

**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Helmut Sies**

**Untersuchungen zu Zytotoxizität, zellulärer Stressantwort  
und Bedeutung des Singulett-sauerstoffs bei  
5-Aminolävulinat-Photodynamischer Behandlung:  
Effizienz von UVA-Strahlung**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

vorgelegt von

Darius Peter Buchczyk

2003

---

Als Inauguraldisseration gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: PD Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: PD Dr. Axel Gödecke

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Photodynamische Therapie .....	1
1.2	Zelluläre Stressantwort auf Singulett-sauerstoff: MAP-Kinasen.....	6
1.3	Ziele der Arbeit .....	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1	Reagenzien.....	8
2.2	Zellkultur .....	8
2.2.1	Vitalität von Säugerzellen (MTT-Test).....	9
2.2.2	Bestrahlungen .....	9
2.3	Analytik .....	10
2.3.1	Proteinbestimmung .....	10
2.3.2	Porphyrinbestimmung .....	10
2.4	Gelelektrophorese und Western Blot .....	10
2.4.1	Aufbereitung von Proben.....	10
2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer.....	11
2.4.3	Immunanfärbung .....	12
2.4.4	Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“).....	12
2.4.5	Quantifizierung von Western Blots .....	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>14</b>
3.1	Zytotoxizität von ALA-PDT unter Verwendung von UVA, Grün- oder Rotlicht .....	14
3.2	Bedeutung von Singulett-sauerstoff bei UVA-ALA-PDT .....	17
3.3	Einfluß von ALA-PDT auf die Aktivierung von p38 <sup>MAPK</sup> und ERK1/2.....	18
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>26</b>

---

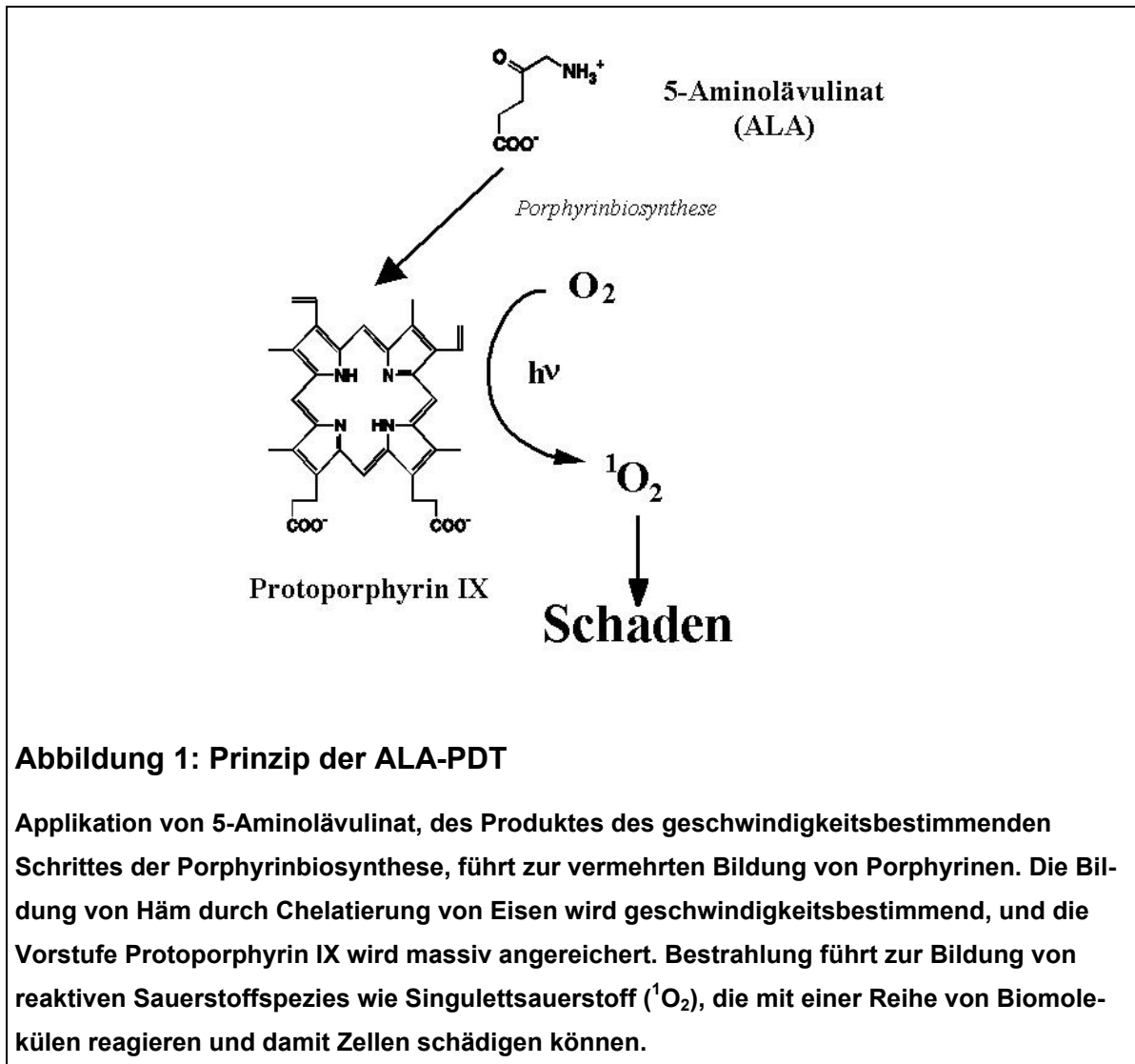
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>36</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	36
7.2	Danksagung.....	37
7.3	Lebenslauf.....	39
7.4	Publikationen und Präsentationen.....	40
7.4.1	Artikel.....	40
7.4.2	Poster-Präsentationen.....	41
7.4.3	Vorträge (Konferenzen/Symposia).....	42

# 1 Einleitung

## 1.1 Photodynamische Therapie

Die therapeutische Nutzung von Licht im sichtbaren und im langwelligen UV-Bereich findet bei dermatologischen Erkrankungen breite Anwendung. Sie kommt zum Einsatz bei kutanen Krebserkrankungen wie Basalzellkarzinomen und Spindelzellkarzinomen (Calzavara-Pinton, 1995; Schuitmaker *et al.*, 1996) und bei einer Reihe von nichtmalignen Hauterkrankungen wie Akne vulgaris (Hongcharu *et al.*, 2000), der atopischen Dermatitis (Abeck *et al.*, 2000; Krutmann, 1996; 1997) oder dem systemischen Lupus erythematoses (McGrath; 1997). Exogen applizierte Photosensibilisatoren wie 8-Methoxypsoralen werden bei der photodynamischen Behandlung der Psoriasis (Bethea *et al.*, 1999; Gasparro *et al.*, 1998; Lauharanta, 1997) oder von T-Zell-Lymphomen (Nestle *et al.*, 1997) eingesetzt. Verwendete Photosensibilisatoren sind Phtalocyanine, Porphycene, Methylenblau u.a. (Fritsch *et al.*, 1998). Die von den Photosensibilisatoren absorbierte Energie führt dann zur Bildung chemisch reaktiver Spezies, die zytotoxische Wirkung entfalten (Abbildung 1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Form der photodynamischen Therapie (PDT) untersucht, bei der die Sensibilisierung der Zielzellen durch eine Stimulation der Porphyrinbiosynthese über die Applikation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) erreicht wird. Die zelltoxische Wirkung der photodynamischen Therapie mit ALA wird über ein ähnliches Prinzip vermittelt, das auch für die Pathogenese von Porphyrinen, einer Gruppe angeborener oder erworbener Erkrankungen, die mit Störungen der Biosynthese von Häm einhergehen, verantwortlich ist. Es kommt zur Überproduktion, Akkumulation und der vermehrten Exkretion von Porphyrinen oder deren Vorstufen. Die Erkrankten entwickeln neben Anämie, Erythrodermie, Splenomegalie, diversen neurologischen und psychiatrischen Symptomen auch eine extreme Empfindlichkeit der Haut gegen Licht. Dies führt dazu, dass es in lichtexponierten Arealen zu Hautläsionen mit schlechter Heilungstendenz kommt (zur Übersicht siehe Sassa, 2002).



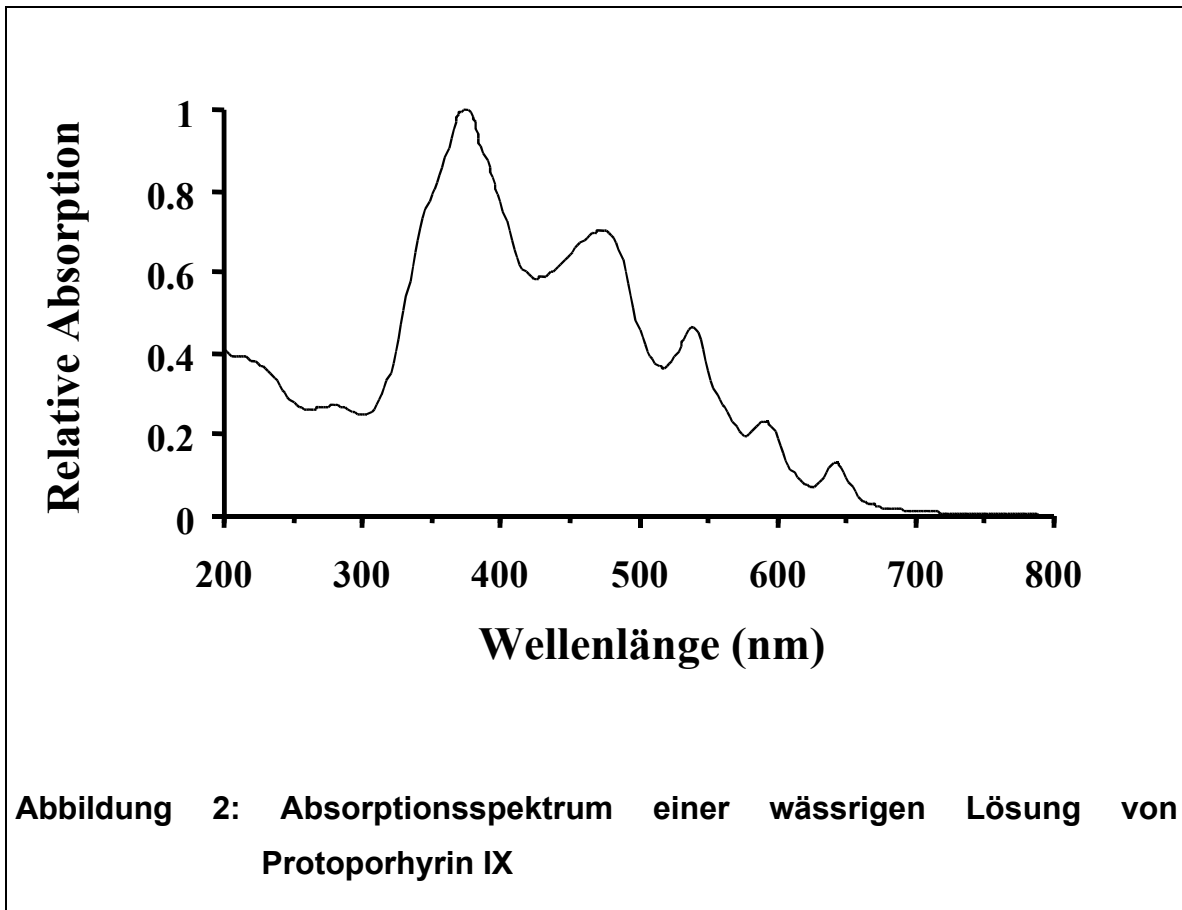
Die Applikation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) bei der ALA-PDT stimuliert die Synthese des Häms (Abbildung 1). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Porphyrinbiosynthese ist die Umsetzung von Succinyl-CoA und Glycin zu ALA. Dieser Schritt unterliegt einer Produkthemmung durch ALA. Durch die Verabreichung von 5-Aminolävulinat wird dieser Regulationsschritt umgangen, um die intrazelluläre Konzentration an Porphyrinen zu erhöhen. Geschwindigkeitsbestimmend und limitierend für die Synthese des Häms wird dann die durch Ferrochelatase katalysierte Chelatierung von Eisen. Jenes Protoporphyrin IX, das nicht mit Eisen zu Häm umgesetzt wird, reichert sich in den Zielzellen massiv an und führt zu deren gesteigerter Photosensibilität. Bei der selektiven Anreicherung der Porphyrine in den Zielzellen macht man sich deren metabolische Besonderheiten zunutze. In Krebszellen führen eine höhere metabolische Aktivität, eine schnellere

---

Aufnahme von ALA und eine oftmals geringere Aktivität der Ferrochelatase zu einer höheren Konzentration von Porphyrin als in gesundem Gewebe. Das wiederum bedingt eine höhere Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Licht (Peng *et al.*, 1997).

