen z. B. eine annähernd gleiche Singulett-Sauerstoff-Photoproduktion wie 5-MOP. Eine Substitution an anderen Positionen des Psoralen-Grundgerüsts bewirkt dagegen eine Verstärkung der Photoreaktivität.

Psora-3 und Psora-4 unterscheiden sich gegenüber 5-MOP deutlich bei den Reaktionen, die bestimmte sterische Anforderungen an ein Psoralen-Derivat stellen. So wird die Quervernetzung komplementärer Einzelstränge in einer DNA-Doppelhelix aufgrund der sperrigen Phenylalkoxy-Reste inhibiert. Diese „Interstrand Cross-Links“ sind bei den meisten Psoralenen entscheidend an der Auslösung der Photosensibilisierung beteiligt.

In den Tests zur Bestimmung der Photozytotoxizität und der Photogenotoxizität zeigen Psora-3 und Psora-4 zwar deutliche Effekte, diese treten jedoch im Vergleich zu 5-MOP oder 8-MOP erst bei höheren Konzentrationen in Erscheinung. Begründen kann man diese Tatsache mit der generell relativ niedrigen Photoaktivität und der nicht stattfindenden Ausbildung von „Interstrand Cross-Links“. In zellulären Systemen scheinen weitere DNA-Quervernetzungsarten für Photosensibilisierungsreaktionen verantwortlich zu sein. Da diese bislang für Psoralene nicht beschrieben worden sind, ergibt sich somit ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Bezüglich des *in vivo*-Verhaltens muss für die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 ein photoirritatives und photokarzinogenes Potenzial angenommen werden, das eine Langzeitanwendung als Immunmodulator eher ungünstig erscheinen lässt. Photoallergische Reaktionen werden wahrscheinlich nicht ausgelöst.

Zur Beurteilung der Photosensibilisierung müssen natürlich auch andere Gesichtspunkte wie z. B. die erforderliche Dosis und die Pharmakokinetik der beiden Verbindungen berücksichtigt werden. Im Vergleich zu den Verbindungen Psoralen, 5-MOP, 8-MOP und Trioxsalen kann aufgrund der erzielten Ergebnisse zunächst eine höhere Auslösekonzentration der Verbindungen Psora-3 und Psora-4 (LOEC, „Lowest observed Effect Concentration“) für die *in vivo* Photosensibilisierung vermutet werden. *In vivo* sind strukturell ähnliche Verbindungen wie Bergamottin oder 5-BOP untersucht worden. Photoirritationen wurden hierbei nicht beobachtet. Bergamottin weist eine *in vitro*-Reaktivität wie Psora-3 und Psora-4 auf, so dass zumindest in geringen Dosen ein Ausbleiben von photoirritativen Reaktionen erwartet werden kann.

Generell ist die Reaktivität von der Strahlungsdosis abhängig, so dass bei Einsatz von Psora-3 oder Psora-4 und absoluter Karenz von UV-Strahlung eine

Photosensibilisierung nicht auftreten dürfte. Es muss aber erwähnt werden, dass prinzipiell auch im Dunkeln Reaktionen stattfinden, die Unverträglichkeiten oder toxische Prozesse verursachen können.

Vor einem etwaigen Einsatz als Therapeutikum müssten also *in vivo*-Studien durchgeführt werden, die u. a. die Bestimmung der Dosisbereiche der Verbindung und der UV-Strahlung umfassen, in denen photoirritative oder photokarzinogene Reaktionen nicht feststellbar sind. Gegebenenfalls könnten Studien unter oralen Koadministration eines Pflanzenextrakts des südamerikanischen Farns *Polypodium leucotomos* durchgeführt werden, für den vor kurzem eine humanprotektive Wirkung gegenüber Schäden, die durch Psoralene und UV-Strahlung ausgelöst werden, nachgewiesen wurde (Middelkamp-Hup et al. 2004).

In Hinblick auf eine Strukturabwandlung der Verbindungen Psora-3 und Psora-4 oder strukturell ähnlichen Substanzen scheint es ratsam, eine der beiden Doppelbindungen des Furan- oder des Pyranrings zu hydrieren. Photosensibilisierungsreaktionen dürften dann eigentlich nicht feststellbar sein. Die modifizierten Verbindungen müssten trotzdem auf ihre phototoxikologischen Eigenschaften getestet werden, da Photosensibilisierungen z. T. auch bei Cumarin-Derivaten nachweisbar sind. Ebenso müsste überprüft werden, ob durch etwaige Modifikationen die Potenz am Kv1.3-Kanal und die Selektivität gegenüber anderen Kaliumkanälen beeinflusst werden.

Psora-3 und Psora-4 sind für die Erforschung der Photosensibilisierung durch Psoralene sehr interessante Verbindungen, da sie nicht die bekannten „Interstrand Cross-Links“ ausbilden, aber dennoch eine zweifache Reaktionsmöglichkeit z. B. mit DNA aufweisen. Sie könnten damit auch als ein Werkzeug für Studien dienen, die den Mechanismus der Psoralen-Photosensibilisierung und Effekte wie Hautkrebsentstehung, Hautpigmentierung bei Vitiligo oder Reduzierung der kutanen Hyperproliferation bei Psoriasis betrachten.

9 Literaturverzeichnis

Abarca J. F., Casiccia C. C. und Zamorano F. D. (2002) Increase in Sunburns and Photosensitivity Disorders at the Edge of the Antarctic Ozone Hole, Southern Chile, 1986-2000. *Journal of the American Academy of Dermatology* 46(2):193-199

Adam W. (1981) Die Singulett-Sauerstoff-Story. *Chemie in unserer Zeit* 15(6):190-196

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. und Walter P. (2004) Der Aufbau der Membran. In: *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH, Weinheim, 675-709

Allison A. C., Magnus I. A. und Young M. R. (1966) Role of Lysosomes and of Cell Membranes in Photosensitization. *Nature* 209:874-878

Amron D. M. und Moy R. L. (1991) Stratospheric Ozone Depletion and its Relationship to Skin Cancer. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* 17(4):370-372

Anonymous (2002) Note for Guidance on Photosafety Testing. CPMP, EMEA, London

Anonymous (2004) Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety News 16:1-3

Ashwood-Smith M. J., Ceska O., Warrington P. J., Morris T. F. und Altamirano M. (1992) The Photobiological Activity of 5-Geranyloxypsoralen and its Photoproducts. *Photochemistry and Photobiology* 55(4):529-532

