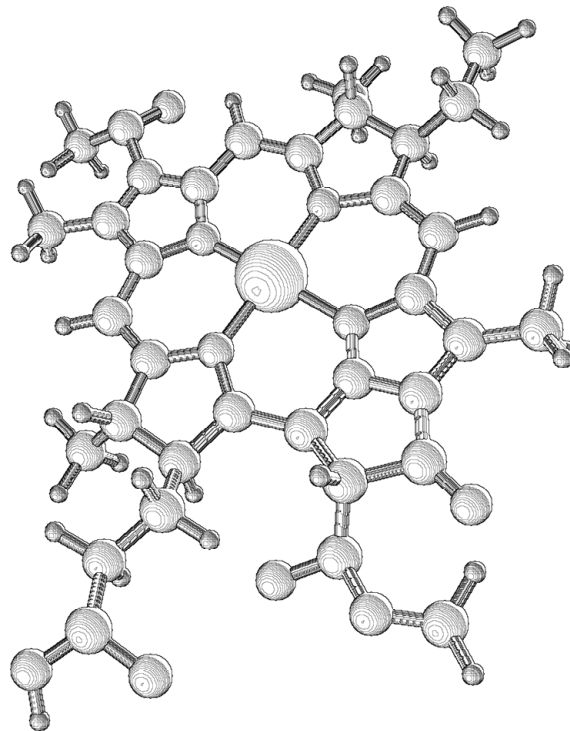


# **Bakteriochlorophyll-Derivate mit Relevanz für die photodynamische Tumortherapie**

Lokalisation, Stabilität und Photobiochemie  
in humanem Blutplasma



**Jörg Thomas Dandler**

**2008**







**Bakteriochlorophyll-Derivate mit Relevanz  
für die photodynamische Tumortherapie**

Lokalisation, Stabilität und Photobiochemie  
in humanem Blutplasma

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Jörg Thomas Dandler  
aus Augsburg  
25. September 2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Hugo Scheer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lutz Eichacker

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl III des Departments Biologie I (Bereich Botanik) der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hugo Scheer angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hugo Scheer, für die Betreuung dieser Arbeit. Seine vielfältige Unterstützung und die mir gewährte große Forschungsfreiheit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei:

Prof. Dr. Avigdor Scherz (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel), sowie den Firmen Negma-Lerads (Magny-Les-Hameaux, Frankreich) und Steba Biotech (Toussus-Le-Noble, Frankreich) für die Überlassung großer Mengen der Pigmente WST09 und WST11;

Brigitte Wilhelm für die mühevollen Synthese und Aufreinigung der meisten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pigmente;

Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger für die freundliche Zurverfügungstellung seiner umfangreichen Tetrapyrrol-Sammlung;

Dr. Ulrike Oster für ihre wertvollen Ratschläge und ihre große Hilfsbereitschaft vor allem bei Fragen die HPLC-Analytik betreffend;

Dr. Bernd Müller für seine hilfreichen massenspektroskopischen Analysen einiger Pigmente unbekannter Natur;

Prof. Dr. Gerhard Wanner für die Messung von Röntgenfluoreszenz-Spektren (EDX-Analytik) diverser Proben;

Dr. Alexander Pazur für Rat und Tat bei allen auftretenden Problemen mit Computern, Messgeräten, u. a. Fallen des digitalen Zeitalters;

Mikael Zoryan für die Hilfe bei der Bedienung und Wartung der für die Sauerstoffmessungen verwendeten Clark-Elektrode;

und denjenigen, die mir durch die Bereitstellung von Labor-Equipment das Forscherleben sehr erleichtert haben: Prof. Dr. Reinhold Herrmann (UZ-Rotoren, Tube Sealer), Prof. Dr. Lutz Eichacker (Clark-Elektrode, Refraktometer, PAR-Lichtmessgerät), und Dr. Cordelia Bolle (NIR-Lichtmessgerät).

Schließlich möchte ich mich vielmals bei allen Mitarbeitern und Gästen des Arbeitskreises für das äußerst angenehme Arbeitsklima im Labor, sowie ihre Unterstützung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an die Hans-Fischer-Gesellschaft e. V. (München) für die langjährige finanzielle Förderung dieser Arbeit.





Meinen Eltern gewidmet



Die Wissenschaft sucht nach einem Perpetuum mobile.

Sie hat es gefunden: Sie ist es selbst.

Victor Hugo, 1863



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Krebs</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Konventionelle Krebstherapien .....	3
1.1.2	Photodynamische Therapie .....	4
1.1.2.1	Geschichte der Phototherapien .....	5
1.1.2.2	Wirkungsweise der PDT .....	8
<b>1.2</b>	<b>Photosensibilisatoren</b> .....	<b>11</b>
1.2.1	Hämatoporphyrin-Derivat .....	13
1.2.2	Photosensibilisatoren der 2. und 3. Generation .....	14
1.2.3	Chlorophylle .....	17
1.2.3.1	Tetrapyrrol-Biosynthese .....	18
1.2.3.2	Absorptionseigenschaften von Tetrapyrrolen .....	19
1.2.3.3	Photobleichung von Tetrapyrrolen .....	22
<b>1.3</b>	<b>Lipoproteine des Blutplasmas</b> .....	<b>24</b>
1.3.1	Struktur und Bestandteile der Plasmalipoproteine .....	24
1.3.2	Stoffwechsel der Plasmalipoproteine .....	27
1.3.2.1	Transport exogener Lipide zu den Geweben .....	28
1.3.2.2	Transport endogener Lipide zu den Geweben .....	28
1.3.2.3	Rücktransport von Cholesterin aus den Geweben .....	29
<b>1.4</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeines</b> .....	<b>31</b>
2.1.1	Geräte .....	31
2.1.2	Software .....	32
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	32
<b>2.2</b>	<b>Spektroskopische Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.2.1	Absorptionsspektroskopie .....	33
2.2.2	Fluoreszenzspektroskopie .....	34
2.2.3	Massenspektroskopie .....	34
2.2.4	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) .....	34
<b>2.3</b>	<b>Isolierung und Modifizierung der verwendeten Pigmente</b> .....	<b>35</b>
2.3.1	Standardreaktionsbedingungen .....	35
2.3.2	Standardaufreinigung .....	35
2.3.3	Isolierung der natürlichen Pigmente Chl <i>a</i> und BChl <i>a</i> .....	36
2.3.4	Herstellung von 3Ac-Chl <i>a</i> und 3Vi-BChl <i>a</i> .....	37
2.3.5	Enzymatische Herstellung von Chlid <i>a</i> und BChlid <i>a</i> .....	38