Die Anreicherung von Porphyrinen nach ALA-Gabe wird nach lokaler oder systemischer Verabreichung beobachtet (Batlle, 1993; Fukuda *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 1990; Loh *et al.*, 1993; Van Hillegersberg *et al.*, 1992). Kennedy und Mitarbeiter zeigten 1990, dass vor allem neoplastisch erkrankte Gewebe Protoporphyrin anhäufen, und verwendeten als erste topisch verabreichte ALA erfolgreich bei der Therapie des Basalzellkarzinoms.

Protoporphyrin IX absorbiert Licht eines breiten Wellenlängenspektrums. Die Wellenlängen des therapeutisch eingesetzten Lichtes bei ALA-PDT werden so gewählt, dass sie den Absorptionsmaxima des Absorptionsspektrums von Protoporphyrin IX entsprechen (vgl. Abbildung 2). Rotes Licht wird bislang am häufigsten benutzt, da es tiefer ins Gewebe eindringt als kurzwelliges Licht. Die Therapie mit rotem Licht ist allerdings nicht ohne Nebenwirkungen. Die assoziierte thermische Strahlung erhitzt das behandelte Gewebe stark und verursacht brennende Schmerzen. Auf der Suche nach einer alternativen Bestrahlung mit weniger Nebenwirkung wurde bereits ALA-PDT mit Grünlicht durchgeführt (Fritsch *et al.*, 1997). Diese Therapieform zeigte bei Solarkeratosen sowie oberflächlichen Hauttumoren einen ähnlichen Wirkungsgrad wie ALA-PDT mit Rotlicht, hatte jedoch weniger unerwünschte Begleiterscheinungen. Die Ursache dafür wird in der stärkeren Absorption von Grünlicht durch Protoporphyrin IX und in der niedrigen assoziierten thermischen Strahlung von grünem Licht gesehen.

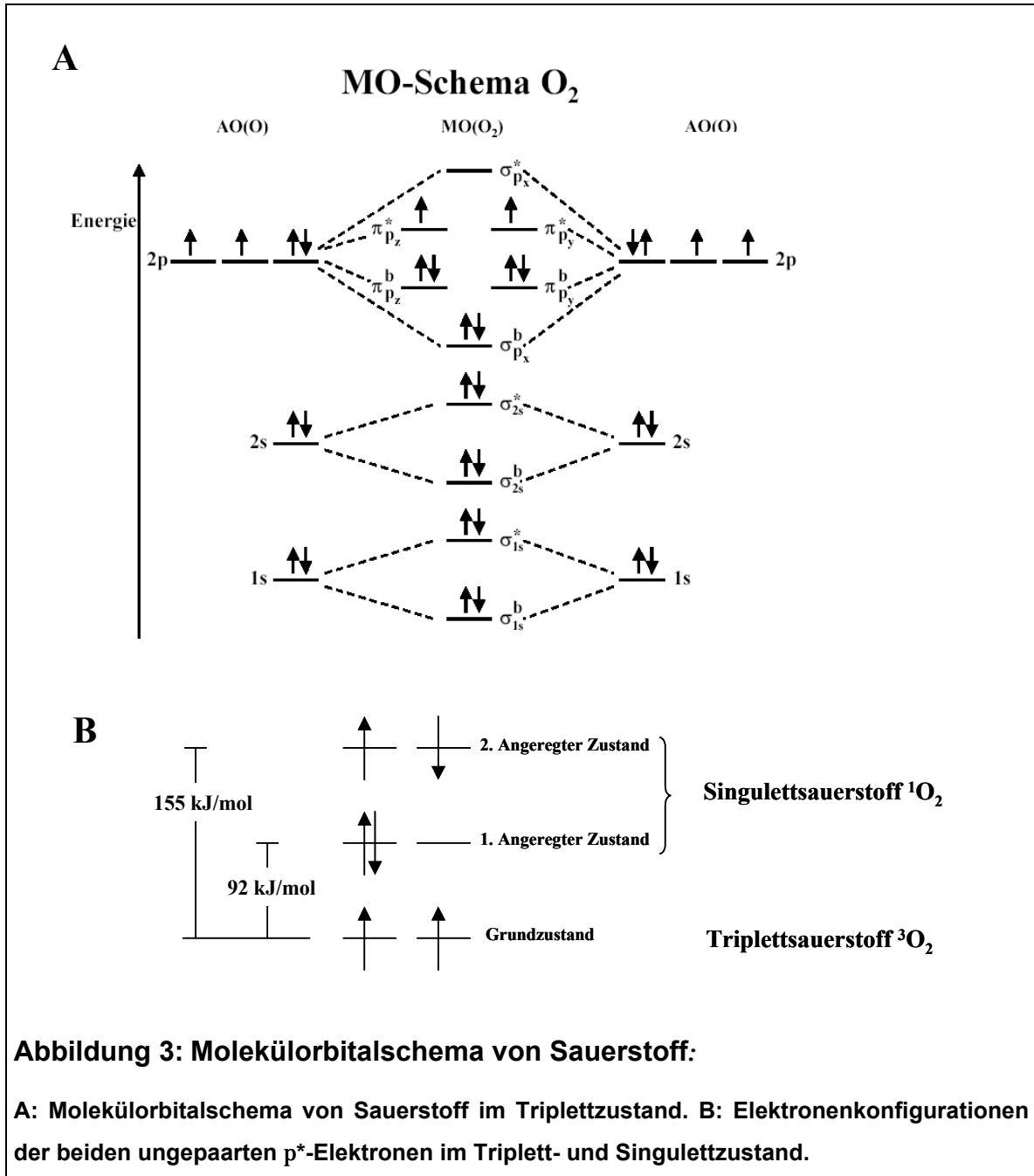


Ein Wellenlängenbereich, bei dem Protoporphyrin IX noch besser als im grünen oder roten Bereich absorbiert, ist langwelliges ultraviolettes (UV) Licht im Bereich von 320 bis 400 nm (UVA; vgl. Abbildung 2). Ultraviolette Strahlung wird von Protoporphyrin IX gut absorbiert und erlaubt somit kurze Bestrahlungszeiträume, in denen die Haut weniger stark erhitzt wird. Es vermag die Haut dabei noch relativ gut zu durchdringen: Nach Durchstrahlung der Epidermis können noch 20-30 % der Intensität der Eingangsstrahlung in der Dermis gemessen werden (Bruls *et al.*, 1984).

Die absorbierte Energie wird unter anderem auf physikalisch gelösten molekularen Sauerstoff übertragen, was zur intrazellulären Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt, die die betroffenen Zellen schädigen und abtöten können (Abbildung 1). Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) ist ein wichtiger Vertreter der unter diesen Umständen entstehenden ROS (Weishaupt *et al.*, 1976).  $^1\text{O}_2$  ist eine kurzlebige, energiereiche Form des Sauerstoffs, bei dem die beiden äußeren Elektronen antiparallelen Spin haben. Damit ergibt sich bei entgegengesetztem Spin der freien Elektronen für die Spinmultiplizität  $M$  ein Wert von 1 ( $M = 2S + 1$ ), wobei die



Summe der Elektronenspinquantenzahlen  $S = (\frac{1}{2} + (-\frac{1}{2}) = 0$  ist. Beim Triplett-sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ), dem molekularen Sauerstoff im Grundzustand, ist  $S = (\frac{1}{2} + (\frac{1}{2}) = 1$  und damit  $M = 3$  (Abbildung 3).



Diese kurzlebige, hochreaktive Form des Sauerstoffs ist das toxische Agens in vielen Formen photodynamischer Therapie (Bonnett 1995).

## 1.2 Zelluläre Stressantwort auf Singulett-Sauerstoff: MAP-Kinasen

Reaktive Sauerstoffspezies sind in eine Vielzahl von zellulären Signaltransduktionsprozessen sowohl unter Ruhe- als auch unter Stressbedingungen involviert (Finkel und Holbrook, 2000; Finkel, 2003; Klotz, 2002; Martindale und Holbrook, 2002). Singulett-Sauerstoff wird als primärer Vermittler der biologischen Wirkungen von UVA-Strahlung und der photodynamischen Therapie angesehen. Dazu gehören Zytotoxizität (Godar, 1999a; Weishaupt *et al.*, 1976; Buchczyk *et al.*, 2001) und das Auslösen einer zellulären Stressreaktion, die die Modulation zellulärer Signaltransduktionsprozesse (Klotz *et al.*, 1997, 1999; Chan *et al.*, 2000), die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Djavaheri-Mergny und Dubertret, 2001) und die verstärkte Expression einer Reihe von Genen (Ryter und Tyrrell, 1998; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Klotz *et al.*, 2001) zur Folge hat. Mit Singulett-Sauerstoff behandelte Zellen weisen dabei ein charakteristisches Muster von aktivierten mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) auf.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (zur Übersicht siehe Hazzalin und Mahadevan, 2002) regulieren die zelluläre Antwort auf Umweltreize über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Sie werden über die duale Phosphorylierung eines Thr-X-Tyr-Motivs aktiviert und phosphorylieren ihre Substrate an Serin oder Threoninresten mit benachbartem C-terminalen Prolin. Neben den klassischen mitogen-aktivierten Proteinkinasen [extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1 und 2], die durch mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren aktiviert werden, gehören zu den MAPK auch durch Stress aktivierbare Kinasen. Zu ihnen gehören die Untergruppe der p38<sup>MAPK</sup> mit vier Vertretern mit Molekulargewichten zwischen 38 und 43 kDa sowie die Untergruppe der c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), bestehend aus 10 Isoformen mit Molekulargewichten zwischen 46 und 57 kDa, die durch drei verschiedene Gene (*jnk1-3*) kodiert werden und durch alternatives Spleißen entstehen. Diese drei Untergruppen von MAPK werden über ähnliche Mechanismen aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch mehr oder minder spezifische MAPK-Kinasen (MKK), die ihrerseits von MKK-Kinasen (MKKK) phosphoryliert und damit aktiviert werden. Diesen Modulen können kleine GTP-bindende Proteine wie Ras übergeordnet sein. Transkriptionsfaktoren wie Elk1, Sap, c-Jun oder ATF2 gehören zu

den Substraten von aktivierten MAPK und vermitteln nach Aktivierung beispielsweise die Expression von c-Jun und c-Fos.