Aubin F., Humbert P. und Agache P. (1994) Are the Immune Effects of Psoralen Plus UVA Radiation on Murine ATPase positive Langerhans Cells related to DNA Binding Activity? In: *Biologic Effects of Light 1993*, Jung E. G. und Holick M. F. (Hrsg.), Walter de Gruyter, Berlin, 134-138

Averbeck D. (1989) Recent Advances in Psoralen Phototoxicity Mechanism (Yearly Review). *Photochemistry and Photobiology* 50(6):859-882

Averbeck D. und Papadopoulo D. (1986) Genetic Effects of DNA Mono- and Diadducts photoinduced by Furocoumarins in eukaryotic Cells. *IARC Scientific Publications* (70):299-312

Barratt M. D., Castell J. V., Miranda M. A. und Langowski J. J. (2000) Development of an Expert System Rulebase for the prospective Identification of Photoallergens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 58:54-61

Beauchamp C. und Fridovich I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamid Gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287

Beggs P. J. (2000) Impacts of Climate and Climate Change on Medications and human Health. Australian and New Zealand Journal of Public Health 24(6):630-632

Beijersbergen van Henegouwen G. M. J., Wijn E. T. und Schoonderswoerd S. A. (1989) A Method for the Determination of PUVA-induced in vivo irreversible Binding of 8-Methoxypsoralen (8-MOP) to epidermal Lipids, Proteins and DNA/RNA. Journal of Photochemistry and Photobiology B 3(4):631-635

Bensasson R. V., Land E. J. und Salet C. (1978) Triplet Excited State of Furocoumarins: Reaction with Nucleic Acid Bases and Amino Acids. Photochemistry and Photobiology 27:273-280

Bessho T. (2003) Induction of DNA Replication-mediated Double Strand Breaks by Psoralen DNA Interstrand Cross-links. Journal of Biological Chemistry 278(7): 5250-5254

Bethea D., Fullmer B., Syed S., Seltzer G., Tiano J., Rischko C., Gillespie L., Brown D. und Gasparro F. P. (1999) Psoralen Photobiology and Photochemotherapy: 50 Years of Science and Medicine. Journal of Dermatological Science 19:78-88

Bohr V. und Lerche A. (1978) In vitro Crosslinking of DNA by 8-Methoxypsoralen visualized by Electron Microscopy. Biochimica et Biophysica Acta 519(2):356-364

Bourgaud F., Allard N., Guckert A. und Forlot P. (1989) Natural Sources of Furocoumarins (Psoralens). In: Psoralens - Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological Activities, Fitzpatrick T. B., Forlot P., Pathak M. A. und Urbach F. (Hrsg.), John Libbey Eurotext, London, 219-229

Bowers A. G. (1999) Phytophotodermatitis. American Journal of Contact Dermatitis 10(2):89-93

Boyer V., Moustacchi E. und Sage E. (1988) Sequence Specificity in Photoreaction of various Psoralen Derivatives with DNA: Role in biological Activity. Biochemistry 27(8):3011-3018

Brendler-Schwaab S., Czich A., Epe B., Gocke E., Kaina B., Müller L., Pollet D. und Utesch D. (2004) Photochemical Genotoxicity: Principles and Test Methods. Report of a GUM Task Force. Mutation Research 566(1):65-91

Brusik D. J. und Müsch H. (2004) Genotoxikologie. In: Lehrbuch der Toxikologie, Marquardt H. und Schäfer S. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 133-156

Caffieri S. (2001) Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Determination of Lipophilicity of Furocoumarins. Relationship with DNA Interaction. Journal of Pharmaceutical Sciences 90(6):732-739

Caffieri S., Lucchini V., Rodighiero P., Miolo G. und Dall'Acqua F. (1988) 3,4- and 4'5'-Photocycloadducts between 4'-Methylangelicin and Thymine from DNA. Photochemistry and Photobiology 48(5):573-577

- Caffieri S., Ruzzene M., Guerra B., Frank S., Vedaldi D. und Dall'Acqua F. (1994)* Psoralen-fatty Acid Cycloadducts activate Protein Kinase C (PKC) in Human Platelets. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 22(3):253-256
- Caffieri S., Tamborrino G. und Dall'Acqua F. (1987)* Formation of Photoadducts between Unsaturated Fatty Acids and Furocoumarins. *Médecine, Biologie, Environment* 15:11-14
- Carraro C. und Pathak M. A. (1988)* Studies on the Nature of in vitro and in vivo Photosensitization Reactions by Psoralens and Porphyrins. *The Journal of Investigative Dermatology* 90(3):267-275
- Chandy K. G., Wulff H., Beeton C., Pennington M., Gutman G. A. und Cahalan M. D. (2004)* K⁺ Channels as Targets for specific Immunomodulation. *Trends in Pharmacological Sciences* 25(5):280-289
- Chatgililoglu C. und O'Neill P. (2001)* Free Radicals associated with DNA Damage. *Experimental Gerontology* 36(9):1459-1471
- Cooper T. G. (1981)* Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin
- Cullinane C. und Bohr V. A. (1998)* DNA Interstrand Cross-Links induced by Psoralen are not repaired in Mammalian Mitochondria. *Cancer Research* 58(7):1400-1404
- Dall'Acqua F., Magno S. M., Zambon F. und Rodighiero G. (1979)* Kinetic Analysis of the Photoreaction (365 nm) between Psoralen and DNA. *Photochemistry and Photobiology* 29:489-495
- Dall'Acqua F., Marciani S., Ciavatta L. und Rodighiero G. (1971)* Formation of Inter-Strand Cross-Linkings in the Photoreactions between Furocoumarins and DNA. *Zeitschrift für Naturforschung B* 26(6):561-569
- Dall'Acqua F. und Martelli P. (1991)* Photosensitizing Action of Furocoumarins on Membrane Components and consequent intracellular Events. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 8(3):235-254
- Dall'Acqua F., Tamborrino G., Vedaldi D. und Arslan P. (1987)* Photohemolysis of Erythrocytes by Furocoumarins. *Médecine, Biologie, Environment* 15:43-46
- Davies M. J. (2003)* Singlet Oxygen-mediated Damage to Proteins and its Consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3):761-770
- Dean R. T., Fu S., Stocker R. und Davies M. J. (1997)* Biochemistry and Pathology of Radical-mediated Protein Oxidation. *The Biochemical Journal* 324(1):1-18
- Demaret J.-P., Brunie S., Ballini J.-P. und Vigny P. (1989)* Geometry of Intercalation of Psoralens in DNA approached by molecular Mechanics. *Photochemistry and Photobiology* 50(1):7-21