2.3.6	Herstellung zentralmetallfreier Derivate .....	39
2.3.7	Synthese transmetallierter Chlorine .....	40
2.3.8	Synthese transmetallierter Bakteriochlorine .....	41
2.3.9	Weitere verwendete Pigmente .....	42
<b>2.4</b>	<b>SDZ-Lipoprotein-Fraktionierung .....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Dichteerhöhung mittels Salzzusatz .....	45
2.4.2	Dialyse der Fraktionen .....	47
2.4.3	HDL <sub>2</sub> -HDL <sub>3</sub> -Subfraktionierung .....	47
2.4.4	Konzentrierung der Proben .....	47
<b>2.5</b>	<b>IGZ-Lipoprotein-Fraktionierung .....</b>	<b>48</b>
2.5.1	Refraktometrische Dichtebestimmung .....	48
2.5.2	Spektrophotometrische Gradienten-Erfassung .....	49
<b>2.6</b>	<b>Größenbestimmung von Proteinen / Proteinkomplexen .....</b>	<b>50</b>
2.6.1	Native Agarose/Agar/Albumin-Gelelektrophorese .....	50
2.6.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	51
2.6.3	Gelfiltration .....	52
<b>2.7</b>	<b>Analytik der Lipoprotein-Zusammensetzung .....</b>	<b>53</b>
2.7.1	Protein-Bestimmung .....	53
2.7.2	Phospholipid-Bestimmung .....	54
2.7.3	Cholesterin(ester)-Bestimmung .....	54
2.7.4	Triacylglycerol-Bestimmung .....	54
<b>2.8</b>	<b>Photooxidationsexperimente .....</b>	<b>55</b>
2.8.1	Pigment-Extraktion .....	58
2.8.2	HPLC-Analyse der Pigmente .....	58
2.8.3	Sauerstoff-Entzug .....	60
2.8.4	Sauerstoff-Begasung .....	60
2.8.5	Sauerstoff-Konzentrationsbestimmung (Clark-Elektrode) .....	61
<b>2.9</b>	<b>Analytik photoinduzierter Peroxide .....</b>	<b>61</b>
2.9.1	Quantifizierung von Hydroperoxiden (DCF-Test) .....	61
2.9.2	Quantifizierung von Endoperoxiden (TBARS-Test) .....	62
2.9.3	Färbung von Cholesterin-Hydroperoxiden (TMPD-Färbung) .....	62
2.9.4	Färbung reduzierter Cholesterin-Peroxide (CuSO <sub>4</sub> -Färbung) .....	63
2.9.5	Cholesterin-Esterase .....	64
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Verwendete Pigmente: Chemische Struktur und Absorption .....</b>	<b>65</b>
<b>3.2</b>	<b>Verteilung von Pd-BPheid a (WST09) in Blut .....</b>	<b>70</b>
<b>3.3</b>	<b>Pigmentverteilung in humanem Blutplasma I: SDZ-Fraktionierung .....</b>	<b>72</b>
3.3.1	Verteilung von Pd- und Zn-BPheid a auf die Lipoproteinfraktionen .....	73

3.3.2	Einfluss des Insertionssystems auf die Pigmentverteilung .....	76
3.3.3	Pigmentverteilung auf die HDL-Subfraktionen .....	78
<b>3.4</b>	<b>Pigmentverteilung in humanem Blutplasma II: IGZ-Fraktionierung .....</b>	<b>79</b>
3.4.1	Iodixanol-Gradienten: Fraktionen und Dichteverteilung .....	80
3.4.2	Iodixanol-Gradienten: Spektroskopische Erfassung .....	82
3.4.3	Pigmentverteilung auf die LDL-Subfraktionen .....	85
3.4.4	Vergleich mit der SDZ-Fraktionierung .....	86
3.4.5	Verteilung ausgewählter Tetrapyrrole auf die Lipoproteinfraktionen .....	87
3.4.6	Verteilung von 3Ac-Chl a und 3Vi-BChl a auf die Lipoproteinfraktionen .....	89
3.4.7	Verteilung polarer Tetrapyrrole auf die Lipoproteinfraktionen .....	91
3.4.8	Verteilung von 3 <sup>1</sup> OH-Pd-BPheid a auf die Lipoproteinfraktionen .....	92
3.4.9	Interlipoprotein-Transfer der Pigmente .....	97
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der Lipoproteinfraktionen .....</b>	<b>99</b>
3.5.1	Chemische Zusammensetzung .....	99
3.5.2	EDX-Analysen von Lipoproteinfraktionen .....	104
3.5.3	Stabilität der Pigmentbindung an Lipoproteine .....	108
3.5.4	Absorptionsrückgang mit zunehmendem Probenalter .....	110
3.5.5	Sensibilität der Q <sub>x</sub> -Absorptionsmaxima auf die Bindungssituation .....	111
3.5.6	Krasnovskii-Photoreduktionsprodukte .....	115
<b>3.6</b>	<b>Aggregationszustände von Pigmenten .....</b>	<b>120</b>
3.6.1	Detergens-induzierte Pigment-Deaggregation .....	120
3.6.2	Pigment-Aggregate in Blutplasma .....	122
3.6.3	Pigment-Aggregate in HDL .....	124
3.6.4	Pigment-Aggregate in FSM – Teil I: Pd-BPheid a (WST09) .....	125
3.6.5	Pigment-Aggregate in FSM – Teil II: WST11 .....	129
<b>3.7</b>	<b>Photoinduzierte Modifikation der Lipoprotein-Oberflächenladung .....</b>	<b>132</b>
<b>3.8</b>	<b>Photoinduzierte Quervernetzung von Proteinen .....</b>	<b>135</b>
<b>3.9</b>	<b>Photostabilität von Tetrapyrrolen in Lipoproteinen .....</b>	<b>140</b>
3.9.1	Einfluss der Dialyse auf die Photostabilität .....	144
3.9.2	Auswirkungen von D <sub>2</sub> O auf die Photostabilität .....	146
3.9.3	Sauerstoffabhängigkeit der Photoreaktion .....	150
3.9.4	Sauerstoffverbrauch bei Belichtung .....	155
<b>3.10</b>	<b>Photoinduzierte Peroxid-Bildung in Lipoproteinen .....</b>	<b>160</b>
3.10.1	Hydroperoxid-Analytik (DCF-Methode) .....	161
3.10.2	Endoperoxid-Analytik (TBARS-Methode) .....	166
<b>3.11</b>	<b>Reaktionsmechanismus in Lipoproteinen .....</b>	<b>170</b>
3.11.1	Effekte von ROS-Quenchern .....	170
3.11.2	Analyse photoinduzierter Cholesterin-Oxidationsprodukte .....	175
3.11.3	Analyse Cu <sup>2+</sup> -induzierter Cholesterin-Oxidationsprodukte .....	183
<b>3.12</b>	<b>Photoinduzierte Pigment-Oxidationsprodukte in Lipoproteinen .....</b>	<b>184</b>
3.12.1	Oxidationsprodukte der Tetrapyrrole .....	184

3.12.2	Oxidationsprodukte der Carotinoide .....	187
<b>3.13</b>	<b>Photostabilität von BChl a in organischen Lösungsmitteln .....</b>	<b>194</b>
<b>3.14</b>	<b>Reaktionsmechanismus in Lösungsmitteln .....</b>	<b>199</b>
3.14.1	Effekte von ROS-Quenchern .....	199
3.14.2	Analyse photoinduzierter Cholesterin-Oxidationsprodukte .....	201
<b>3.15</b>	<b>Photoinduzierte Oxidationsprodukte von BChl a in Aceton .....</b>	<b>204</b>
<b>4</b>	<b>ABSCHLIEßENDE DISKUSSION .....</b>	<b>211</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>227</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>229</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>231</b>

## **Anhang**

A	Physiologische Funktionen und Biosynthese der Tetrapyrrole .....	A-1
B	Gouterman-Molekülorbitale und Konfigurationswechselwirkung .....	A-8
C	Enzymatischer Abbau von Chlorophyll .....	A-10
D	Absorptionsspektren der verwendeten Pigmente in Lösungsmittel .....	A-12
E	Farben der Blutplasma-Fractionen .....	A-18
F	Pigmentverteilung von Tetrapyrrolen auf Blutplasma-Fractionen .....	A-20
G	Chemische Zusammensetzung der Lipoprotein-Fractionen .....	A-22
H	Kupferchemie .....	A-25