Chemisch, photochemisch und durch UVA generierter Singulett-Sauerstoff aktiviert die stressinduzierbaren MAP-Kinasen p38<sup>MAPK</sup> und JNK, nicht aber ERK-MAP-Kinasen (Klotz *et al.*, 1999). Ein ähnliches Muster der Aktivierung von Stresskinasen wird durch ALA-PDT mit Rotlicht induziert (Klotz *et al.*, 1998). Die Aktivierung von p38 und JNK wird mit zellschädigenden Prozessen in Zusammenhang gebracht und wird in aller Regel durch Stressfaktoren wie inflammatorische Zytokine, Hitze, Oxidantien oder osmotischen Stress induziert (Kyriakis und Avruch, 1996; Tibbles und Woodgett, 1999; Schliess *et al.*, 1995). Die Aktivierung von ERK1/2 wird dagegen als ein Faktor angesehen, der das Überleben der Zelle fördert (Walker *et al.*, 1998; Whitmarsh und Davis, 2000). Das Verhältnis der Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> und JNK zur Aktivierung von ERK1/2 ist eine wichtige Stellgröße, die über Überleben oder Untergang der Zelle entscheiden kann.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Eine Kombination von UVA mit ALA-PDT ist bislang weder bezüglich der zytotoxischen Effizienz noch der dabei induzierten Signaltransduktionsprozesse untersucht worden. Es steht zu erwarten, dass diese Kombination aufgrund der guten Absorption von UVA durch Protoporphyrin IX hinsichtlich der Induktion von Phototoxizität effizienter als Rot- und Grünlicht ist. Unklar ist weiter, ob UVA-ALA-PDT ähnliche zelluläre Signaltransduktionskaskaden induziert wie die zuvor beschriebenen Formen der ALA-PDT.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Kombination von ALA-PDT und UVA im Hinblick auf eine höhere Effizienz gegenüber herkömmlichen Kombinationen von rotem oder grünem Licht mit ALA-Behandlung untersucht werden. Dazu sollte die zytotoxische Wirkung sowie die Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> und ERK 1/2 durch die Bestrahlung mit UVA, grünem und rotem Licht an menschlichen Hautfibroblasten, die mit ALA vorbehandelt wurden, verglichen werden. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob die toxische Wirkung von UVA-ALA-PDT mit der Bildung von Singulett-Sauerstoff zusammenhängt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT),  $\text{NaN}_3$  und  $\text{D}_2\text{O}$  wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), polyklonale Anti-phospho-p38<sup>MAPK</sup>-Antikörper und Anti-total-p38<sup>MAPK</sup>-Antikörper von New England Biolabs (Schwalbach), polyklonale Anti-phospho-ERK1/2-Antikörper von Promega (Mannheim), monoklonale Anti-GAPDH-Antikörper von Chemikon (Hofheim), PVDF-Membranen von Amersham (Freiburg) und Dithiothreitol (DTT) von Roche (Mannheim), 5-Aminolävulinat und andere Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Sekundäntikörper stammten von ICN (Costa Mesa, CA, USA). Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt.

### 2.2 Zellkultur

Menschliche Hautfibroblasten zur Bestimmung des zellulären Porphyrin-gehaltes wurden aus Vorhautbiopsien präpariert, alle anderen im Rahmen dieser Arbeit benutzten Hautfibroblasten stammten von Bio Whittaker Europa (Taufkirchen). Die Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von (Endkonzentrationen) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, 10 % (v/v); Biochrom/Seromed, Berlin und Greiner, Frickenhausen), L-Glutamin (2 mM), Streptomycin (20 mg/l) und Penicillin (20 000 IU/l) kultiviert. Zellen wurden in 600 mL-Kulturflaschen in 30 ml Medium gehalten und etwa 4 Tage nach Aussäen, bei etwa 80% - 100% Konfluenz, trypsiniert und gesplittet. Für Gefrierkulturen wurden 1-2 Mio Zellen in 1 ml Gefriermedium (90% FCS, 10% DMSO) suspendiert, eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Das Kultivieren eingefrorener Zellen erfolgte nach Auftauen in 250 mL-Kulturflaschen. Werden Hautfibroblasten in einer 600 mL-Flasche ( $175\text{ cm}^2$  Wachstumsfläche) zur Konfluenz herangezogen, trypsiniert und gezählt, so gelangt man zu einer Gesamtzahl von etwa 6 Mio Zellen je Flasche; das entspricht einer Wachstumsdichte von ca.  $34000\text{ Zellen/cm}^2$ . Die Wachstumsflächen weiterer verwendeter Kulturschalen und -flaschen sind nach Angaben des Herstellers (Greiner, Frickenhausen)  $75\text{ cm}^2$  für eine 250 mL-Flasche,  $58\text{ cm}^2$  für eine 9 cm-

---

Platte (9,4 cm Durchmesser), 21 cm<sup>2</sup> für eine 6 cm-Platte (6 cm Durchmesser) und 8,7 cm<sup>2</sup> für eine 3 cm-Platte (3,5 cm Durchmesser).

### **2.2.1 Vitalität von Säugerzellen (MTT-Test)**

Vitale Zellen vermögen MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) mittels mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenaseaktivität (Levitz und Diamond, 1985) in das entsprechende blaue, schwerlösliche Formazan umzuwandeln. Zur Messung der Vitalität wurden Zellen in 35 mm Kulturschalen bis zur Konfluenz herangezogen, entsprechend behandelt, nach 24 h gewaschen und mit 800 µL 0,5 mg/mL MTT für etwa 2 h im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente MTT-Lösung in Medium. Bei ausreichender Blaufärbung wurde durch Zusatz von 800 µL Lysislösung [0,1 % (w/v) HCl; 10 % (w/v) SDS] die Reaktion gestoppt und die Zellen lysiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank inkubiert, bis ausgefallenes Formazan in Lösung gegangen war. Schließlich wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen und zum Ausgleich von durch Präzipitate entstehender Absorption die Extinktion bei 690 nm abgezogen. Bei Messung von Zellen, die in anderen Kulturgefäßen herangezogen und behandelt worden waren, wurde das Volumen der MTT-Lösung und der Lysislösung entsprechend angepaßt.

### **2.2.2 Bestrahlungen**

Die Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen zur Konfluenz herangezogen und für 24 h mit ALA (5-Aminolävulinat), das dem Kulturmedium zugesetzt wurde, inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und zur Bestrahlung mit 1 ml HBSS bedeckt. Die Bestrahlung mit UVA (320-400 nm) erfolgte mit der UVA700 Bestrahlungsanlage von Waldmann Lichttechnik (Villingen). Die Bestrahlungsintensität betrug zwischen 10 mW/cm<sup>2</sup> (mit ALA) und 38 bis 45 mW/cm<sup>2</sup> (ohne ALA). Bestrahlungen mit Rotlicht (570-700 nm) wurden mit einer PDT1200 Bestrahlungsanlage von Waldmann Lichttechnik in frischem DMEM bei einer Intensität von 50 mW/cm<sup>2</sup> und Grünlichtbestrahlungen (545 ± 3 nm) mit der "PDT Grünlicht" Bestrahlunglampe von Saalman (Herford) bei Intensitäten von 10-20 mW/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Die Gesamtdosis wurde über Variation der Bestrahlungsdauer (10 s bis 30 min) eingestellt. Zur Bestrahlung in Gegenwart von Natriumazid

---

(20 mM in HBSS) oder PBS mit 90 % D<sub>2</sub>O wurden die Zellen für 10 min im Brutschrank mit der jeweiligen Lösung präinkubiert. Imidazol (40 mM) wurde dem Wachstumsmedium 30 min vor der Behandlung sowie dem HBSS, das die Zellen bei Bestrahlung bedeckte, zugesetzt.

## **2.3 Analytik**

### **2.3.1 Proteinbestimmung**

Proteinbestimmungen erfolgten unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, München, Protein Assay und DC-Protein Assay) gegen Standards aus Rinderserumalbumin. Überschlagsbestimmungen wurden nach Whitaker und Granum (1980) durch UV-Absorptionsmessungen durchgeführt; Proteinkonzentrationen berechnen sich hierbei nach:

$$\text{Protein (mg/mL)} = (E_{235\text{nm}} - E_{280\text{nm}})/2,51.$$

### **2.3.2 Porphyrinbestimmung**

Die Gesamtheit fluoreszierender Porphyrine in Zellen wurde nach Piomelli (1973) bestimmt. Zellen werden hierbei in 1N Perchlorsäure/Methanol (1:1, v/v) homogenisiert und extrahiert. Nach 10minütiger Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der Porphyrine im Überstand durch Fluoreszenzmessung (Anregung bei 405 nm, Emission bei 598 nm) gegen Uroporphyrin als Kalibrierungsstandard. Der Porphyringehalt wird als pmol/mg Protein ausgedrückt. Die Messungen wurden von Klaus Bolsen aus der Arbeitsgruppe um PD Dr. Clemens Fritsch in der dermatologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

## **2.4 Gelelektrophorese und Western Blot**

### **2.4.1 Aufbereitung von Proben**

Proteinextrakte von behandelten Säugerzellen wurden durch direkte Lyse der Zellen mit 2 x Probenpuffer [4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 20 mM DTT] hergestellt. Für eine 35 mm Kulturschale wurden dabei 100 µL 2 x Probenpuffer verwendet. Sollte vor SDS-PAGE eine Proteinbestimmung durchgeführt werden, wurden die Zellen in

100 µL Lysispuffer (PBS, pH 7,5; je 1 µg/mL Aprotinin und Leupeptin; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und durch 3-maliges Einfrieren (-20°C) und Auftauen (20°C) und anschließendes Sonifizieren (20 s, halbmaximale Leistung) lysiert. Nach Proteinbestimmung wurden die Lysate auf die gewünschte Proteinkonzentration mit Lysispuffer eingestellt und mit 2 x Probenpuffer versetzt.

#### 2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer

Die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte nach Angaben von Laemmli (1970) und Towbin (1979):

Trenngel (12 % Acrylamid): 4 % (v/v) Sol 1; 2,5 % (v/v) Sol 2; 3,5 % (v/v) H<sub>2</sub>O; 0,007 % (v/v) APS; 0,0007 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED).  
Sammelgel (4 % Acrylamid): 1,34 % (v/v) Sol 1; 3 % (v/v) Sol 3; 5,66 % (v/v) H<sub>2</sub>O; 0,0075 % (v/v) APS; 0,00075 % (v/v) TEMED. Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: Sol 1: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; Sol 2: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (+8 mM EDTA), pH 8.8. Sol 3: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (+8 mM EDTA), pH 6.8. Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8; APS: 10-12 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat. Nach Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder angefärbt oder auf eine Membran elektrotransferiert. Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteine im Gel durch Schwenken in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R in 10% (v/v) Eisessig; 30-40% (v/v) Methanol oder Ethanol und 50-60 % Wasser für 15-30 min fixiert und angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Schwenken des Gels in Entfärberlösung [10% (v/v) Eisessig; 30% (v/v) Ethanol oder Methanol] entfernt. Nach Elektrophorese wurde das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer [25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5] äquilibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer genäßten 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie gleichermaßen behandelter Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) zum Blotaufbau zusammengestellt. Drei Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren. Der Elektrotransfer wurde bei ca. 100 mA je Minigel für 60-90 min in einer Pharmacia-Multiphor-Kammer (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Zur Kontrolle auf erfolgreichen Transfer wurde die Membran nach Blot für 1 min in essigsaurer Ponceau S-

Lösung [0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure] geschwenkt und dann in Wasser entfärbt. Proteinspuren wurden rot sichtbar. Statt Nitrocellulosemembranen können auch stabilere PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen verwendet werden. Sie sind mit 100% Methanol sowie Säure (z.B. aus Coomassie-Färbelösung) ohne weiteres behandelbar. Das Blotting verläuft wie bei NC-Membranen, allerdings muß die Membran vor Verwendung je einige Sekunden in Methanol und in Wasser (Entfernen überflüssigen MeOHs) angefeuchtet und ein paar Minuten in Transferpuffer [enthält 20% (v/v) MeOH] äquilibriert werden. Zur Transferkontrolle kann hier eine vollständige Coomassie-Anfärbung erfolgen; hierzu wird die Membran für ca. 5 min in Coomassie-Färber [0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R; 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol] geschwenkt und entfärbt [Entfärber: 10% (v/v) Essigsäure; 30% (v/v) Methanol o. Ethanol]. Die nun sehr gut sichtbaren Proteinbanden verschwinden im Verlauf der Immunanfärbung (z.T. bereits im Blockierungsschritt) durch Konkurrenz zwischen Farbstoff- und Proteinmolekülen.