Diembeck W. und Pape W. J. W. (1995) Protein (photo-)binding Assay, Standard Operating Procedure. Invitox Protocols, ECVAM, Ispra

Ebert G. (1992) Biopolymere. Teubner Verlag, Stuttgart

Eichman B. F., Mooers B. H. M., Alberti M., Hearst J. E. und Ho P. S. (2001) The Crystal Structures of Psoralen Cross-linked DNAs: Drug-dependent Formation of Holliday Junctions. *Journal of Molecular Biology* 308(1):15-26

Epe B. (1991) Genotoxicity of Singlet Oxygen. *Chemico-Biological Interactions* 80:239-260

Epstein J. H. (1999) Phototoxicity and Photoallergy. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 18(4):274-284

Ferguson J. (2002) Photosensitivity due to Drugs. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 18(5):262-269

Finkelstein E., Afek U., Gross E., Aharoni N., Rosenberg L. und Halevy S. (1994) An Outbreak of Phytophotodermatitis due to Celery. *International Journal of Dermatology* 33(2):116-118

Foot C. S. (1991) Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation. *Photochemistry and Photobiology* 54(5):659

Frederick J. E., Snell H. E. und Haywood E. K. (1989) Solar Ultraviolet Radiation at the Earth's Surface. *Photochemistry and Photobiology* 50(8):443-450

Frederick J. E., Weatherhead E. C. und Haywood E. K. (1991) Long-term Variations in Ultraviolet Sunlight reaching the Biosphere: Calculations for the past three Decades. *Photochemistry and Photobiology* 54(5):781-788

Gasparro F. P., Felli A. und Schmitt I. M. (1997) Psoralen Photobiology: The Relationship between DNA Damage, Chromatin Structure, Transcription, and immunogenic Effects. *Recent Results in Cancer Research* 143:101-127

Gasparro F. P., Liao B., Foley P. J., Wang X. M. und McNiff J. M. (1998) Psoralen Photochemotherapy, Clinical Efficacy and Photomutagenicity: The Role of Molecular Epidemiology in Minimizing Risks. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31:105-112

Girotti A. W. (1990) Photodynamic Lipid Peroxidation in biological Systems. *Photochemistry and Photobiology* 51(4):497-509

Girotti A. W. (1998) Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in biological Systems. *The Journal of Lipid Research* 39(8):1529-1542

Girotti A. W. und Kriska T. (2004) Role of Lipid Hydroperoxides in Photo-Oxidative Stress Signaling. *Antioxidants and Redox Signaling* 6(2):301-310

Granger M. und Hélène C. (1983) Photoaddition of 8-Methoxypsoralen to E. coli DNA Polymerase I. Role of Psoralen Photoadducts in the photosensitized Alterations of POL I enzymatic Activities. *Photochemistry and Photobiology* 38(5):563-568

Greenwood N. N. und Earnshaw A. (1988) Chemie der Elemente. VCH, Weinheim

Grossweiner L. I. (1984) Mechanisms of Photosensitization by Furocoumarins. *National Cancer Institute Monograph* 66:47-54

Grossweiner L. I. (1989) Photophysics. In: *The Science of Photobiology*, Smith K. C. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 1-46

de Gruijl F. R. , Longstreth J., Norval M., Cullen A. P., Slaper H., Kripke M. L., Takizaea Y. und van der Leun J. C. (2003) Health Effects from Stratospheric Ozone Depletion and Interactions with Climate Change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2:16-28

Gunther E. J., Yeasky T. M., Gasparro F. P. und Glazer P. M. (1995) Mutagenesis by 8-Methoxypsoralen and 5-Methylangelicin Photoadducts in Mouse Fibroblasts: Mutations at cross-linkable Sites induced by Monoadducts as well as Cross-Links. *Cancer Research* 55(6):1283-1288

Häberle M., Kerscher M. und Freitag M. (1998) Hauterkrankungen durch physikalische und chemische Noxen, Pigmentierungsstörungen. In: *Klinikleitfaden Dermatologie - Angiologie, Andrologie, Allergologie, Proktologie*, Altmeyer P., Dirschka T. und Hartwig R. (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Ulm, 279-306

Heskel N. S., Amon R. B., Storrs F. J. und White C. R. Jr. (1983) Phytophotodermatitis due to *Ruta graveolens*. *Contact Dermatitis* 9(4):278-280

Higuchi Y. (2003) Chromosomal DNA Fragmentation in Apoptosis and Necrosis induced by oxidative Stress. *Biochemical Pharmacology* 66(8):1527-1535

Hofmann-Aßmus M. (2004) UV-Schäden - Hautkrebs auf dem Vormarsch. *Pharmazeutische Zeitung* 149(28):2368-2372

Holtzman S. (2000) In Silico Toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 919:68-74

Hornicek F. J., Malinin G. I., Glew W. B., Awret U., Garcia J. V. und Nigra T. P. (1985) Photochemical Cross-Linking of Erythrocyte Ghost Proteins in the Presence of 8-Methoxy- and Trimethylpsoralens. *Photobiochemistry and Photobiophysics* 9:263-269

Ichihashi M., Ueda M., Budiyanto A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K. und Horikawa T. (2003) UV-induced Skin Damage. *Toxicology* 189:21-39

van Iperen H. P. und Beijersbergen van Henegouwen G. M. J. (1997) Clinical and mechanistic Aspects of Photopheresis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 39(2):99-109