## ABKÜRZUNGEN

♂	Männer
♀	Frauen
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
$^3\text{O}_2$	Triplett-Sauerstoff
$A_{xxx}$	Absorption bei xxx nm
$A_{\text{Start}}$	Intensität des $\text{O}_y$ -Absorptionsmaximums zu Beginn des Experiments
Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
[a. u.]	willkürliche Einheiten
AAAGE	Agarose/Agar/Albumin-Gelelektrophorese
BChl	Bakteriochlorophyll
BChlid	Bakteriochlorophyllid
BHT	Butylhydroxytoluol (nach IUPAC: 2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol)
BP	Blutplasma
BPhe	Bakteriopheophytin
BPheid	Bakteriopheophorbid
BSA	Rinderserumalbumin
CE	Cholesterinester (siehe auch CholE)
CES	Cremophor <sup>®</sup> EL / Ethanol / phys. NaCl-Lösung 1:1:18 (v/v/v)
Chl	Chlorophyll
Chlid	Chlorophyllid
Chol	Cholesterin
CholE	Cholesterinester (siehe auch CE)
CM	Chylomikronen
CMC	kritische mizelläre Konzentration
d	Tag(e)
DABCO	1,4-Diaza-bicyclo[2.2.2]octan
DAD	Dioden-Array-Detektion
DCF	2',7'-Dichloro-fluorescein
DE	Diethylether
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC	freies Cholesterin
FSM	mesoporöse(s) Silica [folded-sheet mesoporous material(s)]
h	Stunde(n)

H <sub>2</sub> DCF	2',7'-Dichloro-dihydro-fluorescein (= 2',7'-Dichloro-fluorescin)
HDL	Lipoproteine hoher Dichte
HDP	Proteine hoher Dichte
HOMO	energiereichstes besetztes Orbital
Hp	Hämatoporphyrin
HpD	Hämatoporphyrin-Derivat(e)
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie
HSA	menschliches Serumalbumin
IDL	Lipoproteine intermediärer (Mittlerer) Dichte
IGZ	Iodixanol-Gradienten-Zentrifugation
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
LM	Lösungsmittel / Laufmittel
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LUMO	energieärmstes unbesetztes Orbital
min	Minute(n)
MO	Molekülorbital
MW	Molekulargewicht
n	Stichprobenanzahl
NIR	naher Infrarotbereich
NPC	Normalphasenchromatographie
OD	Optische Dichte, siehe Kap. 2.8
OD·ml <sub>Ether</sub>	Mengenangabe bei Pigmenten, siehe Kap. 2.8
OH-Chol(E)	Hydroxy-Cholesterin(ester)
OOH-Chol(E)	Hydroperoxy-Cholesterin(ester)
ozP	ohne zugesetztes Pigment
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PD	Photodetektion
PDT	Photodynamische Therapie
Phe	Pheophytin
Pheid	Pheophorbid
PL	Phospholipid(e)
RI	Brechungsindex
ROOH	Hydroperoxide
ROOR'	Endoperoxide
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RPC	Umkehrphasenchromatographie
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDZ	sequentielle Dichte-Zentrifugation
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_r$	Retentionszeit
TCA	Trichlooessigsäure
TFA	Trifluoessigsäure
TG	Triacylglycerin(e)
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	Volumen pro Volumen
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte
VIS	sichtbarer Spektralbereich
w/v	Gewicht pro Volumen
WBB	Wasserstoffbrückenbindung(en)



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Krebs

Der Begriff *Krebs* wurde erstmals von *Hippokrates von Kós* (ca. 460–375 v. Chr.) für verschiedenartigste Läsionen der Körperoberfläche verwendet (Tsuchiya und Fujisawa, 1999). Die strahlenförmig den Brusttumor einer Patientin umgebenden, aufgestauten Blutgefäße sollen ihn auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit den Beinen eines Krustentieres dazu inspiriert haben, die Krankheit als *karkinos* (dt.: Krebs) zu bezeichnen.

Krebs bezeichnet heute einen malignen (bösartigen) Tumor, d. h. eine Anhäufung körpereigener Zellen mit unkontrolliertem Wachstum. Diese entsteht, wenn durch zumeist mehrere genetische Schäden das Gleichgewicht zwischen Zelltod (Apoptose) und Zellneubildung (Mitose und Zellwachstum) in einer Zelle oder einem Gewebe gestört ist.

Derartige DNA-Schäden können spontan während der DNA-Replikation entstehen, häufig werden diese jedoch durch energiereiche Strahlung, bestimmte Viren, oder chemische Karzinogene induziert. Unter den besonders karzinogenen Verbindungen sind u. a. die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (z. B. Benzo(a)pyren), die Stoffgruppe der Aflatoxine, sowie Asbestfasern und einige Schwermetalle (z. B. Cadmium) bzw. deren Salze erwähnenswert (International Agency for Research of Cancer (IARC), 2008).

Des Weiteren existieren in vielen Fällen genetische Prädispositionen (ererbte Anlagen) für spezielle Krebserkrankungen, z. B. bei Frauen für Brust- und Eierstock-Tumoren (Antoniou und Easton, 2006).

Ein bösartiger Tumor unterscheidet sich von einem benignen (gutartigen) Tumor dadurch, dass er ein infiltrierendes, destruierendes, und metastasierendes Wachstum aufweist, d. h. er ist in der Lage in benachbarte Gewebe einzuwachsen, diese dabei zu zerstören, und über die Blut- und Lymphgefäße Metastasen (Tochter-Tumoren) zu erzeugen. Alle benignen Tumoren (z. B. Muttermale) können jedoch *entarten*, d. h. sich durch weitere Mutationen zu einem malignen Tumor verändern, und sollten daher ständig beobachtet werden.

Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 436.500 Menschen an Krebs. Obwohl in den letzten Jahren eine Reihe von neuartigen bzw. stark verbesserten Krebstherapien im klinischen Alltag etabliert werden konnte, stirbt statistisch gesehen noch immer fast jeder zweite Patient an dieser Krankheit (Krebs in Deutschland, 2008) (Abb. 1-1). Neben dem meist durch das Rauchen ausgelösten Lungenkrebs sind besonders viele Fälle von Darmkrebs, sowie Krebserkrankungen der geschlechtspezifischen Organe zu verzeichnen.