### 2.4.3 Immunanfärbung

Auf den Elektroblob folgte ein kurzes Waschen der Membran in TBST [TBS (20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween-20]. Die Membran wurde nun für 1-3 h bei RT in Blockierpuffer [5% (w/v) Magermilchpulver (Biorad, München) in TBST] geschwenkt, gefolgt von Inkubation mit 1:500 bis 1:1000 in Blockierpuffer verdünntem primärem Antikörper über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 5-10 min bei RT) wurde für 1-2 h mit in Blockierpuffer verdünntem sekundärem Antikörper (in der Regel 1:1000 bis 1:5000) inkubiert. Detektion erfolgte mittels ECL-plus-Kits von Amersham (Freiburg).

### 2.4.4 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Zum Entfernen von Antikörpern von der (PVDF- oder Nitrocellulose-) Membran zum Zwecke des Detektierens anderer Proteine mit neuen Antikörpern wurde die Membran für 30 min im Wasserbad bei 55°C in Stripping-Puffer (100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS; 62,5 mM Tris pH 6,8) geschwenkt. Danach wurde 2-3-mal für ca. 10 min in großen Volumina von TBST bei RT gewaschen



---

und mit dem Blockierungsschritt für die neue Immunanfärbung begonnen. Da mit dem Strippen auch geblottetes Protein verlorengelht, sollte zunächst immer das in vermutlich niedrigeren Mengen vorliegende Antigen nachgewiesen werden.

#### **2.4.5 Quantifizierung von Western Blots**

Quantifizierung von Western Blots erfolgte nach Einscannen der belichteten Filme mit dem Programm Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation, Maryland, USA).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytotoxizität von ALA-PDT unter Verwendung von UVA, Grün- oder Rotlicht

Menschliche Hautfibroblasten wurden für 24 h in Medium mit 1 mM 5-Aminolävulinat inkubiert und im Anschluß mit verschiedenen Dosen UVA (320-400 nm), Grünlicht ( $545 \pm 3$  nm) oder Rotlicht (570-750 nm) bestrahlt (Tabelle 3-1). Die Toxizität der Behandlung wurde mittels des MTT-Tests (2.2.1) quantifiziert, der nach 24stündiger Postinkubation durchgeführt wurde (Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-1**

Porphyrin-Gehalt von ALA-behandelten Hautfibroblasten und Vitalität nach Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlänge

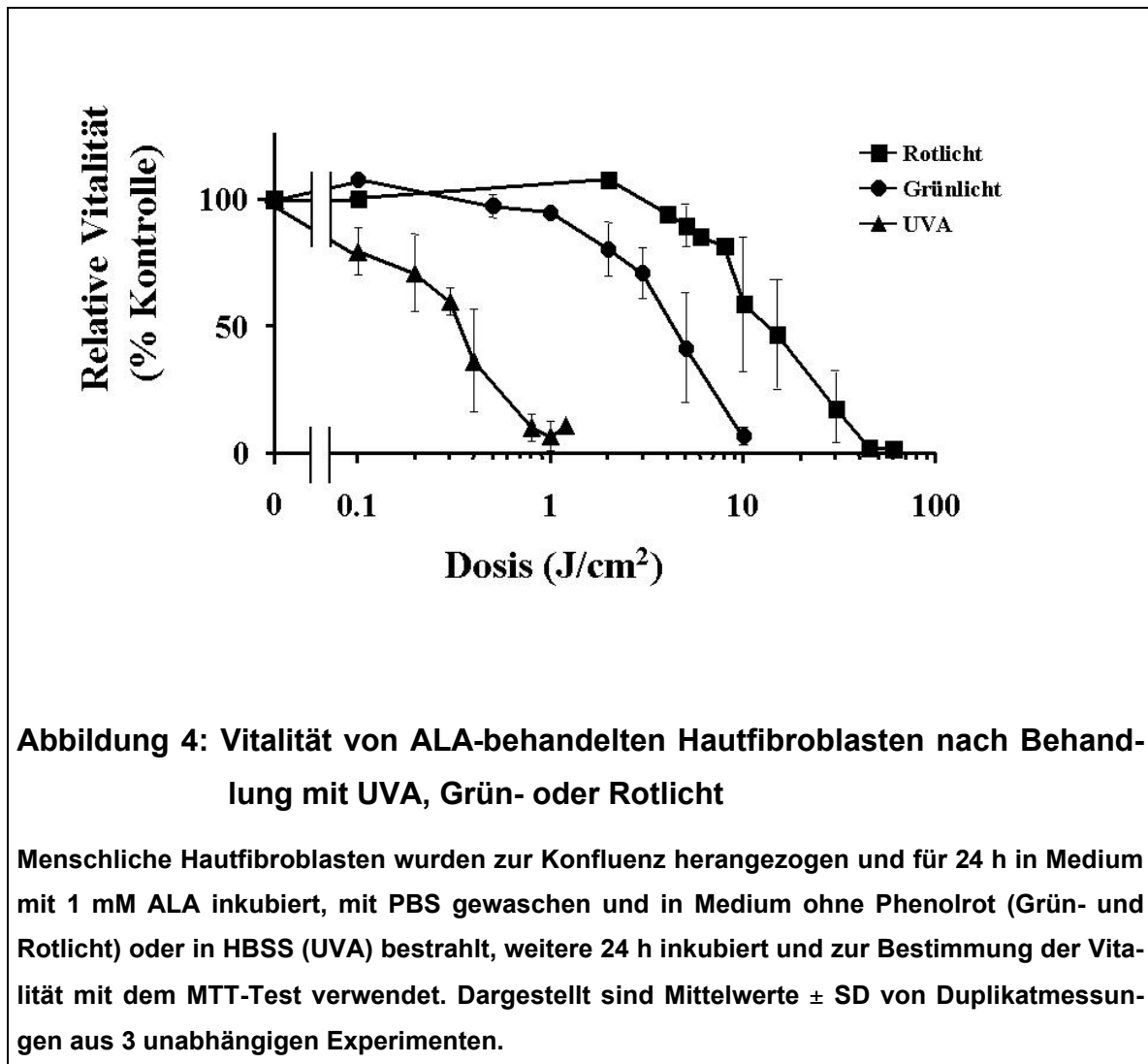
	Porphyrin (pmol / mg Protein) <sup>a</sup>
- ALA	23 ± 7
+ ALA	184 ± 32
	LD <sub>50</sub> (J/cm <sup>2</sup> )
UVA	35
UVA + ALA	0,35
Grünlicht	>25 <sup>b</sup>
Grünlicht + ALA	4,5
Rotlicht	>45 <sup>b</sup>
Rotlicht + ALA	13,5

<sup>a</sup>Angegeben sind Mittelwerte ± SD, n=3

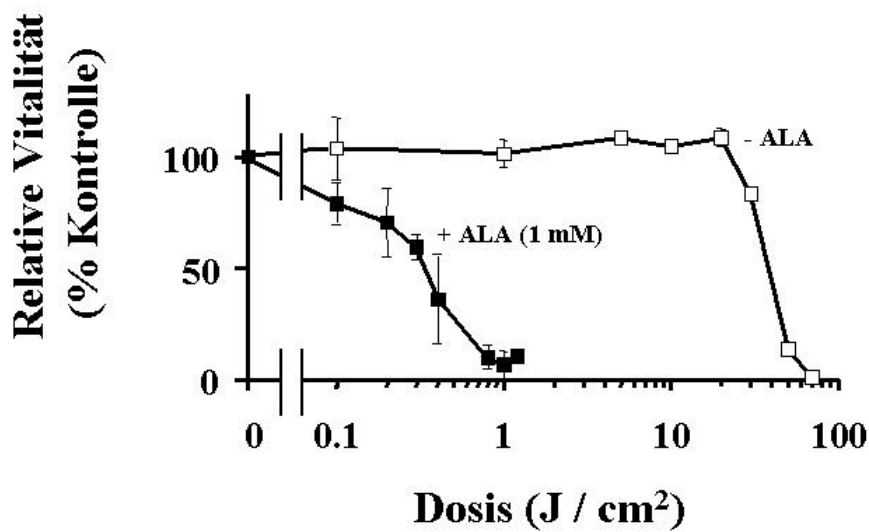
<sup>b</sup>Keine Abnahme der Vitalität mittels MTT-Test bis zur angegebenen Dosis meßbar

Die Zellen wiesen nach 24stündiger Inkubation mit ALA einen hohen Gehalt an Porphyrinen auf der rund das 8fache von unbehandelten Zellen betrug (Tabelle 3-1). Bei Verwendung von UVA bewirkte die Vorbehandlung der Zellen mit ALA, dass die halbmaximale Zytotoxizität der Bestrahlung schon bei 0,35 J/cm<sup>2</sup> erreicht wurde verglichen mit 35 J/cm<sup>2</sup> ohne ALA-Vorbehandlung (Tabelle 3-1). In Abbildung 4 ist die Toxizität der Behandlung mit UVA (Dreiecke), Grünlicht (Kreise) und Rotlicht (Quadrate) nach Vorbehandlung mit ALA dargestellt. Angegeben wird der relative Anteil nach Behandlung lebender Zellen, bezogen auf die

nicht bestrahlte Kontrolle. Für alle Behandlungsarten zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Toxizität.