- Johnson B. E. (1984)* Light Sensitivity associated with Drugs and Chemicals. In: *The Physiology and Pathophysiology of the Skin*, Jarrett A. (Hrsg.), Academic Press, London, 2541-2606
- Johnson B. E. (1992)* Drug and Chemical Photosensitization. In: *The Environmental Threat to the Skin*, Marks R. und Plewig G. (Hrsg.), Martin Dunitz, London, 57-66
- Jones P. A. und King A. V. (2003)* High throughput Screening (HTS) for Phototoxicity Hazard using the in vitro 3T3 Neutral Red Uptake Assay. *Toxicology in Vitro* 17(5-6):703-708
- Kautsky H. und de Bruijn H. (1931)* Die Aufklärung der Photolumineszenztilgung fluoreszierender Systeme durch Sauerstoff: Die Bildung aktiver, diffusionsfähiger Sauerstoffmoleküle durch Sensibilisierung. *Die Naturwissenschaften* 19(52):1043
- Kavli G. und Volden G. (1984)* Phytophotodermatitis. *Photodermatology* 1(2):65-75
- Kavli G., Volden G., Midelfart K., Krokan H., Prytz J. O. und Haugsbo S. (1983)* In vivo and in vitro Phototoxicity of different Parts of *Heracleum Laciniatum*. *Contact Dermatitis* 9(4):269-273
- Kersten B., Kasper P., Brendler-Schwaab S. Y. und Müller L. (2002)* Use of the Photo-Micronucleus Assay in Chinese Hamster V79 cells to study photochemical Genotoxicity. *Mutation Research* 519:49-66
- Kersten B., Zhang J., Brendler-Schwaab S. Y., Kasper P. und Müller L. (1999)* The Application of the Micronucleus test in Chinese Hamster V79 Cells to detect drug-induced Photogenotoxicity. *Mutation Research* 445:55-71
- Kirby T. W. und Fridovich I. (1982)* A Picomolar Spectrophotometric Assay for Superoxid Dismutase. *Analytical Biochemistry* 127:435-440
- Kittler L. und Löber G. (1984)* Photoreactions of Furocoumarins with Membrane Constituents. Results with Fatty Acids and Artificial Bilayers. *Studia Biophysica* 101:69-72
- Knox C. N., Land E. J. und Truscott T. G. (1986)* Singlet Oxygen Generation by Furocoumarin Triplet States - I. Linear Furocoumarins (Psoralens). *Photochemistry and Photobiology* 43(4):359-363
- Knox C. N., Land E. J. und Truscott T. G. (1988)* Triplet State Properties and Triplet-State-Oxygen Interactions of some linear and angular Furocoumarins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 1(3):315-321
- Korffmacher H., Hartwig R., Matthes U., Dirschka T., Albassam A., Weindorf N. und Altmeyer P. (1994)* Contact Allergy to 8-Methoxypsoralen. *Contact Dermatitis* 30: 283-285
- Körner P. (2002)* 3-Alkyl- and 3-Aryl-7H-furo[3,2-g]-1-benzopyran-7-ones: Synthesis, Photoreactivity, and Fluorescence Properties. *Archiv der Pharmazie* 335(5):187-199

-
- Körner P. (2003)* 3-Alkyl- and 3-Aryl-(7-oxo-7H-furo[3,2-g]chromen-5-yl)alkanoic Acids as Inhibitors of Leukotriene B₄ Biosynthesis. *Archiv der Pharmazie* 336(6-7):273-284
- Kornhauser A., Wei R. R. und Warner W. G. (1998)* In vitro Assays for Phototoxicity. *International Journal of Toxicology* 17(5):567-570
- Kostovic K., Situm M. und Nola I. (2002)* Phototherapy (UVB) and Photochemotherapy (PUVA) for Psoriasis. *Acta Clinica Croatica* 41:103-112
- Kowalzick L., Mensing H. und Wagner G. (2000)* Praxis der Lichtdermatosen - Diagnostik, Therapie und Prävention. Uni-Med Verlag, Bremen
- Kraljic I. und Mohsni S. E. (1978)* A new Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solution. *Photochemistry and Photobiology* 28:577-581
- Lagey K., Duinslaeger L. und Vanderkelen A. (1995)* Burns induced by Plants. *Burns* 21(7):542-543
- Lebwohl M. (2003)* Psoriasis. *The Lancet* 361:1197-1204
- Lehmann P. (2004)* Heliotrope Erkrankungen - Diagnostik und Therapie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 129(6):259-266
- Lehninger L., Nelson D. L. und Cox M. M. (1994)* Nucleotide und Nucleinsäuren. In: *Prinzipien der Biochemie*, Tschesche H. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 337-416
- Litt J. Z. (2001)* The Pharmacist's Guide to Drug Eruptions and Interactions. Parthenon Publishing, New York
- Ljunggren B. (1977)* Psoralen Photoallergy caused by Plant Contact. *Contact Dermatitis* 3:85-90
- Llano J., Raber J. und Eriksson L. A. (2003)* Theoretical Study of phototoxic Reactions of Psoralens. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 154(2-3):235-243
- Lovell W. W. und Jones P. A. (2000)* An Evaluation of Mechanistic In Vitro Tests for the Discrimination of Photoallergic and Photoirritant Potential. *Alternatives to Laboratory Animals* 28:707-724
- Luksiene Z. (2003)* Photodynamic Therapy: Mechanism of Action and Ways to improve the Efficiency of Treatment. *Medicina (Kaunas)* 39(12):1137-1150
- Magnus I. A. (1976)* Dermatological Photobiology: Clinical and experimental Aspects. Blackwell Scientific Publications, Oxford

Malinin G. I., Lo H. K. und Hornicek F. J. (1986) Structural Photomodification of Erythrocyte Ghosts by long Wave UV light and Psoralen. *Photobiochemistry and Photobiophysics* 13:145-153

Marnett L. J. (2002) Oxy Radicals, Lipid Peroxidation and DNA Damage. *Toxicology* 181-182:219-222

Marnett L. J., Riggins J. N. und West J. D. (2003) Endogenous Generation of reactive Oxidants and Electrophiles and their Reactions with DNA and Protein. *The Journal of Clinical Investigation* 111(5):583-593

McCaughan J. S. Jr. (1999) Photodynamic Therapy - A Review. *Drugs and Aging* 15(1):49-68

McClelland P. B., Morgan P., Leach E. E. und Shelk J. (1997) Psoralen Photochemotherapy. *Dermatology Nursing* 9(6):403-417

McKenzie R., Connor B. und Bodeker G. (1999) Increased Summertime UV Radiation in New Zealand in Response to Ozone Loss. *Science* 285:1709-1711

McNeely W. und Goa K. L. (1998) 5-Methoxypsoralen. A Review of its Effects in Psoriasis and Vitiligo. *Drugs* 56(4):667-690