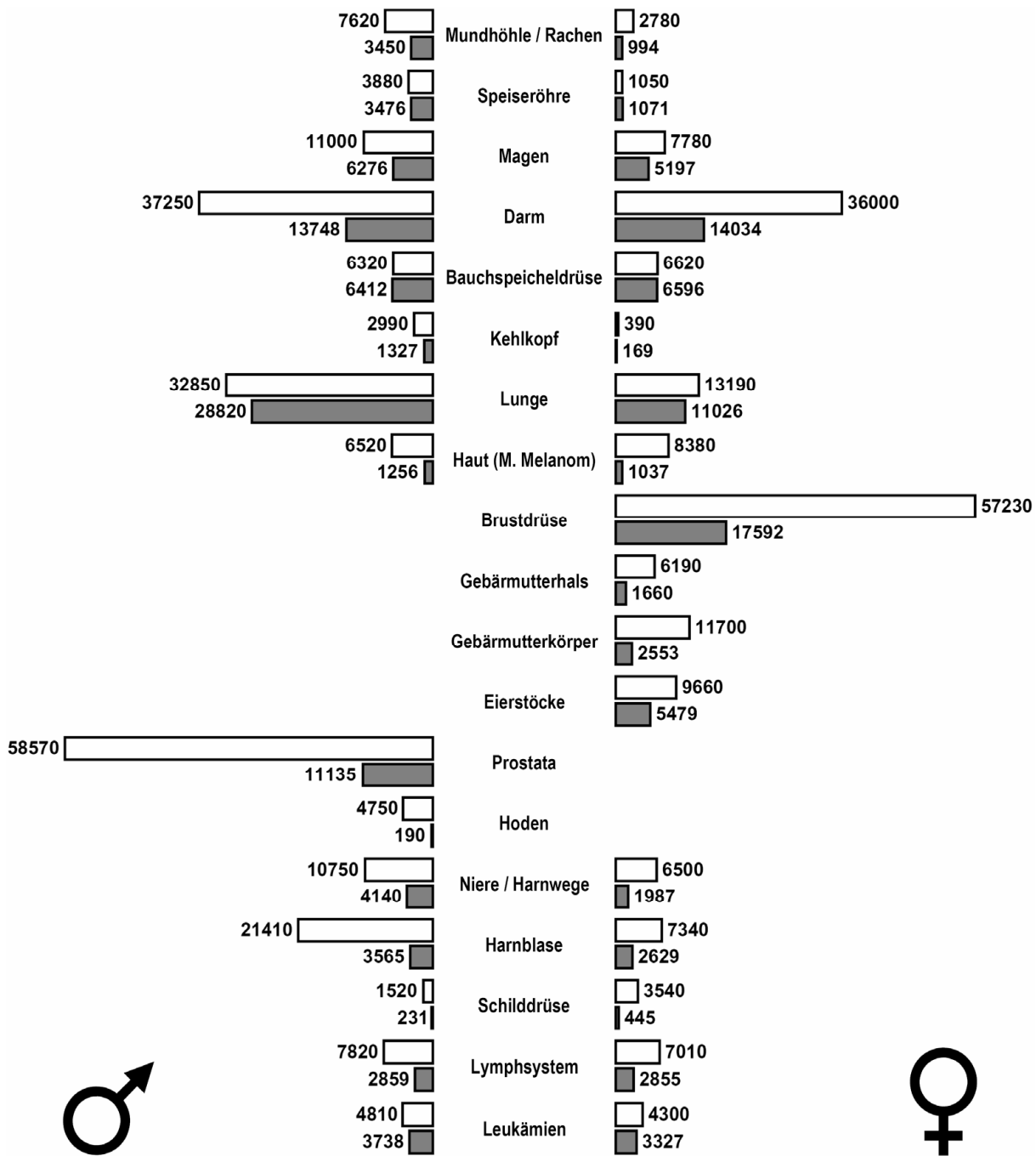


Abb. 1-1: Geschätzte Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2004 (Quelle: RKI-Schätzungen für Deutschland 2004\*) und Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland im gleichen Jahr (Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik\*) bei Männern (♂) und Frauen (♀) in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors. Nicht im Einzelnen erfasst wurden dabei u. a. Tumoren von Leber und Gallenblase, der Knochen, oder des Gehirns.

\*enthalten in: Krebs in Deutschland, 2008.

Insgesamt stehen im Jahr 2004 geschätzten 436.500 Krebsneuerkrankungen (230.500 ♂, 206.000 ♀) 208.824 dokumentierte Krebssterbefälle (110.745 ♂, 98.079 ♀) gegenüber.

### 1.1.1 Konventionelle Krebstherapien

Zur Behandlung von malignen Tumoren steht eine Reihe von Therapien zur Verfügung, die jedoch in fast allen Fällen starke Nebenwirkungen auslösen können. Ein großes Problem ist dabei die oft geringe Selektivität der verwendeten Therapeutika bezüglich entarteter Zellen. Besonders nach Krebstherapien im Kindes- und Jugendalter können u. a. sogar therapie-induzierte Sekundärmalignome auftreten (Klein, 2003).

#### Chirurgische Entfernung

Die älteste und prinzipiell sicherste Behandlung von Tumoren stellt die chirurgische Entfernung des betroffenen Gewebes dar. Allerdings muss dabei stets auch ein relativ großer Bereich des gesunden Gewebes mit entfernt werden, um sicherzustellen, dass keine Tumorzellen im Körper verbleiben. Des Weiteren werden Metastasen, selbst in unmittelbarer Nähe des behandelten Körperbereiches, nur selten erkannt und entfernt. Häufig werden zusätzlich zum Tumorgewebe auch die benachbarten Lymphknoten entfernt, die als natürliche Barriere für ins Blut gelangte entartete Zellen fungieren.

#### Strahlentherapie

Bei der Strahlen- oder Radiotherapie wird der Tumor mit ionisierender hochenergetischer Strahlung (meist Röntgenbremsstrahlung) beschossen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass malignes Gewebe meist strahlenempfindlicher als gesundes Gewebe ist, welches sich daher normalerweise schneller von der Behandlung erholt. Zudem wird die Strahlung durch die Verwendung von Blei-Blenden und mehreren beweglichen Strahlenquellen auf einen vorgegebenen dreidimensionalen Raum fokussiert. Bei der *Teletherapie* wird die Strahlung außerhalb des Körpers, bei der *Brachytherapie* im oder direkt am Körper erzeugt.

#### Chemotherapie

Bei der antineoplastischen Chemotherapie werden zumeist *Zytostatika* eingesetzt. Diese Therapeutika stören die Mitose oder das Zellwachstum aller Zellen, deren Zellzyklus sich nicht in der Ruhephase befindet. Das Hauptproblem bei dieser Therapie ist, dass bei jeder Behandlung immer nur ein gewisser Prozentsatz der malignen Zellen abgetötet wird. Daher muss die Behandlung in gleich bleibend hohen Dosen über einen langen Zeitraum hinweg erfolgen. Dies birgt die Gefahr, dass einige der Tumorzellen Resistenzen entwickeln. Ein weiteres Problem der Chemotherapie ergibt sich aus ihrem größten Vorteil. Durch die ganzheitliche Wirkung im Körper werden auch alle sich teilenden gesunden Körperzellen geschädigt (z. B. Knochenmarks-, Schleimhaut-, Haarwurzelzellen).

### 1.1.2 Photodynamische Therapie

Da all die bereits vorgestellten Krebstherapien gravierende Nebenwirkungen oder zum Teil unkalkulierbare Risiken aufweisen, besteht großes Interesse an alternativen Therapien mit besserer Verträglichkeit und Selektivität bei vergleichbarer Effektivität.

Eine dieser relativ neuen Behandlungsformen stellt die *Photodynamische Therapie (PDT)* dar, bei der die Toxizität eines mit Licht angeregten Farbstoffes zur Bekämpfung des Tumors ausgenutzt wird (Übersichtsartikel: Dougherty *et al.*, 1998; Dougherty, 2002).

Ein Vorteil der PDT im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie ist die Möglichkeit, bei räumlich begrenzten Tumoren nur im betroffenen Körperbereich die toxische Wirkung des Medikaments mittels einer fokussierten Bestrahlung aktivieren zu können, so dass in günstigen Fällen nur äußerst wenig gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird. Eine PDT ist oft auch dann durchführbar, wenn der Tumor operativ nicht entfernt werden kann. Im Gegensatz zur Strahlentherapie ist die PDT bei sachgemäßer Anwendung ohne erhebliche gesundheitliche Risiken beliebig oft anwendbar, und kann daher auch als Langzeitbehandlung eingesetzt werden. Die photodynamische Therapie wird oft problemlos in Kombination mit anderen Behandlungsmethoden angewendet, z. B. intraoperativ nach Exzision des sichtbaren bzw. chirurgisch entfernbaren Tumorgewebes (Nambisan *et al.*, 1988).