ALA-PDT mit UVA war die am stärksten toxische Form der untersuchten PDT-Varianten. Die Dosen, die zu einer Reduktion der Zellvitalität auf 50% ( $LD_{50}$ ) führten, waren mit Grünlicht mehr als 10-mal und bei Rotlicht ca. 40-mal so hoch (Tabelle 3-1). UVA-ALA-PDT bewirkte das Absterben nahezu aller Zellen bei ca. 1 J/cm<sup>2</sup>, einer Dosis, die keinerlei toxischen Effekt bei Grün- oder Rotlicht zeigte (Abbildung 4). Die Vitalitäten von ALA-vorbehandelten Zellen nach UVA-Bestrahlung waren, im Vergleich zu Kontrollzellen, die ohne ALA-Präinkubation mit UVA bestrahlt worden waren, 100-fach reduziert (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Einfluß von ALA-Präinkubation auf die Vitalität von Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit UVA**

Menschliche Hautfibroblasten wurden zur Konfluenz herangezogen und für 24 h in Medium mit 1 mM ALA oder in Kontrollmedium inkubiert, mit PBS gewaschen und in HBSS (UVA) bestrahlt, weitere 24 h inkubiert und zur Bestimmung der Vitalität mit dem MTT-Assay verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von Duplikatmessungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

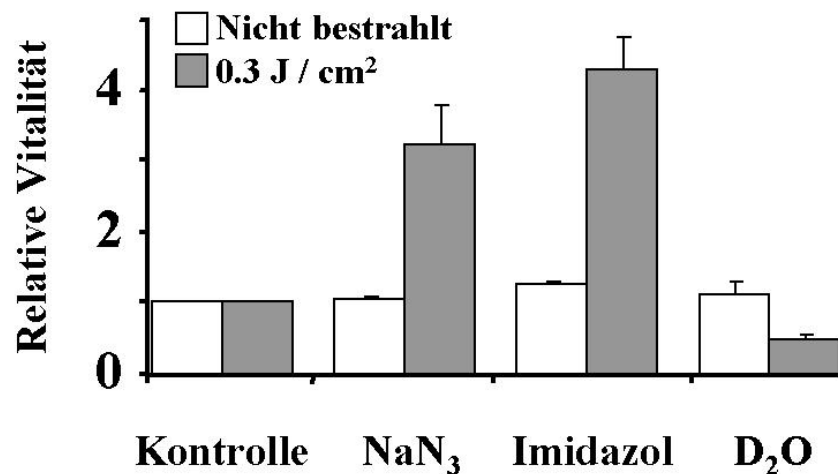
Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem Absorptionsspektrum von Protoporphyrin IX, das die stärkste Absorption im UVA-Bereich zeigt (Abbildung 2). Bei Grün- bzw. Rotlicht konnte, ohne vorherige Behandlung mit ALA, keine Toxizität bei den höchsten verabreichten Dosen (25 bzw. 45 J/cm<sup>2</sup>) gemessen werden. Zusammengenommen erwies sich UVA-ALA-PDT hinsichtlich der vermittelten Zytotoxizität als die effektivste unter den untersuchten Behandlungsvarianten. Bei verschiedenen Formen der photodynamischen Therapie ist Singulett-Sauerstoff ein Faktor, der wesentlichen Anteil an der Vermittlung von Zytotoxizität hat (Karrer *et al.*, 1999; Klotz *et al.*, 1998; Tyrrell und Pidoux, 1989; Weishaupt *et al.*, 1976). Im Folgenden wurde untersucht, ob Singulett-Sauerstoff auch zur Toxizität von UVA-ALA-PDT beiträgt.

---

### 3.2 Bedeutung von Singulett-sauerstoff bei UVA-ALA-PDT

Um die Rolle der Entstehung von Singulett-sauerstoff bei der UVA-ALA-PDT zu untersuchen, wurden Fibroblasten in Gegenwart der Singulett-sauerstoff abfangenden Substanzen Natriumazid (20 mM) oder Imidazol (40 mM) sowie in Gegenwart von Deuteriumoxid [90 % (v/v)] bestrahlt. Während Natriumazid vornehmlich über physikalisches „Quenchen“ die Wirkung von Singulett-sauerstoff abschwächt, reagiert Imidazol chemisch mit Singulett-sauerstoff. Natriumazid und Imidazol verringern somit die Wahrscheinlichkeit, dass Singulett-sauerstoff mit zellulären Strukturen reagiert und diese schädigt. Das sollte in einer erhöhten Vitalität der behandelten Zellen resultieren. In Gegenwart von Deuteriumoxid ist die Lebensdauer von Singulett-sauerstoff dagegen erhöht. Eine verlängerte Lebensdauer des Singulett-sauerstoffs erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Singulett-sauerstoff mit zellulären Strukturen reagiert, bevor er unter Abgabe von Energie wieder in den Triplettzustand übergeht, was zu einer verringerten Vitalität führen sollte. Auf Grundlage dieses Prinzips wurde eine Reihe von biologischen Effekten der UVA-Strahlung auf Singulett-sauerstoff als aktives Agens zurückgeführt, wie etwa Zytotoxizität (Tyrrell und Pidoux, 1989) und oxidative Veränderungen wie Thioldepletion und Lipidperoxidation (Vile und Tyrrell, 1993).

Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurde die Toxizität der UVA-Bestrahlung von ALA-behandelten Zellen in Gegenwart von Natriumazid bzw. Imidazol deutlich verringert: Der Anteil überlebender Zellen war um das 3 bzw. 4-fache erhöht. Umgekehrt verdoppelte die Anwesenheit von Deuteriumoxid die Toxizität der Behandlung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Singulett-sauerstoff ursächlich mit der Zytotoxizität der UVA-ALA-PDT zusammenhängt.



**Abbildung 6: Bedeutung des Singulett-sauerstoffs für die Zytotoxizität der UVA-ALA-PDT bei Hautfibroblasten**

Hautfibroblasten wurden wie in Abbildung 4 beschrieben mit ALA inkubiert. Die Bestrahlung wurde in Gegenwart von 20 mM Natriumazid, 40 mM Imidazol oder 90 % (v/v) Deuteriumoxid durchgeführt. Die Vitalität wurde wie in Abbildung 4 bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei bis sechs unabhängigen Messungen. Vitalität nach Behandlung mit UVA (0.3 J/cm<sup>2</sup>) wurde gleich 1 gesetzt.

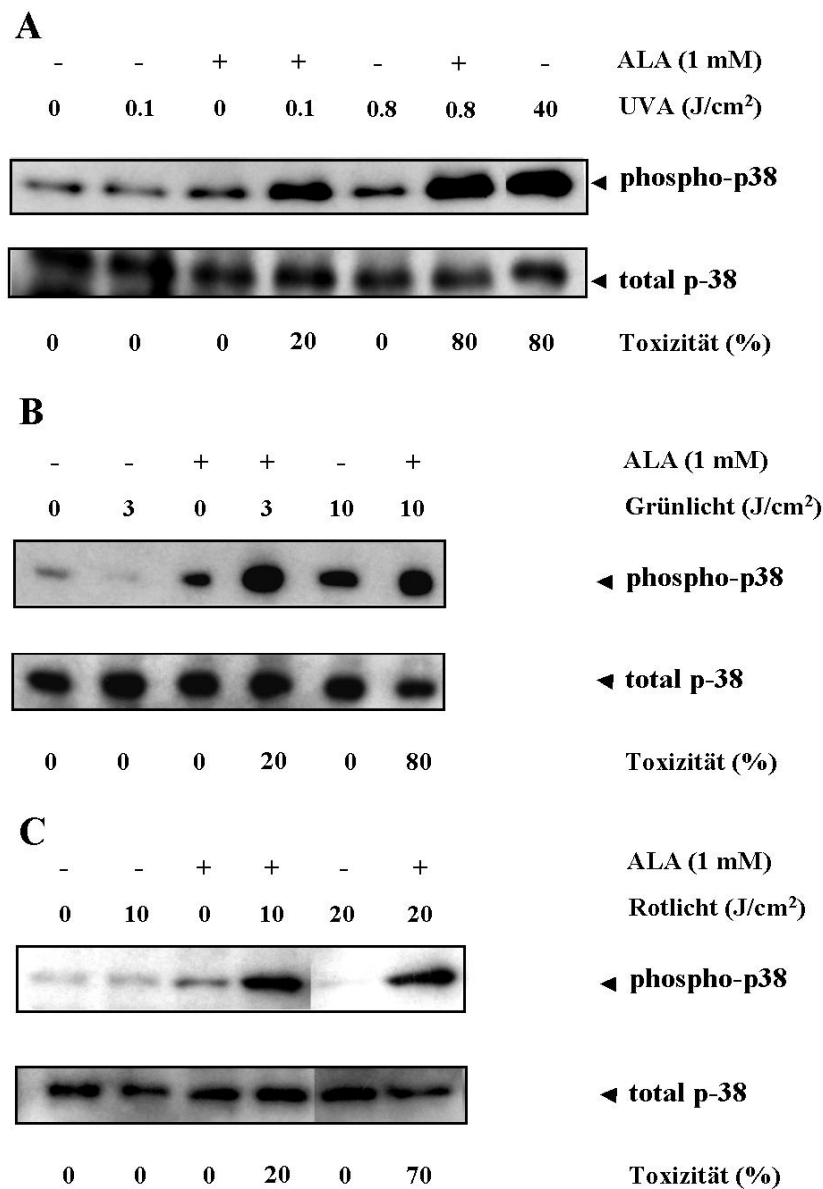
### 3.3 Einfluß von ALA-PDT auf die Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> und ERK1/2

Um zu untersuchen, ob UVA-ALA-PDT nicht nur zytotoxische Wirkung entfaltet, sondern auch auf die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, Einfluß nimmt, wurde die Phosphorylierung (und damit die Aktivierung) der durch Stressfaktoren aktivierbaren Kinasen p38<sup>MAPK</sup> sowie ERK1/2 untersucht. Die proapoptotisch wirksame p38<sup>MAPK</sup> wird durch Singulett-sauerstoff aktiviert (Klotz *et al.*, 1999), der, wie unter 3.2 gezeigt, bei UVA-ALA-PDT entsteht. Darüber hinaus ist Singulett-sauerstoff ein bekannter Mediator der durch UVA hervorgerufenen Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> in Zellen, die nicht mit ALA vorbehandelt worden sind (Klotz *et al.*, 1999). Die Aktivierung von ERK1/2 wiederum, obgleich für Singulett-sauerstoff oder UVA in Hautfibroblasten noch nicht nachgewiesen, ist für das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen förderlich (Whitmarsh und Davis, 2000).

---

Menschliche Hautfibroblasten wurden, nach oder ohne Präinkubation mit ALA, mit UVA bestrahlt, nach einer 30 minütigen Postinkubation lysiert, zur Western Blot-Analyse eingesetzt und auf eine Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> untersucht (Abbildung 7). Eine starke Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> durch UVA war bei einer Dosis von 40 J/cm<sup>2</sup> zu beobachten, die im MTT-Test einer Toxizität von 80 % entsprach (Abbildung 7 A). Eine vergleichbare Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> und Toxizität der Bestrahlung wurde durch deutlich niedrigere Strahlungsdosen erreicht, wenn die Zellen für 24 h mit 1 mM ALA vorbehandelt waren (Abbildung 7 A). Bei Strahlung mit diesen Dosen (0,8 J/cm<sup>2</sup>) ohne Vorbehandlung mit ALA konnte allerdings weder Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> noch deutliche Toxizität beobachtet werden. Eine Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> konnte auch bei geringeren Dosen beobachtet werden, die eine Toxizität von 20 % verursachten.

Bei Bestrahlung mit Grün- oder Rotlicht waren die Dosen, die eine vergleichbare Toxizität von ALA-vorbehandelten Zellen induzierten, höher als bei Bestrahlung mit UVA (Abbildung 4). Entsprechend waren die Dosen, die zu einer p38<sup>MAPK</sup>-Aktivierung führten, bei Grün- (Abbildung 7 B, 3 J/cm<sup>2</sup>) bzw. Rotlicht (Abbildung 7 C, 10 J/cm<sup>2</sup>) deutlich höher als bei UVA (Abbildung 7 A, 0,1 J/cm<sup>2</sup>). In beiden Fällen hatte zudem die ALA-Vorbehandlung wie bei UVA zur Folge, dass dieselben Dosen größere Effekte (p38<sup>MAPK</sup>-Aktivierung, Toxizität) hervorriefen als im Falle der Bestrahlung ohne ALA.