Meffert H., Diezel W., Günther W. und Sönnichsen N. (1976) Photochemotherapy of Psoriasis using 8-Methoxypsoralen and UVA. II. Binding of the Photosensitizer to Protein. *Dermatologische Monatsschrift* 162(11):887-892

Meunier J.-R., Sarasin A. und Marrot L. (2002) Photogenotoxicity of Mammalian Cells: A Review of the Different Assays for In vitro Testing. *Photochemistry and Photobiology* 75(5):437-447

Middelkamp-Hup M. A., Pathak M. A., Parrado C., Garcia-Caballero T., Rius-Diaz F., Fitzpatrick T. B. und Gonzalez S. (2004) Orally Administered Polypodium Leucotomos Extract decreases Psoralen-UVA-Induced Phototoxicity, Pigmentation, and Damage of Human Skin. *American Academy of Dermatology* 50(1):41-49

Midden W. R. (1988) Chemical Mechanisms of the Bioeffects of Furocoumarins: The Role of Reactions with Proteins, Lipids, and other cellular Constituents. In: *Psoralen DNA Photobiology Volume II*, Gasparro F. P. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, 1-50

Miranda M. A. (1997) Assessment of the Phototoxicity Risk of New Drugs. *Archiv für Toxikologie* 19(S):249-258

Mizuno N., Tsuneishi S., Matsushashi S., Kimura S., Fujimura Y. und Ushijima T. (1974) Some Aspects on the Action Mechanism of 8-Methoxypsoralen Photosensitization. In: *Sunlight and Man*, Fitzpatrick T. B., Pathak M. A., Harber L. C., Seiji M. und Kukita A. (Hrsg.), University of Tokyo Press, Tokyo, 389-409

de Mol N. J. und Beijersbergen van Henegouwen G. M. J. (1981) Relation between some Photobiological Properties of Furocoumarins and their Extent of Singlet Oxygen Production. *Photochemistry and Photobiology* 33:815-819

Molina L. T. und Molina M. J. (1986) Absolute Absorption Cross Sections of Ozone in the 185- to 350-nm Wavelength Range. *Journal of Geophysical Research D* 91(13):14501-14508

Moore D. E. (2002) Drug-Induced Cutaneous Photosensitivity: Incidence, Mechanism, Prevention and Management. *Drug Safety* 25(5):345-372

Moore D. E. und Wang J. (1998) Electron-Transfer Mechanisms in Photosensitization by the Anti-Inflammatory Drug Benzydamine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 43(3):175-180

Moreno G. (1986) Photosensitization of Mammalian Cells by Psoralens and Porphyrins. *Biochimie* 68(6):869-873

Moreno G., Salet C., Kohen C. und Kohen E. (1982) Penetration and Localization of Furocoumarins in Single Living Cells studied by Microspectrofluorometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 721(1):109-111

Musajo L., Bordin F., Caporale G., Marciani S. und Rigatti G. (1967) Photoreactions at 3655Å between Pyrimidine Bases and Skin-Photosensitizing Furocoumarins. *Photochemistry and Photobiology* 6:711-719

Musajo L. und Rodighiero G. (1962) The Skin-Photosensitizing Furocoumarins. *Experientia* 18(4):153-161

Musajo L. und Rodighiero G. (1972) Mode of Photosensitizing Action of Furocoumarins. In: *Photophysiology: Current Topics in Photobiology and Photochemistry*, Giese A. C. (Hrsg.), Academic Press, New York, 115-147

Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K. und Someya T. (1985) A Study of the Phototoxicity of Lemon Oil. *Archives of Dermatological Research* 278(1):31-36

Neumann H.-G. (2004) Biomonitoring. In: *Lehrbuch der Toxikologie*, Marquardt H. und Schäfer S. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1099-1114

Njoo M. D. und Westerhof W. (2001) Vitiligo - Pathogenesis and Treatment. *American Journal of Clinical Dermatology* 2(3):167-181

Noto V. D., Dalla Via L., Gia O., Onori A. M., Cellai L. und Magno S. M. (2000) Furocoumarin-Oligonucleotide Interaction: Kinetics, Selectivity, and Mechanism of the Furocoumarin Photoaddition Reaction to Oligonucleotide Intercalation Sites. *The Journal of Physical Chemistry B* 104:4992-4999

Nyman E. S. und Hynninen P. H. (2004) Research Advances in the Use of tetrapyrrolic Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 73(1-2):1-28

Okamoto Y., Ryu A. und Ohkoshi K. (1999) In Vitro Alternatives and Phototoxicity Testing - I. Evaluation of in Vitro Phototoxicity Assays. *Alternatives to Laboratory Animals* 27:639-664

Oliven A. und Shechter Y. (2001) Extracorporeal Photopheresis: A Review. *Blood Reviews* 15(2):103-108

Pape W. J. W., Maurer T., Pfannenbecker U. und Steiling W. (2001) The Red Blood Cell Phototoxicity Test (Photohaemolysis and Haemoglobin Oxidation): EU/COLIPA Validation Programme on Phototoxicity (Phase II). *Alternatives to Laboratory Animals* 29(2):145-162

Pathak M. A. (1984) Mechanisms of Psoralen Photosensitization Reactions. *National Cancer Institute Monograph* 66:41-46

Pathak M. A. und Fitzpatrick T. B. (1992) The Evolution of Photochemotherapy with Psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 14(1-2): 3-22

Pathak M. A. und Joshi P. C. (1984) Production of Active Oxygen Species ($^1\text{O}_2$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$) by Psoralens and Ultraviolet Radiation (320-400 nm). *Biochimica et Biophysica Acta* 798:115-126

Pendlington R. U. und Barratt M. D. (1990) Molecular Basis of Photocontact Allergy. *International Journal of Cosmetic Science* 12:91-103

Peters B. und Holzhütter H.-G. (2002) In Vitro Phototoxicity Testing: Development and Validation of a new Concentration Response Analysis Software and biostatistical Analysis related to the Use of various Prediction Models. *Alternatives to Laboratory Animals* 30(4):415-432

Piette J. (1991) Biological Consequences associated with DNA Oxidation mediated by Singlet Oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 11:241-260

Placzek M., Kerkmann U., Bell S., Koepke P. und Przybilla B. (2004) Tobacco Smoke is phototoxic. *British Journal of Dermatology* 150(5):991-993

Potapenko A. Y. (1991) Mechanisms of Photodynamic Effects of Furocoumarins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 9(1):1-33