Während die Photosensibilisatoren der ersten Generation noch über Wochen bis Monate im Körper verblieben, und damit dem Patienten in dieser Zeit ein Leben im normalen Tageslicht unmöglich machten, beträgt die Verweildauer der neueren Photosensibilisatoren im Körper nur noch wenige Stunden bis Tage (Brun *et al.*, 2004). Dadurch wird in vielen Fällen eine ambulante Behandlung durchführbar, die dem Patienten eine deutlich höhere Lebensqualität ermöglicht, wie auch die dabei entstehenden Therapiekosten minimiert.

Die Nebenwirkungen der PDT halten sich im Vergleich zu den gängigen Krebstherapien sehr in Grenzen. Neben brennenden oder stechenden Schmerzen während der Behandlung, die durch Kühlung gelindert werden können, kommt es meist nur zu vorübergehenden Hautrötungen und Schwellungen der behandelten Körperregion(en). Bei einer systemischen PDT kann es u. U. zu Übelkeit, in äußerst seltenen Fällen zu Leberfunktionsstörungen kommen. Ihre Anwendung ist jedoch durch die relativ geringe Eindringtiefe des Lichts in Gewebe und die Effizienz und Selektivität der Photosensibilisatoren begrenzt.



### 1.1.2.1 Geschichte der Phototherapien

Die *Photochemotherapie* ist ein bedeutendes Teilgebiet der *Phototherapien (Lichttherapien)*, d. h. der Behandlung von verschiedenartigsten Krankheiten mittels Strahlung des UV-, VIS-, und NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums (Abb. 1-2). Im Gegensatz zu den klassischen Lichttherapien, welche auf der Anregung endogener (körpereigener) Farbstoffe beruhen, werden den Patienten bei einer Photochemotherapie vor der Bestrahlung mit Licht photosensibilisierende Pigmente zugeführt. Für eine *Photodynamische Therapie (PDT)*, die wiederum nur ein Teilgebiet der Photochemotherapien darstellt, wird am Ort ihrer Wirkung zusätzlich zu den exogenen Photosensibilisatoren noch molekularer Sauerstoff in normalen Gewebekonzentrationen benötigt.

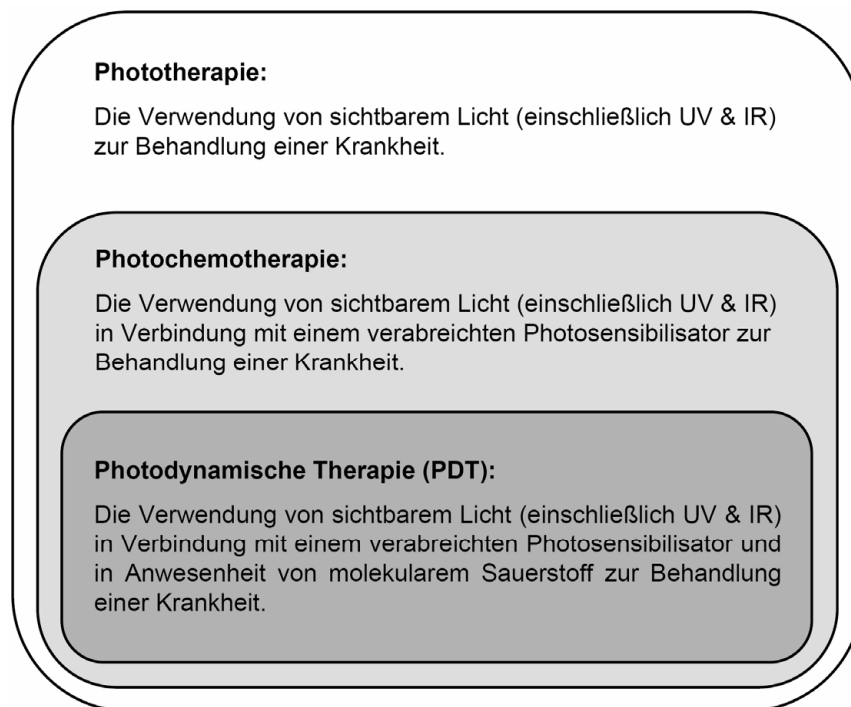


Abb. 1-2: Begriffliche Abgrenzung der verschiedenen Lichttherapien: Phototherapie (allg.), Photochemotherapie und Photodynamische Therapie (PDT) (Bonnett, 2000).

#### Phototherapie

Sonnenlicht wurde bereits im antiken Ägypten, China, Griechenland und Indien zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Erst ab dem 18. Jahrhundert wurde die Phototherapie von einigen europäischen Ärzten zur Behandlung einer Reihe unterschiedlichster Krankheiten wiederentdeckt (Hockberger, 2002). Bei den klassischen Phototherapien (*Heliotherapien*) spielen neben der Lichtabsorption des Gewebes sowohl die Erhitzung des Körpers, wie auch psychologische Effekte eine Rolle.

### Photochemotherapie

Bereits vor über 3000 Jahren wurden Psoralen-haltige Pflanzenextrakte (z. B. aus *Psoralea corylifolia*) zur Behandlung der Vitiligo eingesetzt. Erst mit der PUVA-Behandlung (Psoralene und UVA-Strahlung) der Psoriasis wurde 1974 die klassische Photochemotherapie wiederentdeckt (Parrish *et al.*, 1974). Diese wird jedoch heutzutage nicht mehr angewendet, da sie sich als mutagen und karzinogen herausstellte (Nijsten und Stern, 2003).

### Photodynamische Therapie

Vor über hundert Jahren begann die Geschichte der PDT (Übersichtsartikel: Ackroyd *et al.*, 2001; Moan und Peng, 2003) mit einem Experiment von Raab, im Labor von von Tappeiner an der LMU München. Im Wintersemester 1897/98 untersuchte Raab die Toxizität des Farbstoffes Acridinorange auf Wimperntierchen (*Paramecium caudatum*). Bei einem seiner Versuche überlebten diese bei sonst gleichen Bedingungen anstatt der üblichen ~1,5 Stunden rund 15 Stunden. Er stellte fest, dass bei diesem Versuch das Labor durch ein schweres Gewitter ungewöhnlich stark verdunkelt worden war, und ging der Frage nach, ob das Licht eine Rolle beim tödlichen Effekt des Farbstoffes spielen könnte. Dies führte unmittelbar zur Entdeckung des *Photodynamischen Effekts* (von Tappeiner, 1900; Raab, 1900). Als kurz darauf erkannt wurde, dass auch Sauerstoff für diesen Effekt benötigt wird, verwendete von Tappeiner erstmals den Ausdruck *Photodynamische Wirkung*, um damit die Notwendigkeit von Sauerstoff in diesem Prozess zu betonen (von Tappeiner und Jodlbauer, 1904). Auch erste Versuche am Menschen wurden zu dieser Zeit in Kooperation mit dem Hautarzt Jodlbauer durchgeführt, so wurden u. a. Hauttumoren und andere Hauterkrankungen mit lokal aufgetragenem Eosin behandelt (von Tappeiner und Jesionek, 1903; Jesionek und von Tappeiner, 1905; zusammengefasst in: von Tappeiner und Jodlbauer, 1907).