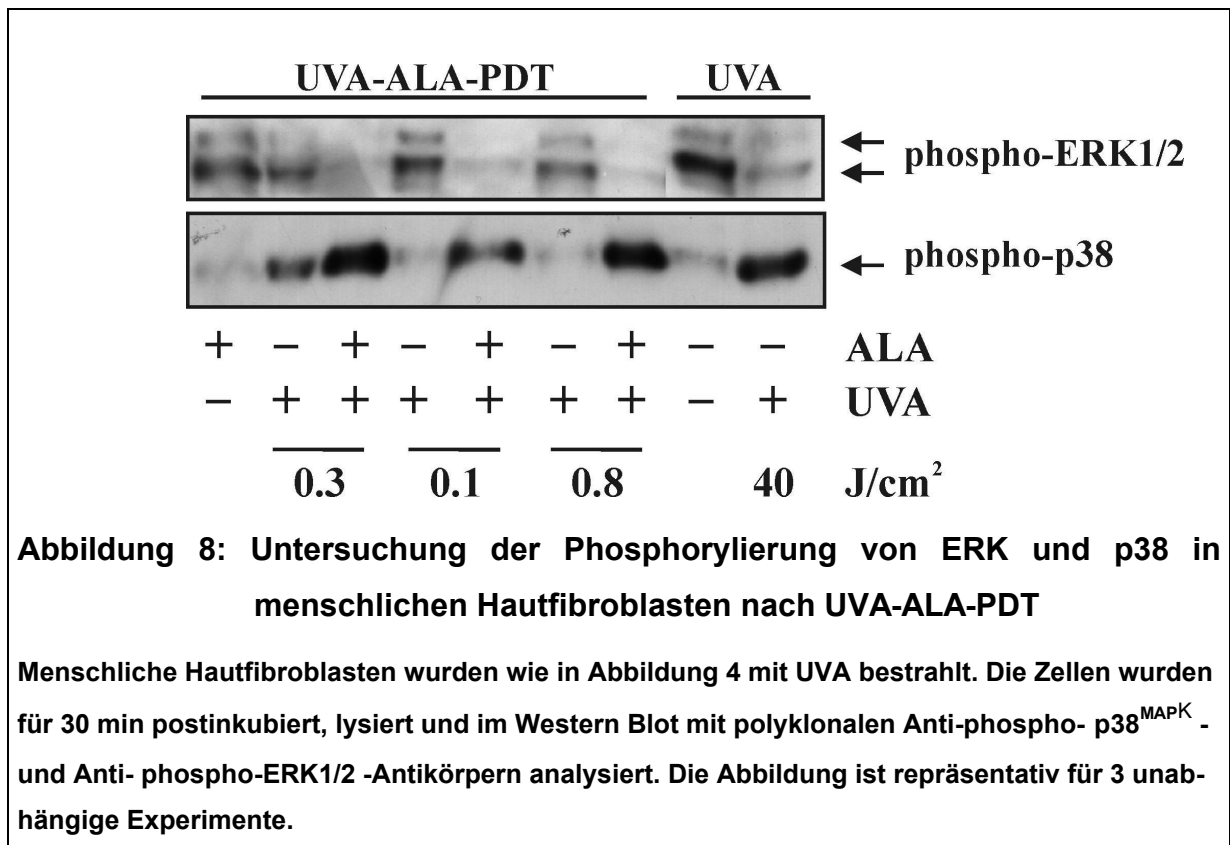
**Abbildung 7: Phosphorylierung von p38<sup>MAPK</sup> in ALA-behandelten Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit UVA, Grün- oder Rotlicht.**

Menschliche Hautfibroblasten wurden wie in Abbildung 4 mit UVA (A), Grün- (B) oder Rotlicht (C) bestrahlt. Die Zellen wurden für 30 min postinkubiert, lysiert und im Western Blot mit polyklonalen Anti-phospho-p38<sup>MAPK</sup>- und Anti-p38<sup>MAPK</sup>-Antikörpern analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Während eine Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> durch UVA und Singulettstauerstoff für Hautfibroblasten beschrieben wurde, war eine Aktivierung von ERK 1/2 unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar (Klotz *et al.*, 1999). Auch UVA-ALA-PDT verursacht p38<sup>MAPK</sup>-Aktivierung (Abbildung 7) und führt ebenfalls zu keiner



Aktivierung von ERK1,2. Interessanterweise jedoch wurden ERK 1/2 durch UVA-ALA-PDT nicht nur nicht aktiviert, vielmehr kam es durch Bestrahlung zu einer Verringerung des Ausmaßes an ERK-Phosphorylierung (Abbildung 8). Dieser Effekt ist nicht auf Toxizität oder unspezifische Hemmung von Signalprozessen zurückzuführen, da parallel zur Abnahme der ERK-Aktivität die Phosphorylierung von p38<sup>MAPK</sup> stark anstieg (Abbildung 8). Schon niedrige UVA-Dosen (0,1 J/cm<sup>2</sup>) riefen diesen Effekt hervor, wenn die Zellen mit 1 mM ALA präinkubiert worden waren, der Effekt trat aber auch bei höheren Dosen (40 J/cm<sup>2</sup>) ohne Präinkubation mit ALA ein.



## 4 Diskussion

Bei der hier untersuchten Variante der photodynamischen Behandlung, bei der (1) eine Vorstufe des Photosensibilisators verabreicht wird und (2) Photosensibilisator und Strahlungswellenlänge aufeinander abgestimmt sind, ist die Wirkung um ein Vielfaches höher als bei den herkömmlich klinisch eingesetzten Kombinationen.

Im Vergleich zur ALA-PDT mit Rotlicht erwies sich UVA-ALA-PDT als stärker zytotoxisch für kultivierte menschliche Hautfibroblasten. Die toxische Wirkung war mehr als 40-mal stärker verglichen mit Rotlicht und 10-mal stärker als bei Verwendung von Grünlicht. Da UVA zu einem beträchtlichen Anteil bis in die Dermis vordringen kann (Bruls *et al.*, 1984), bietet sich der Einsatz von UVA bei der photodynamischen Therapie vor allem bei oberflächlichen, pathologischen Prozessen an. Ein weiterer Vorteil des Gebrauchs von UVA bei der ALA-PDT wären die kurze Bestrahlungsdauer und damit weniger Behandlungsschmerz durch Erhitzen des bestrahlten Areals.

Experimente mit  $D_2O$ , das die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff verlängert, und  $NaN_3$  sowie Imidazol als  $^1O_2$ -abfangenden Substanzen zeigten, dass auch bei der UVA-ALA-PDT Singulett-Sauerstoff ein maßgeblicher Mediator der toxischen Wirkung ist. Unklar ist allerdings, auf welche Weise Singulett-Sauerstoff zelltoxische Wirkung entfalten kann. Eine Möglichkeit ist die direkte Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden. Alternativ vermag Singulett-Sauerstoff modulierend auf Signaltransduktionsprozesse Einfluß zu nehmen, die das Überleben von Zellen regulieren. Singulett-Sauerstoff induziert die Aktivität von Stresskinasen (Klotz *et al.*, 1999, 2000). Zu solch einer Aktivierung kommt es auch durch ALA-PDT mit Rotlicht (Klotz *et al.*, 1998). Damit übereinstimmend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass UVA-Dosen von  $0,1 \text{ J/cm}^2$  zu einer deutlichen Phosphorylierung und damit Aktivierung von  $p38^{MAPK}$  führen. Bei Anwendung von Grün- bzw. Rotlicht waren dafür bedeutend höhere Dosen (3 bzw.  $10 \text{ J/cm}^2$ ) notwendig. Interessanterweise hatte UVA-ALA-PDT auf die Aktivierung von ERK1/2 einen gegenteiligen Effekt. Es kam zu einer deutlichen Abnahme der Basalaktivierung. Im allgemeinen wird die Aktivierung von ERK1/2 als proliferativer, protektiver, antiapoptotischer Faktor angesehen, der für das Überleben der Zelle förderlich ist (Whitmarsh und Davis, 2000). Bei der photodynamischen Therapie un-

ter Verwendung von Photofrin, die ebenfalls mit der Entstehung von Singulett-Sauerstoff und anderen ROS einhergeht (Pervaiz, 2001; 2002), konnte gezeigt werden, dass die toxische Wirkung der Behandlung durch Aktivierung von ERK1/2 gemindert wird und durch Hemmung des Signalweges verstärkt wird (Tong *et al.*, 2002).

Die Bedeutung einer Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> durch UVA-ALA-PDT ist nicht abschließend geklärt. p38<sup>MAPK</sup> wird allerdings zusammen mit JNK eher eine antiproliferative, proapoptische Wirkung zugesprochen (Herrmann *et al.*, 1996; Kyriakis und Avruch, 1996; Tibbles und Woodgett, 1999). Singulett-Sauerstoff, mittels Bestrahlung von Rose Bengal generiert, kann über p38<sup>MAPK</sup>-Aktivierung zur Apoptose führen (Zhuang *et al.*, 2000), wie auch einige Varianten der photodynamischen Therapie. In menschlichen Hautfibroblasten induziert Singulett-Sauerstoff eine Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup>, wogegen die Aktivität von ERK1/2 vermindert wird. Es kommt dabei auch zu einer Verminderung der Aktivität der ebenfalls antiapoptotisch wirkenden Proteinkinase B (PKB). Dabei sind wahrscheinlich Ceramide, die unter Einfluß von Singulett-Sauerstoff entstehen (Grether-Beck *et al.*, 2000), ein ursächlicher Faktor für die Abschwächung der Aktivierung von ERK1/2 und PKB (Schieke *et al.*, eingereicht).

Auch in der vorliegenden Arbeit verliefen die Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> und die Zunahme der vermittelten Toxizität parallel zueinander, jedoch gegenläufig zur Aktivität von ERK1/2. Es ist denkbar, dass die alleinige Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> nicht ausreicht, um das Absterben der behandelten Zellen zu bewirken, wie erste Experimente mit einem p38<sup>MAPK</sup>-Inhibitor zeigten. Bei Bestrahlung der Zellen in Gegenwart des spezifischen p38<sup>MAPK</sup>-Inhibitors PD169316 (2 µM) wurde keine Erhöhung der Vitalität gefunden, obgleich die Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> vermindert wurde (Buchczyk *et al.*, unveröffentlicht). Zwar ist Singulett-Sauerstoff in der Lage, Apoptose zu induzieren (Zhuang *et al.*, 2000), doch obwohl ein verstärktes Auftreten von Aussackungen in der Plasmemembran, ein morphologisches Merkmal der Apoptose, nach UVA-ALA-PDT beobachtet werden konnte, wurde in ersten Experimenten, bei denen die Zellen in Gegenwart der Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK und Boc-D-FMK (jeweils 100 µM) behandelt wurden, keine Verringerung der zytotoxischen Wirkung von UVA-ALA-PDT beobachtet.

Während des apoptotischen Zellunterganges kommt es über die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran durch Bildung eines Megaporenkomplexes zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Bossy-

Wetzel und Green, 1999; Kroemer *et al.*, 1997). Die Bildung dieses Megaporenkomplexes erfolgt unter anderem durch Proteine der Bcl-2-Familie (Ferri und Kroemer, 2001; Kaufmann und Hengartner, 2001; Strasser *et al.*, 2000). Bestrahlung mit UVA führt zur Generierung von Singulett-Sauerstoff, der ebenfalls den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials verursachen kann. Diese Wirkung wird durch spezielle Anteile des Megaporenkomplexes vermittelt, die durch Glutathion und Cyclosporin A inhibiert werden können (Godar, 1999b). Cyclosporin A verhindert dabei den Ausstrom des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF, Marchetti *et al.*, 1996; Marchetti *et al.*, 1997), hat aber keinen Einfluß auf den Ausstrom von Cytochrom c (Kroemer *et al.*, 1997). Freigewordenes AIF initiiert die Umsetzung von Procaspase 3 zu Caspase 3 und führt zum apoptotischen Zelltod (Kroemer *et al.*, 1997; Marzo *et al.*, 1998). Auch andere reaktive Sauerstoffspezies können eine ähnliche Wirkung entfalten. Beispielsweise können durch Vitamin K<sub>3</sub> generierte Superoxidradikalanionen wie auch Singulett-Sauerstoff Apoptose induzieren; dieser Vorgang wird allerdings nicht durch Cyclosporin A inhibiert (Godar, 1999b). Der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR, Krueger, 1995) ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran, das ebenfalls an der Bildung Cyclosporin A-sensitiven Anteils des Megaporenkomplexes beteiligt (Papadopoulos *et al.*, 1999; Ravagnan *et al.*, 1999; Tanimoto *et al.*, 1999). Neben einer relativ hohen Affinität für Diazepam (Braestrup und Squires, 1977) bindet der PBR unter anderem auch Protoporphyrin IX (Fonia *et al.*, 1996). Die vermehrte Generierung von Singulett-Sauerstoff in unmittelbarer Nähe der mitochondrialen Membran und von Teilstrukturen des Megaporenkomplexes könnte die Stabilität des mitochondrialen Membranpotentials beeinflussen. Eine Öffnung des Megaporenkomplexes könnte damit unabhängig von übergeordneten Signaltransduktionsprozessen und Caspaseaktivierung erfolgen (Fonia *et al.*, 1996) und zum Zelluntergang führen. Tatsächlich wirkten die PBR-Liganden PK11195 und Ro5-4864 protektiv gegen ALA-vermittelte Phototoxizität (Ratcliffe und Matthews, 1995), wahrscheinlich aufgrund antagonistischer Wirkung auf den Protoporphyrin IX-Transport über die mitochondriale Membran (Mesenholler und Matthews, 2000). Die Bedeutung der PBR-Affinität für die PDT ist allerdings nicht abschließend geklärt und wird gegenwärtig noch diskutiert (Kessel *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 1998).