Putman E., van der Laan J. W. und van Loveren H. (2003) Assessing Immunotoxicity: Guidelines. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 17(5):615-626

Quintero B. und Miranda M. A. (2000) Mechanisms of Photosensitization induced by Drugs: A general Survey. *Ars Pharmaceutica* 41(1):27-46

Radenhausen M., Tebbe B. und Orfanos C. E. (1999) Dusch-PUVA: Eine neue Möglichkeit für die lokale PUVA-Therapie. *Der Hautarzt* 50(10):728-732

-
- Ravenscroft J., Goulden V. und Wilkinson M. (2001)* Systemic Allergic Contact Dermatitis to 8-Methoxypsoralen (8-MOP). *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(S6):218-219
- Reuder J., Dameris M. und Koepke P. (2001)* Future UV Radiation in Central Europe modelled from Ozone Scenarios. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 61(3):94-105
- Rodighiero G., Musajo L., Dall'Acqua F., Marciani S., Caporale G. und Ciavatta M. L. (1969)* A Comparison between the Photoreactivity of some Furocoumarins with native DNA and their Skin-Photosensitizing Activity. *Experientia* 25(5):479-481
- Roth L. (1988)* Giftpflanzen - Pflanzengifte - Vorkommen, Wirkung, Therapie, Allergische und Phototoxische Reaktionen. Ecomed, München
- Rowe P. M. (1998)* Photodynamic Therapy begins to shine. *The Lancet* 351:1496
- Russell W. M. S. und Burch R. L. (1959)* The Principles of humane experimental Technique. Methuen, London
- Sage E. und Bredberg A. (1991)* Damage Distribution and Mutation Spectrum: The Case of 8-Methoxypsoralen plus UVA in Mammalian cells. *Mutation Research* 263(4):217-222
- Sage E. und Moustacchi E. (1987)* Sequence Context Effects on 8-Methoxypsoralen Photobinding to defined DNA Fragments. *Biochemistry* 26(12):3307-3314
- Sandmann H. (2001)* Über die ultraviolette Sonnenstrahlung. Der mathematische und naturwissenschaftliche Unterricht 54(5):260-265
- Sasaki M., Meguro F., Kumazawa E., Fujita H., Kakishima H. und Sakata T. (1988)* Evidence for Uptake of 8-Methoxypsoralen and 5-Methoxypsoralen by Cellular Nuclei. *Mutation Research* 197(1):51-58
- Sastry S. S. (1997)* Isolation and partial Characterization of a Novel Psoralen-Tyrosine Photoconjugate from a Photoreaction of Psoralen with a Natural Protein. *Photochemistry and Photobiology* 65(6):937-944
- Sastry S. S., Ross B. M. und P'arraga A. (1997)* Cross-Linking of DNA-binding Proteins to DNA with Psoralen and Psoralen Furan-side Monoadducts. *Journal of Biological Chemistry* 272(6):3715-3723
- Schempp C. M., Schöpf E. und Simon J. C. (2002)* Plant-induced toxic and allergic Dermatitis (Phyto dermatitis). *Der Hautarzt* 53(2):93-97
- Schiavon O. und Veronese F. M. (1986)* Extensive Crosslinking between Subunits of Oligomeric Proteins induced by Furocoumarins plus UV-A Irradiation. *Photochemistry and Photobiology* 43(3):243-246

Schlatter J. (1988) Die toxikologische Bedeutung von Furocoumarinen in pflanzlichen Lebensmitteln. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 79:130-143

Schmitt I. M., Chimenti S. und Gasparro F. P. (1995) Psoralen-Protein Photochemistry - a forgotten Field. Journal of Photochemistry and Photobiology B 27:101-107

Schnyder B. und Caduff P. (2003) Fluoroquinolone und Tendinopathien: Ein Klasseneffekt? Schweizerische Ärztezeitung 84(1-2):29-35

Scott L. J. und Goa K. L. (2000) Verteporfin. Drugs and Aging 16(2):139-146

See J. A. und Weller P. (1993) Ocular Complications of PUVA Therapy. The Australasian Journal of Dermatology 34(1):1-4

Sharman W. M., Allen C. M. und van Lier J. E. (1999) Photodynamic Therapeutics: Basic Principles and Clinical Applications. Drug Discovery Today 4(11):507-517

Sies H. und Menck C. F. (1992) Singlet Oxygen induced by DNA Damage. Mutation Research 275:367-375

Soine T. O. (1964) Naturally Occuring Coumarins and Related Physiological Activities. Journal of Pharmaceutical Sciences 53(3):231-264

Song P.-S. und Tapley K. J. Jr. (1979) Photochemistry and Photobiology of Psoralens. Photochemistry and Photobiology 29:1177-1197

Sousa C. und Sá e Melo T. (1996) Microenvironment Effects on the Excited State Properties of Psoralens: a Clue to Their Photobiological Activity. Photochemistry and Photobiology 63(2):182-186

Specht K. G., Kittler L. und Midden W. R. (1988) A new biological Target of Furocoumarins: Photochemical Formation of covalent Adducts with unsaturated fatty Acids. Photochemistry and Photobiology 47(4):537-541

Specht K. G., Midden W. R. und Chedekel M. R. (1989) Photocycloaddition of 4,5',8'-Trimethylpsoralen and Oleic Acid Methyl Ester: Product Structures and Reaction Mechanism. The Journal of Organic Chemistry 54:4125-4134

Spielmann H., Müller L., Aeverbeck D., Balls M., Brendler-Schwaab S., Castell J. V., Curren R., Silva O. d., Gibbs N. K., Liebsch M., Lovell W. W., Merk H. F., Nash J. F., Neumann N. J., Pape W. J. W., Ulrich P. und Vohr H.-W. (2000) The second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing. Alternatives to Laboratory Animals 28:777-814

Spikes J. D. (1989) Photosensitization. In: The Science of Photobiology, Smith K. C. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 79-110

Stern R. S. (1998) Photocarcinogenicity of drugs. Toxicology Letters 102(1):389-392