In der Reihe von Veröffentlichungen ab 1911 (u. a. Hausmann, 1911) über die photosensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins ist vor allem der Selbstversuch von Meyer-Betz erwähnenswert (Meyer-Betz, 1913), der sich am 14. Oktober 1912 etwa 200 mg gelöstes Hämatoporphyrin injizierte. Am 16. Oktober 1912, einem sehr sonnigen Tag in Königsberg, setzte eine photodynamische Reaktion ein. Die sonnenexponierte Seite seines Gesichts und beide Hände zeigten starke Rötungen und Schwellungen, zum Teil platze die Haut auf. Erst im nächsten Frühjahr sollte er seine Lichtempfindlichkeit wieder vollständig verlieren.

Die Fluoreszenz von Hämatoporphyrin wurde bereits 1867 beschrieben (Thudichum, 1867). Die rote Fluoreszenz von Porphyrinen in Tumoren wurde 1924 beobachtet (Policard, 1924). Erst 1931 konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Fluoreszenz nicht von den Tumor infizierenden Bakterien herrührt (Körbler, 1931), wie bis dato angenommen.

Die relative Anreicherung von exogenen Porphyrinen in Tumorgewebe konnte 1942 gezeigt werden (Auler und Banzer, 1942). Erste Studien zur Selektivität von Porphyrinen für neoplastische, embryonale und regenerierende Gewebe wurden 1948 veröffentlicht (Figge *et al.*, 1948).

Im Zeitraum 1960–1967 erfolgte eine Reihe von Publikationen von Lipson *et al.* bezüglich der Tumor-Lokalisierung von verschiedenen Porphyrinen. In dieser Zeit wurde auch eine als *Hematoporphyrin Derivative (HpD)* bezeichnete Pigment-Präparation vorgestellt (Lipson *et al.*, 1961), welche ursprünglich von Schwartz entwickelt worden war (Schwartz *et al.*, 1955). Diese besteht aus einer Mischung aus fluoreszierenden Monomeren mit geringer Tumor-selektivität, Dimeren mit schwacher Fluoreszenz und mittelmäßiger Tumorselektivität, und nicht-fluoreszierenden Oligomeren mit hoher Tumorselektivität (Dougherty, 1983; Moan und Sommer, 1983). Es wird vermutet, dass die Oligomere erst nach ihrer Aufnahme in den Tumor zu fluoreszierenden Mono- und Dimeren zerfallen. Durch Entfernung der Monomere aus dem HpD entstand ein Medikament, das bis heute das meistverwendete in der photodynamischen Krebstherapie ist.

HpD wurde zunächst im Rahmen der Krebserkennung, der *Photodetektion (PD)*, verwendet. Bei dieser diagnostischen Methode können anhand der Photosensibilisator-Fluoreszenz die exakte Ausdehnung des malignen Gewebes bestimmt, und Metastasen des Tumors erkannt werden.

Das Konzept der Photodynamischen Krebstherapie wurde zum ersten Mal 1972 beschrieben (Diamond, 1972). Die Effektivität der PDT konnte 1974 in einem Tiermodell gezeigt werden (Dougherty, 1974). Über erste vollständige Heilungen von Mäusen mit implantierten Tumoren wurde 1975 berichtet (Dougherty *et al.*, 1975). Die erste PDT am Menschen wurde 1976 bei einem Patienten mit Blasenkrebs durchgeführt (Kelly und Snell, 1976). Die Ergebnisse der ersten größeren Untersuchungsreihe zur Behandlung von Hautkrebs mittels PDT wurden 1978 veröffentlicht (Dougherty, 1978).

Mittlerweile findet die PDT besonders bei Haut-, Blasen, Lungen- und Speiseröhrenkrebs Verwendung, d. h. bei allen Organen mit leicht zugänglichen Oberflächen. Jedoch sind durch die stark verbesserte Glasfasertechnik mittlerweile fast alle Krebsarten für die PDT zugänglich, u. a. sogar Hirntumoren (Stylli und Kaye, 2006a; Stylli und Kaye, 2006b). Daneben findet die PDT mittlerweile bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen Anwendung, z. B. bei der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (Wormald *et al.*, 2007; Fenton, 2006).

### 1.1.2.2 Wirkungsweise der PDT

Eine PDT erfolgt in der klinischen Praxis stets in zwei Behandlungsschritten, die meist mehrere Stunden auseinander liegen – die Verabreichung des Photosensibilisators ❶, und die anschließende Bestrahlung des Tumorgewebes ❷ (Abb. 1-3).

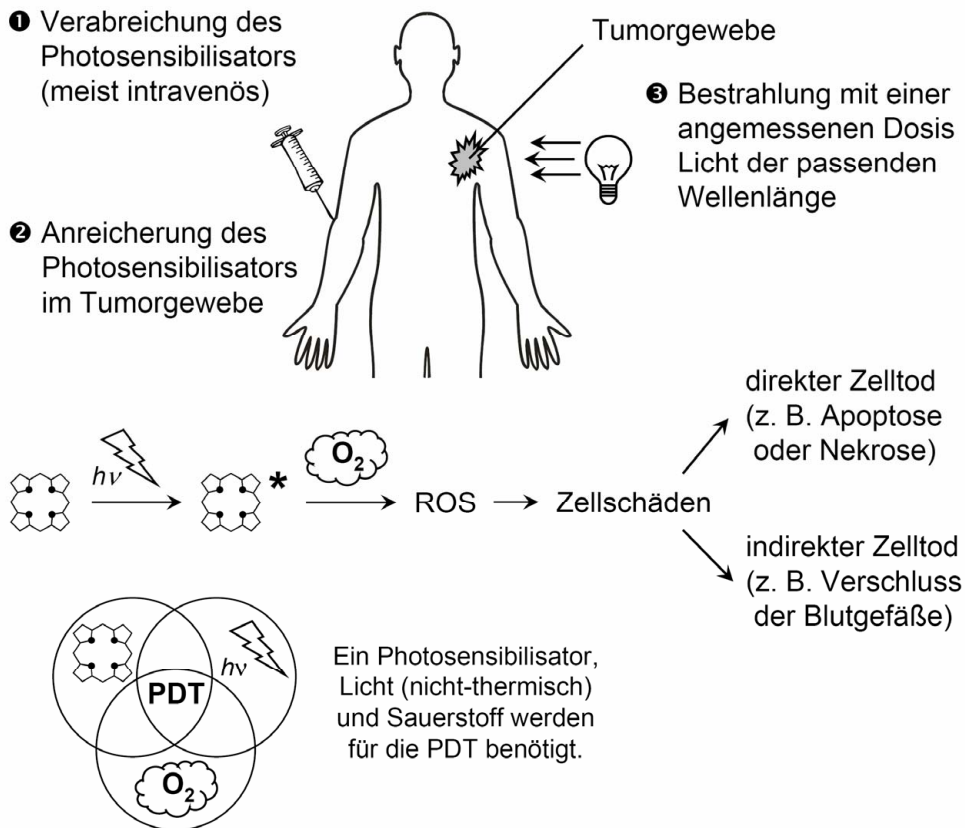


Abb. 1-3: Durchführung einer PDT und ihre Wirkungsweise auf molekularer und zellulärer Ebene. ROS: reaktive Sauerstoffspezies (siehe Abb. 1-4).

Bei der photodynamischen Therapie von malignen Tumoren wird dem Patienten zunächst ein Farbstoff, der *Photosensibilisator*, meist intravenös verabreicht ❶. Das Lösen der oft relativ unpolaren Farbstoffe in einer für den Menschen ungiftigen Form ist dabei nicht unproblematisch. Im Falle von Oberflächentumoren kann der Photosensibilisator auch als Creme aufgetragen (z. B. Haut) oder in Form eines Sprays inhaliert werden (z. B. Lunge).