Auf welchem Wege die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Toxizität der UVA-ALA-PDT zum Zelluntergang führt und ob es sich dabei um apoptotische

---

oder nekrotische Prozesse handelt, werden weitere Untersuchungen zeigen; es ist aber festzustellen, dass der Wirkungsgrad dieser Behandlung rund 100fach höher als der von ALA-PDT mit Rotlicht liegt.

Zusammen genommen ist die Verwendung von UVA bei der Bestrahlung von mit ALA behandelten Zellen der Verwendung von sichtbarem Licht hinsichtlich der zelltoxischen Wirkung überlegen. Eine vergleichbare Wirkung im Hinblick auf Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> und Toxizität wird bei ALA-PDT mit nur 10 bzw. 2 % der verwendeten Strahlendosis erreicht, wenn UVA statt Grün- bzw. Rotlicht verwendet wird. Die beobachtete Toxizität, bei der Singulett-Sauerstoff eine entscheidende Rolle spielt, wird nicht allein über die Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> verursacht, und apoptotische Prozesse sind wahrscheinlich nicht involviert. Weitere Untersuchungen an Hautpräparaten werden zeigen, ob die Verwendung von UVA bei der ALA-PDT für die Behandlung von oberflächlich gelegenen Läsionen der Verwendung von Licht längerer Wellenlänge aufgrund des höheren Wirkungsgrades überlegen ist.

## 5 Zusammenfassung

Photodynamische Therapie (PDT) beruht auf der durch Bestrahlung von Photosensibilisatoren hervorgerufenen Bildung zytotoxischer Spezies und wird klinisch zur Behandlung von Hauttumoren eingesetzt. Eine Möglichkeit, die Konzentration des verwendeten Photosensibilisators im Zielgewebe zu erhöhen, ist es, die zelluläre Synthese der betreffenden Substanz zu stimulieren. Die Applikation von 5-Aminolävulinat (ALA), des Produktes des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes in der Biosynthese der Porphyrine, führt zu einer Erhöhung der endogenen Konzentration an Porphyrinen und zur erhöhten Lichtsensitivität des behandelten Gewebes. Bei Bestrahlung werden reaktive Sauerstoffspezies, vornehmlich Singulett-Sauerstoff, generiert, die zur Zerstörung der Zelle führen. ALA-PDT mit Rotlicht (550-750 nm) induziert die Aktivierung von Stresskinasen wie p38<sup>MAPK</sup> und JNK, die auch durch UVA (320-400 nm) aktiviert werden, was durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Effizienz einer Kombination beider Behandlungsstrategien, ALA-PDT und UVA-Bestrahlung, hinsichtlich induzierbarer Zytotoxizität und Modulation von Signaltransduktionskaskaden in menschlichen Hautfibroblasten untersucht.

UVA-ALA-PDT war 40-mal toxischer ( $LD_{50} = 0.35 \text{ J/cm}^2$ ) als die klinisch üblicherweise angewandte ALA-PDT mit Rotlicht ( $LD_{50} = 13.5 \text{ J/cm}^2$ ) und 10-mal toxischer als ALA-PDT mit Grünlicht ( $LD_{50} = 4.5 \text{ J/cm}^2$ ). Die Toxizität war abhängig von der Bildung von Singulett-Sauerstoff, wie mit Hilfe von Modulatoren der Singulett-Sauerstofflebensdauer gezeigt werden konnte. Damit übereinstimmend wurde p38<sup>MAPK</sup> nach UVA-ALA-PDT bei Dosen aktiviert, die zwei Größenordnungen unter denen lagen, die für eine vergleichbare Aktivierung von p38<sup>MAPK</sup> durch UVA alleine notwendig waren. Zugleich wurde die Basalaktivität der die Proliferation fördernden Kinasen ERK1/2 vermindert.

Diese Ergebnisse aus Experimenten in kultivierten Hautfibroblasten sprechen dafür, dass UVA-ALA-PDT einen interessanten, neuen Ansatz in der Verwendung von ALA als Photosensibilisator darstellt, der effektiver und, aufgrund der kürzeren Behandlungsdauer, weniger schmerzhaft als die herkömmlich klinisch verwendeten Verfahren sein könnte.

---

## 6 Literatur

- Abeck, D., Schmidt, T., Fesq, H., Strom, K., Mempel, M., Brockow, K., and Ring, J. (2000). Long-term efficacy of medium-dose UVA1 phototherapy in atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* *42*, 254-257.
- Battle, A. M. (1993). Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B* *20*, 5-22.
- Bethea, D., Fullmer, B., Syed, S., Seltzer, G., Tiano, J., Rischko, C., Gillespie, L., Brown, D., and Gasparro, F. P. (1999). Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J. Dermatol. Sci.* *19*, 78-88.
- Bonnett, R. (1995). Photosensitizers of the porphyrin and phtalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* *21*, 19-33.
- Bossy-Wetzel, E., and Green, D. R. (1999). Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J. Biol. Chem.* *274*, 17484-17490.
- Boyne, A. F., and Ellman, G. L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal. Biochem.* *46*, 639-653.
- Braestrup, C., and Squires, R. F. (1977). Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *74*, 3805-3809.
- Briviba, K., Klotz, L. O., and Sies, H. (1997). Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol. Chem.* *378*, 1259-1265.
- Bruls, W. A., Slaper, H., van der Leun, J. C., and Berrens, L. (1984). Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultra-violet and visible wavelengths. *Photochem. Photobiol.* *40*, 485-494.

- 
- Buchczyk, D. P., Klotz, L. O., Lang, K., Fritsch, C., and Sies, H. (2001). High efficiency of 5-aminolevulinic acid-photodynamic treatment using UVA irradiation. *Carcinogenesis* 22, 879-883.
- Calzavara-Pinton, P. G. (1995). Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J. Photochem. Photobiol. B* 29, 53-57.
- Chan, W. H., Yu, J. S., and Yang, S. D. (2000). Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem. J.* 351, 221-232.
- Djavaheri-Mergny, M., and Dubertret, L. (2001). UV-A-induced AP-1 activation requires the Raf/ERK pathway in human NCTC 2544 keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 10, 204-210.
- Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, E255-E263.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 247-254.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fonia, O., Weizman, R., Coleman, R., Kaganovskaya, E., and Gavish, M. (1996). PK 11195 aggravates 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-induced hepatic porphyria in rats. *Hepatology* 24, 697-701.
- Fritsch, C., Stege, H., Saalman, G., Goerz, G., Ruzicka, T., and Krutmann, J. (1997). Green light is effective and less painful than red light in photodynamic therapy of facial solar keratoses. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 13, 181-185.



- 
- Fritsch, C., Goerz, G., and Ruzicka T. (1998). Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.* 134, 207-214.
- Fukuda, H., Paredes, S., and Batlle, A. M. (1992). Tumour-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp Biochem. Physiol B* 102, 433-436.
- Gasparro, F. P., Liao, B., Foley, P. J., Wang, X. M., and McNiff, J. M. (1998). Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 105-112.
- Godar, D. E. (1999a). Light and death: photons and apoptosis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 4, 17-23.
- Godar, D. E. (1999b). UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J. Invest Dermatol.* 112, 3-12.
- Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Johnson, J. P., Piette, J., and Krutmann, J. (2000). Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. *EMBO J.* 19, 5793-5800.
- Hazzalin, C. A., and Mahadevan, L. C., (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 30-40.
- Hongcharu, W., Taylor, C. R., Chang, Y., Aghassi, D., Suthamjariya, K., and Anderson, R. R. (2000). Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *J. Invest Dermatol.* 115, 183-192.
- Karrer, S., Baumler, W., Abels, C., Hohenleutner, U., Landthaler, M., and Szeimies, R. M. (1999). Long-pulse dye laser for photodynamic therapy: investigations in vitro and in vivo. *Lasers Surg. Med.* 25, 51-59.
- Kaufmann, S. H., and Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11, 526-534.

- 
- Kennedy, J. C., Pottier, R. H., and Pross, D. C. (1990). Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B* 6, 143-148.
- Kessel, D., Antolovich, M., and Smith, K. M. (2001). The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 74, 346-349.
- Klotz, L. O. (2002). Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol. Chem.* 383, 443-456.
- Klotz, L. O., Briviba, K., and Sies, H. (1997). Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 26, 289-291.
- Klotz, L. O., Briviba, K., and Sies, H. (2000). Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A. *Methods Enzymol.* 319, 130-143.
- Klotz, L. O., Fritsch, C., Briviba, K., Tsacmacidis, N., Schliess, F., and Sies, H. (1999). Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Res.* 58, 4297-4300.
- Klotz, L. O., Holbrook, N. J., and Sies, H. (2001). UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Curr. Probl. Dermatol.* 29, 95-113.
- Klotz, L. O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. M., and Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J. Biochem.* 260, 917-922.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18, 44-51.
- Krueger, K. E. (1995). Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 453-470.
- Krutmann, J. (1996). [Phototherapy of neurodermitis disseminata atopica]. *Hautarzt* 47, 719-722.

- 
- Krutmann, J. (1997). Human photoimmunology. *Photochem. Photobiol.* *65*, 607-608.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* *271*, 24313-24316.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lauharanta, J. (1997). Photochemotherapy. *Clin. Dermatol.* *15*, 769-780.
- Levitz, S. M., and Diamond, R. D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J. Infect. Dis.* *152*, 938-945.
- Loh, C. S., Vernon, D., MacRobert, A. J., Bedwell, J., Bown, S. G., and Brown, S. B. (1993). Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J. Photochem. Photobiol. B* *20*, 47-54.
- Marchetti, P., Decaudin, D., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S. A., and Kroemer, G. (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur. J. Immunol.* *27*, 289-296.
- Marchetti, P., Hirsch, T., Zamzami, N., Castedo, M., Decaudin, D., Susin, S. A., Masse, B., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* *157*, 4830-4836.
- Martindale, J. L., and Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol* *192*, 1-15.
- Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. (1998). The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed. Pharmacother.* *52*, 248-251.
- McGrath, H., Jr. (1997). Prospects for UV-A1 therapy as a treatment modality in cutaneous and systemic LE. *Lupus* *6*, 209-217.