-
- Stick C. und Pielke L. (1997)* Ultraviolette Sonnenstrahlung und Sonnenbrandgefahr. Aktuelle Dermatologie 23(11):328-332
- Stryer L. (1999a)* DNA und RNA: Träger der Erbanlagen. In: Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 79-98
- Stryer L. (1999b)* Die oxidative Phosphorylierung. In: Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 557-588
- Swenson M. J. (1993)* Physiological Properties and cellular and chemical Constituents of Blood. In: Dukes' Physiology of Domestic Animals, Swenson M. J. und Reece W. O. (Hrsg.), Cornell University Press, New York, 22-48
- Szafarz D. (1986)* Formation by bifunctional Furocoumarins of DNA Crosslinks and their Repair in cultured Mouse Embryo Fibroblasts. Biochemistry International 13(5):735-739
- Takashima A., Yamamoto K., Kimura S., Takakuwa Y. und Mizuno N. (1991)* Allergic Contact and Photocontact Dermatitis due to Psoralens in Patients with Psoriasis treated with topical PUVA. British Journal of Dermatology 124:37-42
- Tokura Y. (2003)* Immunological and molecular Mechanisms of Photoallergic Contact Dermatitis. Journal of UEOH 25(4):387-395
- Urbach F. (1989)* The biological Effects of increased Ultraviolet Radiation: An Update. Photochemistry and Photobiology 50(4):439-441
- Urbach F. (1998)* Historical Aspects of Phototoxicology. International Journal of Toxicology 17(5):537-540
- Urso M. L. und Clarkson P. M. (2003)* Oxidative Stress, Exercise, and antioxidant Supplementation. Toxicology 189(1-2):41-54
- Vedaldi D., Caffieri S., Frank S., Dall'Acqua F., Jakobs A. und Piette J. (1995)* Sulphur and Selenium Analogues of Psoralen as novel potential Photochemotherapeutic Agents. Il Farmaco 50(7-8):527-536
- Vedaldi D., Caffieri S., Miolo G. und Dall'Acqua F. (1988)* Dark and Photohemolysis of Erythrocytes by Furocoumarins. Zeitschrift für Naturforschung C 43:888-892
- Vedaldi D., Dall'Acqua F., Gennaro A. und Rodighiero G. (1983)* Photosensitized Effects of Furocoumarins: the Possible Role of Singlet Oxygen. Zeitschrift für Naturforschung C 38:866-869
- Vennekamp J., Wulff H., Beeton C., Calabresi P. A., Grissmer S., Hänsel W. und Chandy K. G. (2004)* Kv1.3-blocking 5-Phenylalkoxy-psoralens: A new Class of Immunomodulators. Molecular Pharmacology 65(6):1364-1374
- Dalla Via L. und Magno S. M. (2001)* Photochemotherapy in the Treatment of Cancer. Current Medicinical Chemistry 8:1405-1418

Vollhardt K. P. C. und Schore N. E. (2000) Chemie der Substituenten am Benzolring. In: Organische Chemie, Wiley-VCH, Weinheim, 1075-1136

Wamer W. G., Timmer W. C., Wei R. R., Miller S. A. und Kornhauser A. (1995) Furocoumarin-Photosensitized Hydroxylation of Guanosine in RNA and DNA. Photochemistry and Photobiology 61(4):336-340

Warthan M. M., Sewell D. S., Marlow R. A., Warthan M. L. und Wagner R. F. (2003) The Economic Impact of Acute Sunburn. Archives of Dermatology 139(8):1003-1006

Weissmann I., Wagner G. und Plewig G. (1980) Contact Allergy to 8-Methoxypsoralen. British Journal of Dermatology 102:113-115

Wessner D., Hofmann H. und Ring J. (1999) Phytophotodermatitis due to Ruta graveolens applied as Protection against Evil Spells. Contact Dermatitis 41(4):232

Winter R. und Noll F. (1998) Methoden der Biophysikalischen Chemie. Teubner Verlag, Stuttgart

Wolf E. (2003) Hautkrebs - Kleines Molekül mit großer Wirkung. Pharmazeutische Zeitung 148(37):3286-3287

Wulff H., Rauer H., Düring T., Hanselmann C., Ruff K., Wrisch A., Grissmer S. und Hänsel W. (1998) Alkoxy-psoralens, Novel Nonpeptide Blockers of Shaker-Typ K⁺ Channels: Synthesis and Photoreactivity. Journal of Medicinal Chemistry 41:4542-4549

Yashar S. S. und Lim H. W. (2003) Classification and Evaluation of Photodermatoses. Dermatologic Therapy 16(1):1-7

Yoshikawa K., Mori N., Sakakibara S., Mizuno N. und Song P.-S. (1979) Photo-Conjugation of 8-Methoxypsoralen with Proteins. Photochemistry and Photobiology 29:1127-1133

Zarebska Z. (1994) Cell Membrane, a Target for PUVA Therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology B 23(2-3):101-109

Zarebska Z., Waszkowska E., Caffieri S. und Dall'Acqua F. (1998) Photoreactions of Psoralens with Lecithins. Journal of Photochemistry and Photobiology B 45(2-3): 122-130

Zarebska Z., Waszkowska E., Caffieri S. und Dall'Acqua F. (2000) PUVA (Psoralen + UVA) Photochemotherapy: Process triggered in the cells. Il Farmaco 55(8):515-520

Zaynoun S. T., Johnson B. E. und Frain-Bell W. (1977) A Study of Oil of Bergamot and its Importance as a phototoxic Agent. British Journal of Dermatology 96(5): 475-482

Zhang T., Li J.-L., Ma X.-C. und Tu Z.-H. (2003) Reliability of Phototoxic Tests of Fluoroquinolones in vitro. Acta Pharmacologica Sinica 24(5):453-459

Eigene Veröffentlichungen

Bode C. W. und Hänsel W. (2002) First Results and Improvements of the Red Blood Cell Phototoxicity Test using porcine Erythrocytes. Archiv der Pharmazie 335(S1):75

Bode C. W. und Hänsel W. (2003) Membrane Photocytotoxicity of Kv1.3-Blockers 5-(3-Phenylpropoxy)- and 5-(4-Phenylbutoxy)psoralen. DPhG-Jahrestagung 2003, Würzburg

Kaufmann G., Frötschl R., Bode C. W., Hänsel W. und P. Kasper (2004) Photogenotoxicity Testing of Furocoumarins using the Micronucleus Test and Comet Assay in vitro. GUM-Tagung 2004, Würzburg

Bode C. W. und Hänsel W. (2005) 5-(3-Phenylpropoxy)psoralen and 5-(4-Phenylbutoxy)psoralen: Mechanistic Studies on Phototoxicity. Die Pharmazie 60: zur Publikation angenommen