HpD und weiter entwickelte Photosensibilisatoren reichern sich im Tumorgewebe an ❷, was jedoch in den meisten Fällen wohl nicht auf eine selektive Aufnahme zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher ist, dass die Photosensibilisatoren lediglich auf Grund des viel höheren Stoffwechsels und anderer Eigenschaften eines schnell proliferierenden Gewebes vermehrt unspezifisch in die Zellen aufgenommen werden.

Dazu gehören das großvolumige Interstitium, die erhöhte Anzahl an Makrophagen, die oft undichte Mikrovaskulatur, der geringe Lymphabfluss, der niedrige extrazelluläre pH-Wert, die relativ hohe Anzahl an neu synthetisiertem Collagen, und die vielen Rezeptoren für Lipoproteine. Jedoch gibt es bisher noch keine gesicherte Erklärung für die bei Photosensibilisatoren beobachtete Anreicherung in neoplastischen Geweben (Moan, 1986; Moan und Berg, 1992).

Erst bei Aktivierung ☉, d. h. Bestrahlung des Photosensibilisators mit Licht einer geeigneten Wellenlänge im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums (inkl. UV und NIR), entfaltet dieser in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff durch Bildung von *Reaktiven Sauerstoff-Spezies* (ROS) seine toxische Wirkung. Bei den Reaktionen, die ein angeregter Photosensibilisator eingehen bzw. initiieren kann, wird zwischen den *Reaktionen des Typs I*, die über radikalische Intermediate verlaufen, und den *Reaktionen des Typs II*, die die Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) beinhalten, unterschieden (Abb. 1-4).

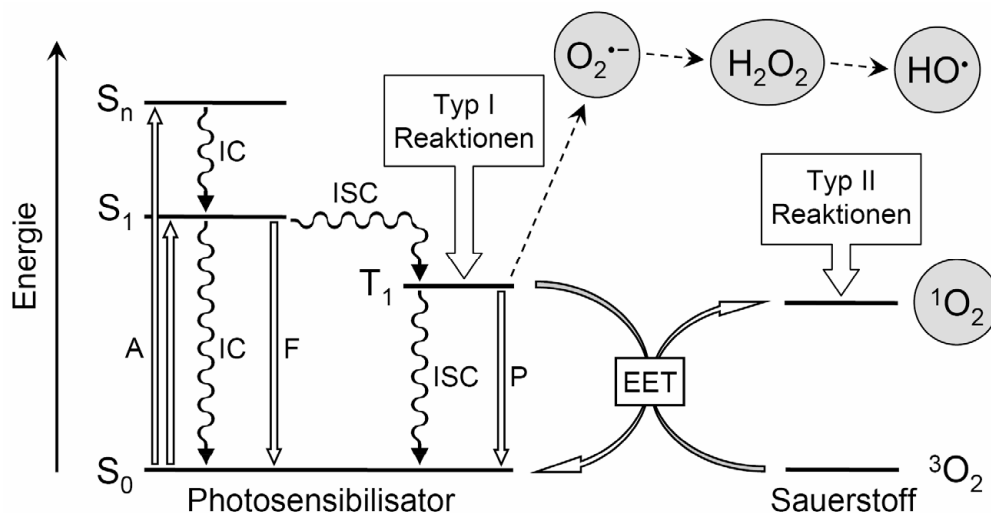


Abb. 1-4: Photophysikalische Reaktionen und Prozesse im Rahmen der PDT: Absorption (A), Interne Umwandlung (IC), Fluoreszenz (F), Interkombination (ISC), Phosphoreszenz (P), Energieübertragung (EET). Die Position der drei dargestellten Typ I-Reaktionsprodukte hat keinen Bezug zur Energieskala.

Bei den radikalischen Reaktionen des angeregten Photosensibilisators im Triplett-Zustand ( $T_1$ ) überträgt dieser eines seiner Elektronen auf ein anderes Molekül. Häufig handelt es sich bei diesem Molekül um Sauerstoff, wodurch das Superoxid-Radikalanion entsteht. Dieses kann durch die Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden, welches in Anwesenheit von  $Fe^{2\oplus}$ -Ionen Hydroxyl-Radikale erzeugen kann ( $\rightleftharpoons$  Fenton-Reaktion). Auch einige andere Metall-Ionen (z. B.  $Cu^{\oplus}$ ) können Fenton-ähnliche Reaktionen initiieren.

Singulett-Sauerstoff entsteht durch eine Energieübertragung vom angeregten Photosensibilisator im Triplett-Zustand ( $T_1$ ) auf Sauerstoff im Grundzustand ( $^3O_2$ ). Singulett-Sauerstoff kann mit einer Reihe von biologischen Molekülen reagieren, z. B. ungesättigten Lipiden, Purin-Basen, Cholesterin und Histidin. Mechanistisch handelt es sich dabei meist um Reaktionen mit isolierten Doppelbindungen ( $\Rightarrow$  Hydroperoxide), (2+2)-Cycloadditionen an elektronenreiche Doppelbindungen ( $\Rightarrow$  instabile Endoperoxide, die in Carbonyl-Fragmente zerfallen), und (4+2)-Cycloadditionen des Diels-Alder-Typs an konjugierte Diene ( $\Rightarrow$  Endoperoxide).

Da alle PDT-Reaktionen Sauerstoff verbrauchen, kann die Effektivität der PDT durch geringe Flussraten oder intermittierende Belichtungen gesteigert werden (Dougherty *et al.*, 1979).

Die Wirkungsweise der PDT ist allerdings bis heute nicht völlig verstanden (Dougherty *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1992). Bisher konnten in Abhängigkeit von den verwendeten Photosensibilisatoren sowohl Effekte auf zellulärer Ebene (Henderson *et al.*, 1984), wie auch auf organischer Ebene, vermittelt durch die Blutgefäße, nachgewiesen werden (Star *et al.*, 1986).

Es wird vermutet, dass lipophile bzw. Liposomen- oder Lipoprotein-gebundene Photosensibilisatoren eine eher direkte Wirkung auf die Tumorzellen ausüben, hydrophile Farbstoffe dagegen mehr die den Tumor versorgenden Blutgefäße schädigen (Kessel *et al.*, 1987; Henderson *et al.*, 1985). Meist wird der Zelltod durch Apoptose ausgelöst (Agarwal *et al.*, 1991), wobei vor allem Schäden an den Mitochondrien von Bedeutung zu sein scheinen (Kessel und Luo, 1998; Moor, 2000). Dies ist eine mögliche Erklärung für die sehr breit gefächerte Effektivität der PDT.

Neben diesen unmittelbaren Effekten scheinen auch immunologische Reaktionen bei der PDT eine wichtige Rolle zuspielden (Canti *et al.*, 1981; Korbelik, 1996).

Die Schäden an den Epithelzellen der Blutgefäße führen oft zu einer *Embolisation*, d. h. einem völligen Verschluss des betroffenen Gefäßes, und damit zu einem langsamen Tod der Tumorzellen durch eine Mangelversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (Reed *et al.*, 1989; Fingar, 1996).

## 1.2 Photosensibilisatoren

Aufgrund der starken Streuung des Gewebes und der hohen Absorption von Hämoglobin im Bereich  $<600$  nm, sollte ein Farbstoff, der als Photosensibilisator eingesetzt werden soll, mindestens eine Absorptionsbande langwelliger als 600 nm besitzen.