- 
- Mesenholler, M., and Matthews, E. K. (2000). A key role for the mitochondrial benzodiazepine receptor in cellular photosensitisation with delta-aminolaevulinic acid. *Eur. J. Pharmacol.* *406*, 171-180.
- Nestle, F. O., Haffner, A. C., Schmid, M. H., Dummer, R., and Burg, G. (1997). [Current therapy concepts in cutaneous T-cell lymphomas]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* *127*, 311-320.
- Papadopoulos, V., Dharmarajan, A. M., Li, H., Culty, M., Lemay, M., and Sridaran, R. (1999). Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression. Correlation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem. Pharmacol.* *58*, 1389-1393.
- Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K. E., and Nesland, J. M. (1997). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* *79*, 2282-2308.
- Pervaiz, S. (2001). Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *FASEB J.* *15*, 612-617.
- Pervaiz, S. (2002). Anti-cancer drugs of today and tomorrow: are we close to making the turn from treating to curing cancer? *Curr. Pharm. Des* *8*, 1723-1734.
- Piomelli, S. (1973). A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. *J. Lab Clin. Med.* *81*, 932-940.
- Ratcliffe, S. L., and Matthews, E. K. (1995). Modification of the photodynamic action of delta-aminolaevulinic acid (ALA) on rat pancreatoma cells by mitochondrial benzodiazepine receptor ligands. *Br. J. Cancer* *71*, 300-305.
- Ravagnan, L., Marzo, I., Costantini, P., Susin, S. A., Zamzami, N., Petit, P. X., Hirsch, F., Goubern, M., Poupon, M. F., Miccoli, L., Xie, Z., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1999). Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene* *18*, 2537-2546.

- 
- Ryter, S. W., and Tyrrell, R. M. (1998). Singlet molecular oxygen ( $(^1O_2)$ ): a possible effector for eukaryotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1520-1534.
- Sassa, S. (2002). The porphyrias. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18, 65-67.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Briviba, K., and Sies, H. (1993). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 331, 304-306.
- Schieke, S. M., Buchczyk, D. P., Timmer, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Sies, H., Holbrook, N. J., and Klotz, L-O. (2003). Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic. Biol. Med.* eingereicht.
- Schliess F., Schreiber, R., and Haussinger, D. (1995). Activation of extracellular signal-regulated kinases Erk-1 and Erk-2 by cell swelling in H4IIE hepatoma cells. *Biochem. J.* 309, 13-17.
- Schuitmaker, J. J., Baas, P., van Leengoed, H. L., van der Meulen, F. W., Star, W. M., and van Zandwijk, N. (1996). Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B* 34, 3-12.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217-245.
- Tanimoto, Y., Onishi, Y., Sato, Y., and Kizaki, H. (1999). Benzodiazepine receptor agonists modulate thymocyte apoptosis through reduction of the mitochondrial transmembrane potential. *Jpn. J. Pharmacol.* 79, 177-183.
- Tibbles, L. A., and Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 1230-1254.
- Tong, Z., Singh, G., and Rainbow, A. J. (2002). Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 62, 5528-5535.

- 
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 4350-4354.
- Tyrrell, R. M., and Pidoux, M. (1989). Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations. *Photochem. Photobiol.* *49*, 407-412.
- Van Hillegersberg, R., Van den Berg, J. W., Kort, W. J., Terpstra, O. T., and Wilson, J. H. (1992). Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology* *103*, 647-651.
- Verma, A., Facchina, S. L., Hirsch, D. J., Song, S. Y., Dillahey, L. F., Williams, J. R., and Snyder, S. H. (1998). Photodynamic tumor therapy: mitochondrial benzodiazepine receptors as a therapeutic target. *Mol. Med.* *4*, 40-45.
- Vile, G. F., and Tyrrell, R. M. (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J. Biol. Chem.* *268*, 14678-14681.
- Walker, F., Kato, A., Gonez, L. J., Hibbs, M. L., Pouliot, N., Levitzki, A., and Burgess, A. W. (1998). Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation. *Mol. Cell Biol.* *18*, 7192-7204.
- Weishaupt, K. R., Gomer, C. J., and Dougherty, T. J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* *36*, 2326-2329.
- Whitaker, J. R., and Granum, P. E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* *109*, 156-159.
- Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (2000). A central control for cell growth. *Nature* *403*, 255-256.

---

Zhuang, S., Demirs, J. T., and Kochevar, I. E. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 275, 25939-25948.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

ddH<sub>2</sub>O: Reinstwasser

DMSO: Dimethylsulfoxid

DTPA: Diethylentriaminpentaacetat

DTT: Dithiothreit

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathiondisulfid

GST: Glutathion-S-Transferase

HBSS: Hank's buffered salt solution

kDa: Kilodalton

PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

RT: Raumtemperatur (20-25°C)

Upm: Umdrehungen pro Minute



## 7.2 Danksagung

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Lars-Oliver Klotz für die Bereitstellung des Themas, die aufmerksame Betreuung dieser Arbeit, seinen Rat sowie seine freundschaftliche Unterstützung in wissenschaftlichen und sonstigen Belangen.

Priv.-Doz. Dr. Axel Gödecke danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies danke ich herzlich für seinen Rat und seine Förderung.

Dr. Niloofar Ale-Agha, Dr. Olivier Aust, Dr. Heiko Possel und Dr. Peet Schroeder danke ich für Hilfe, Freundschaft und eine Menge Spass.

Priv.-Doz. Dr. Clemens Fritsch danke ich für sehr gute wissenschaftliche Zusammenarbeit. Dr. Gavin Arteel, Priv.-Doz. Dr. Karlis Briviba, Prof. Dr. Willi Stahl, Prof. Dr. Tankred Schewe danke ich für Rat und Diskussionsbereitschaft. Ferner möchte ich vom ganzem Herzen Kotb Aly, Dr. Annika Assmann, Juliane Beier, Alejandro Bencancor, Andrea Borchardt, Brigitte Cremer, P. Arne Gerber, Peter Graf, Sonja Gründel, Dr. Claudio Jösch, Heide Krahl, Dr. Michael Lörper, André Mahns, Ira Melchheier, Claudia von Montfort, Dr. Elena Ostrakhovitch, Gisela Pansegrau, Christian Sadiq, Elisabeth Sauerbier, Dr. Stefan Schieke, Marlies Scholtes, Henrik Traulsen und Heinz Venghaus dafür danken, dass sie das Institut zu einem Ort machten, an dem ich gerne war. Ich danke darüber hinaus allen noch nicht erwähnten, derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie I für kollegiale Hilfsbereitschaft sowie hervorragende Arbeitsatmosphäre. Für Hilfe bei der Endredaktion dieser Arbeit danke ich Dr. Antje Flintrop und Uwe Sonnat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Barbara und Siegmund Buchczyk, Beate und Georg Kruszyna sowie Dr. Antje Flintrop für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und für noch sehr viel mehr.

### **Eidstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den

### 7.3 Lebenslauf

Name: Darius Peter Buchczyk

Datum und Ort der Geburt: 23. Jan. 1970, Ruda, Polen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig

Ausbildung:

- 1990 Abitur, Fichte-Gymnasium Krefeld
- 1994 Vordiplom Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1997 Diplomprüfung Biologie, Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchung der a-Faktor-Sekretion in *Saccharomyces cerevisiae*“ am Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1998 Physikum Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1999 Erstes Staatsexamen Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 2002 Zweites Staatsexamen Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 2002 Promotion zum Dr. rer. nat. mit dem Thema „Identifikation und Untersuchung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als susceptibles Zielprotein für Peroxynitrit“ am Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 2003 Drittes Staatsexamen Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Prüfung im Klinikum Krefeld

Beschäftigungen:

- 1990-1991 Wehrdienst, Budel (NL) und Cochem

- 1997-1998 Diplomarbeit in Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1998-2000 Stipendiat des Graduiertenkollegs „Pathologische Prozesse des Nervensystems“ am Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1998-2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Assistent für Seminare und Praktika zur Einführung in die Biochemie für Medizinstudenten
- 2002-2003 Praktisches Jahr, Klinikum, Krefeld
- 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Experimentelle Hepatologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

## 7.4 Publikationen und Präsentationen

### 7.4.1 Artikel

1. Buchczyk, DP., Briviba, K., Hartl, FU. and Sies, H. (2000). Responses to peroxynitrite in yeast: Glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination. *Biol. Chem*, 381: 121-6.
2. Buchczyk, DP., Klotz, L-O., Lang, K., Fritsch, C. and Sies, H. (2001). High Efficiency of 5-Aminolevulinate-Photodynamic Treatment Using UVA-Irradiation. *Carcinogenesis*, 22(6):879-83.
3. Schroeder, P., Klotz, L-O., Buchczyk, DP., Sadik, CD., Schewe, T. and Sies, H. (2001). Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 285(3):782-7.
4. Klotz, L-O., Buchczyk, DP. and Sies, H. (2001). MAP Kinase Activation and Environmental Stress. in: *Micronutrients and Health: Molecular Mechanisms* 184-193. Naresnam, K. and Packer, L. (eds.).

5. Arteel, GE., Klotz, L-O., Buchczyk, DP. and Sies, H. (2002). Selenoprotein P. Methods in Enzymology 347: 121-125.
6. Klotz, L-O., Patak, P., Ale-Agha, N., Buchczyk, DP., Abdelmohsen, K., Gerber, PA., von Montfort, C. and Sies, H. (2002). 2-Methyl-1,4-naphtoquinone, vitamin K (3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. Cancer Res. 62(17): 4922-8.
7. Buchczyk, D.P.; Grune ,T.; Sies ,H.; Klotz, L.O. (2003) Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxy-nitrite: early recognition by 20S proteasome. Biol. Chem. 384: 237-41.
8. Klotz, L.O.; Kröncke, K.D.; Buchczyk, D.P.; Sies, H. (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. J. Nutr. 133: 1448-51.
9. Schieke, S. M., Buchczyk, D. P., Timmer, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Sies, H., Holbrook, N. J., and Klotz, L-O. (2003). Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. Free Radic. Biol. Med. submitted.
10. Traulsen, H., Steinbrenner, H., Buchczyk, D. P., Klotz, L-O., and Sies, H. (2003) Selenoprotein P protects low-density lipoprotein (LDL) against oxidation. In press

#### **7.4.2 Poster-Präsentationen**

1. "Peroxynitrite-mediated nitration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enhanced ubiquitination and chaperone (Hsp70) expression"; Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM); Hamburg, September, 5-8, 1999.

2. "Increased efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic therapy with irradiation in the UVA region"; Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM); München, October, 10-13, 2000.
3. "Loss of gap junctional communication by peroxynitrite in liver epithelial cells is not mediated by phosphorylation of connexins"; Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM); München, October, 10-13, 2000.
4. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase is a Sensitive Target for Peroxynitrite". 3rd International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, USA, Mai 27-31, 2001.

#### **7.4.3 Vorträge (Konferenzen/Symposia)**

1. „Rolle von Chaperonen für den Turnover von peroxynitrit-modifizierten Proteinen“ Jahresarbeitstreffen des Graduiertenkollegs „Pathologische Prozesse des Nervensystems“, Strassbourg, Frankreich, August 1998.
2. „Protein-Nitrierung durch Peroxynitrit in *Saccharomyces cerevisiae*“. NO-Forum, Erlangen, April 24, 1999.
3. "Responses to peroxynitrite in yeast and mammalian cells". Mini-Symposium on Micronutrient Function in Anti-Oxidant Systems (The Rank Prize Funds), Grasmere, UK, November 07, 2000.
4. "Binding of selenoprotein P to endothelial cells". 1 Kolloquium DFG-Schwerpunktprogramm 1087 Selenoproteine, Würzburg, February 17, 2001.
5. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase is a Sensitive Target for Peroxynitrite". 3rd International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, USA, Mai 27-31, 2001.