Bode C. W., Zager A. und Hänsel W. (2005) Photodynamic and Photo-cross-linking Potential of Bergamottin. Die Pharmazie 60: zur Publikation angenommen

Bode C. W., Zager A. und Hänsel W. (2005) Die Photosensibilisierung durch Arzneistoffe: unerwünschte Nebenwirkung und therapeutischer Effekt. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten 28: zur Publikation eingereicht

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von

Prof. Dr. Wolfram Hänsel.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Hänsel danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung der hoch interessanten und aktuellen Thematik, die wertvollen Diskussionen und Anregungen und die Möglichkeit zur Umsetzung eigener wissenschaftlichen Ideen und Interessen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Peter Kasper, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn, für die Durchführung des Photomikrokerntests und des Photocometassays und die ergiebigen und produktiven Diskussionen herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Ulrich Girreser für zahlreiche fruchtbare Gespräche und Hilfestellungen im Rahmen dieser Arbeit.

Ferner sei Herrn Dr. Paul Körner für den besonders in der Anfangsphase wichtigen Gedankenaustausch gedankt.

Für viele interessante Gespräche danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Heber.

Herrn Prof. Dr. Carsten Stick, Institut für Medizinische Klimatologie, Kiel, möchte ich für die Erörterung und Bereitstellung wesentlicher Daten zur UV-Strahlung danken.

Frau Dr. Susann Richert, Institute Dr. Schrader, Holzminden, danke ich für die Durchführung des 3T3-Neutralrotaufnahme-Phototoxizitätstest.

Bei Frau Anne Zager möchte ich mich ganz herzlich für die sehr freundliche und effektive Zusammenarbeit auf unserem gemeinsamen Forschungsgebiet und die zur Verfügung gestellten Zeichnungen bedanken.

Für das sorgfältige Korrekturlesen und die konstruktiven Ratschläge danke ich Frau Silke Bodendiek, Herrn Alexander Schmitz und Frau Anne Zager.

Herrn Björn Henke danke ich für die exzellente Unterstützung bei analytischen und synthetischen Fragestellungen.

Für die vielen netten gemeinsamen Stunden danke ich Herrn Dr. Ulrich Girreser und allen weiteren Kollegen, die gemeinsam mit mir das Praktikum Instrumentelle Analytik betreut haben.

Weiterhin möchte ich allen Professoren und Mitarbeitern des Pharmazeutischen Instituts, insbesondere denen meines Arbeitskreises, für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Allen wissenschaftlichen Hilfskräften des Arbeitskreises sei ebenfalls für ihre Mitarbeit gedankt.

Für die wunderschöne Zeit, die wir miteinander erlebt haben, möchte ich Anja ein besonders liebes Dankeschön aussprechen.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die vielen gemeinsamen Jahre und die Unterstützung, die sie mir jederzeit liebevoll zukommen ließen.

Persönliche Daten

Name	Bode
Vornamen	Carsten Wilhelm
Geburtstag	28. Juni 1976
Geburtsort	Braunschweig
Eltern	Prof. Dr. Dieter Wilhelm Bode Dr. Monika Anna Bode, geb. Lang
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1982-1986	Ostschule Lemgo (Grundschule)
1986-1995	Engelbert-Kämpfer-Gymnasium Lemgo
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium & Ausbildung

1995-1999	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1997-1999	Stipendium der Stiftung der Deutschen Wirtschaft für Qualifizierung und Kooperation e. V. (SDW)
1997-1999	Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1999	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2000	Praktisches Jahr in der Arzneimittelzulassung der GlaxoWellcome GmbH, Hamburg, und in der Leopold-Apotheke, Lemgo
Januar 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

seit April 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfram Hänsel
seit Juni 2004	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, 17. September 2004

Carsten Wilhelm Bode

Die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 sind hochpotente Wirkstoffe, die den lymphozytären Kaliumkanal im unteren nanomolaren Bereich blockieren. Psora-4 ist der bislang potenteste niedermolekulare Kv1.3-Blocker mit einem EC₅₀-Wert von 3 nmol/l. Beide Verbindungen könnten als Immunmodulatoren zur Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder des Typ I-Diabetes eingesetzt werden. Psora-3 und Psora-4 gehören der Substanzgruppe der Furocumarine an, für die bekannt ist, dass sie in der Haut unter dem Einfluss von Sonnenlicht Irritationen, Allergien und Krebs hervorrufen können. Im Fall der Verwendung als Arzneistoff sind solche Nebenwirkungen, gerade bei einer chronischen Anwendung, sehr problematisch und müssen als Risiko gegenüber dem Nutzen abgewogen werden. In dieser Arbeit wurden deshalb die Verbindungen Psora-3 und Psora-4 *in vitro* auf ihre phototoxikologischen Eigenschaften untersucht. Dabei wurden photophysikalische, photochemische und photobiologische Studien nach aktuellen Methoden durchgeführt, die sowohl Rückschlüsse über den Mechanismus der Phototoxizität als auch erste Abschätzungen über das Ausmaß der oben erwähnten Hautreaktionen unter Bestrahlung ermöglichten. Psora-3 und Psora-4 wiesen in den durchgeführten Experimenten in der Regel deutlich geringere Photoreaktivitäten als vergleichbare Furocumarine auf.

Abstract

Psora-3 and Psora-4 are low nanomolecular blockers of the lymphocyte potassium channel Kv1.3. Psora-4 is the most potent small-molecule Kv1.3 blocker known exhibiting an EC_{50} value of 3 nmol/l. Both compounds may be useful as immunomodulators for the therapy of autoimmune disorders such as multiple sclerosis or type-I diabetes. Psora-3 and Psora-4 are compounds relating to the chemical class of furocoumarins. Furocoumarins are known to cause irritations, allergies and cancer in sunlit skin. These adverse effects must be evaluated in comparison to the benefits of a potential chronic therapy. Therefore, the *in vitro* phototoxic properties of Psora-3 and Psora-4 were examined in this work. Both photophysical, photochemical and photobiological investigations were conducted using recent methods, which enabled to draw conclusions concerning the mechanisms and the extent of phototoxicity. With regard to the performed experiments, Psora-3 and Psora-4 mostly showed weaker photoactivities than comparable furocoumarins.