Auf der anderen Seite muss berücksichtigt werden, dass die Energie des  $T_1$ -Zustandes des Farbstoffes  $>94$  kJ mol<sup>-1</sup> sein sollte, der minimalen Energie zur Anregung eines Sauerstoffmoleküls in dessen  $^1\Delta_g$ -Zustand (Tab. 1-1). Der energiereichere  $^1\Sigma_g^+$ -Zustand wird durch innere Umwandlung sehr schnell zum  $^1\Delta_g$ -Zustand deaktiviert, und kann durch diese Kurzlebigkeit keine Photoreaktionen initiieren. Da die Energie des  $T_1$ -Zustandes eines Farbstoffes meist nur etwa zwei Drittel der Energie von dessen  $S_1$ -Zustand beträgt, ist ein Farbstoff mit einer energieärmsten Absorptionsbande langwelliger als  $\sim 850$  nm meist nicht mehr in der Lage, Singulett-Sauerstoff zu erzeugen. Zusätzlich absorbiert im Bereich zwischen 900 und 1000 nm das Wasser mit einer schwachen Schwingungsbande ( $\epsilon_{960} = 0,0036$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Tab. 1-1: Übersicht über die drei energieärmsten Zustände des Sauerstoffmoleküls (O<sub>2</sub>)

gewöhnlicher Name	Bezeichnung des Zustandes	Energie über T <sub>1</sub> [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Lebenszeit In Lösung	elektronische Konfiguration des HOMO
Sauerstoff ( <sup>3</sup> O <sub>2</sub> )	<sup>3</sup> Σ <sub>g</sub> <sup>-</sup> (Triplett)	0	∞	↑   ↑
Singulett-Sauerstoff ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	<sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> (Singulett)	94	~10 <sup>-5</sup> s	↑↓   -
-	<sup>1</sup> Σ <sub>g</sub> <sup>+</sup> (Singulett)	155	<10 <sup>-9</sup> s	↑   ↓

Der Bereich zwischen 600 und 850 nm wird daher oft auch als *therapeutisches Fenster* der PDT bezeichnet (Abb. 1-5), d. h. ein idealer Photosensibilisator für die PDT sollte eine starke Absorptionsbande innerhalb dieser spektralen Grenzen besitzen.

Die Lebenszeit des angeregten  $^1\Delta_g$ -Zustandes ist stark vom umgebenden Medium abhängig. So ist diese z. B. in deuterierten Lösungsmitteln deutlich länger als in protischen Lösungsmitteln ( $\tau$  in D<sub>2</sub>O:  $\sim 20$  μs;  $\tau$  in H<sub>2</sub>O:  $\sim 2$  μs). Ursache hierfür ist die stärkere Absorption der protischen Lösungsmittel im IR-Bereich, deren angeregte Zustände den Singulett-Sauerstoff wieder in den Grundzustand überführen.

Im Organismus ist allerdings die Lebenszeit auf Grund der hohen Reaktivität vieler Biomoleküle  $<0,04$  μs, entsprechend einer Diffusionsentfernung  $<0,02$  μm.

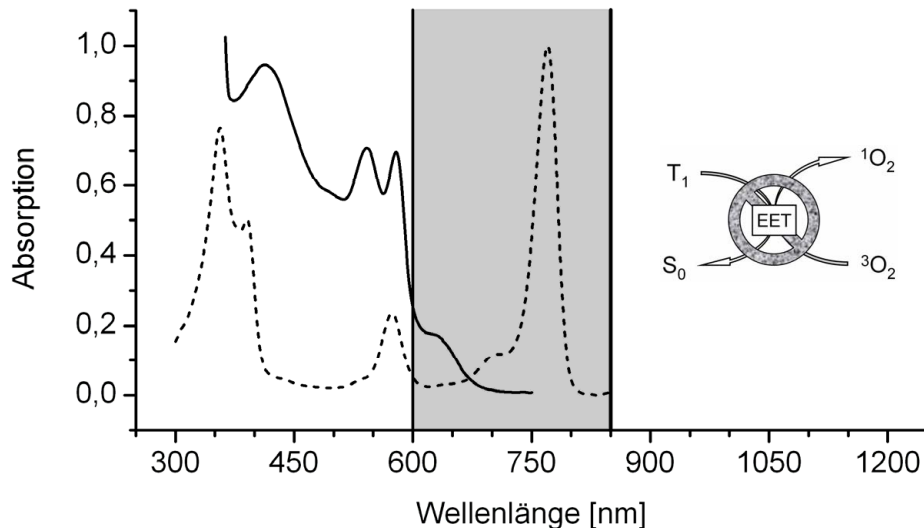


Abb. 1-5: Das therapeutische Fenster der PDT zwischen 600 und 850 nm (grau hinterlegt). Dargestellt ist die Absorption bzw. Extinktion (Absorption + Streuung) eines tierischen Gewebes mit einer Schichtdicke von ~1 mm (—), sowie die Absorption von Pd-BPheid a (Tookad<sup>®</sup>) (- -) als Beispiel für einen im therapeutischen Fenster stark absorbierenden PDT-Photosensibilisator.

Ein guter Photosensibilisator für die PDT sollte möglichst viele der folgenden Forderungen erfüllen (Allison *et al.*, 2004):

- ♦ einfache Herstellung (kostengünstige und großtechnisch realisierbare Synthese)
- ♦ chemisch rein (Monomere mit bekannter und konstanter Zusammensetzung, sowie ohne chirale Zentren, um die Gefahr von seltenen Nebenwirkungen zu minimieren)
- ♦ ausreichende Stabilität gegenüber allen chemischen und enzymatischen Angriffen im Organismus
- ♦ geringe Toxizität, Mutagenität, Kanzerogenität, Allergenwirkung des Photosensibilisators und aller durch Bestrahlung oder Verstoffwechslung entstehenden Produkte
- ♦ gute Wasserlöslichkeit und Dosierbarkeit
- ♦ einfache Administration (z. B. Infusion, Salbe, Spray)
- ♦ selektive Anreicherung in neoplastischen Geweben
- ♦ keine *untere Grenzdosis* (Dosis, bei deren Unterschreitung sich die Wirkung des Photosensibilisators umkehrt, d. h. das Tumorstadium stimuliert wird)
- ♦ hohe Triplett-Quantenausbeute und lange Triplett-Lebenszeit
- ♦ hohe Absorption im NIR-Bereich des Spektrums (im therapeutischen Fenster)
- ♦ geringe Ausbleichung während der Belichtung
- ♦ vollständige Ausscheidung aus dem Organismus innerhalb weniger Stunden (⇒ keine Photosensibilisierung der Haut und Augen über einen längeren Zeitraum)



### 1.2.1 Hämatoporphyrin-Derivat

*Hämatoporphyrin (Hp)*, so benannt von Hoppe-Seyler (Hoppe-Seyler, 1871), wurde in einer unreinen Form erstmals 1841 durch das Erhitzen von getrocknetem Blut mit Schwefelsäure hergestellt (Scherer, 1841). Das *Hämatoporphyrin-Derivat (HpD)* (Lipson *et al.*, 1961) wird durch Behandlung von Hämatoporphyrin-Dihydrochlorid mit 5% Schwefelsäure in Essigsäure ( $\Rightarrow$  *HpD Stage I*) und anschließender alkalischer Aufarbeitung ( $\Rightarrow$  *HpD Stage II*) hergestellt.

Die Di- und Oligomeren des HpD Stage II sind durch Ester-, Ether-, und C-C-Bindungen miteinander verbunden (Bonnett, 2000), welche aus den verschiedenen HpD-Monomeren des HpD Stage I entstehen (Abb. 1-6).

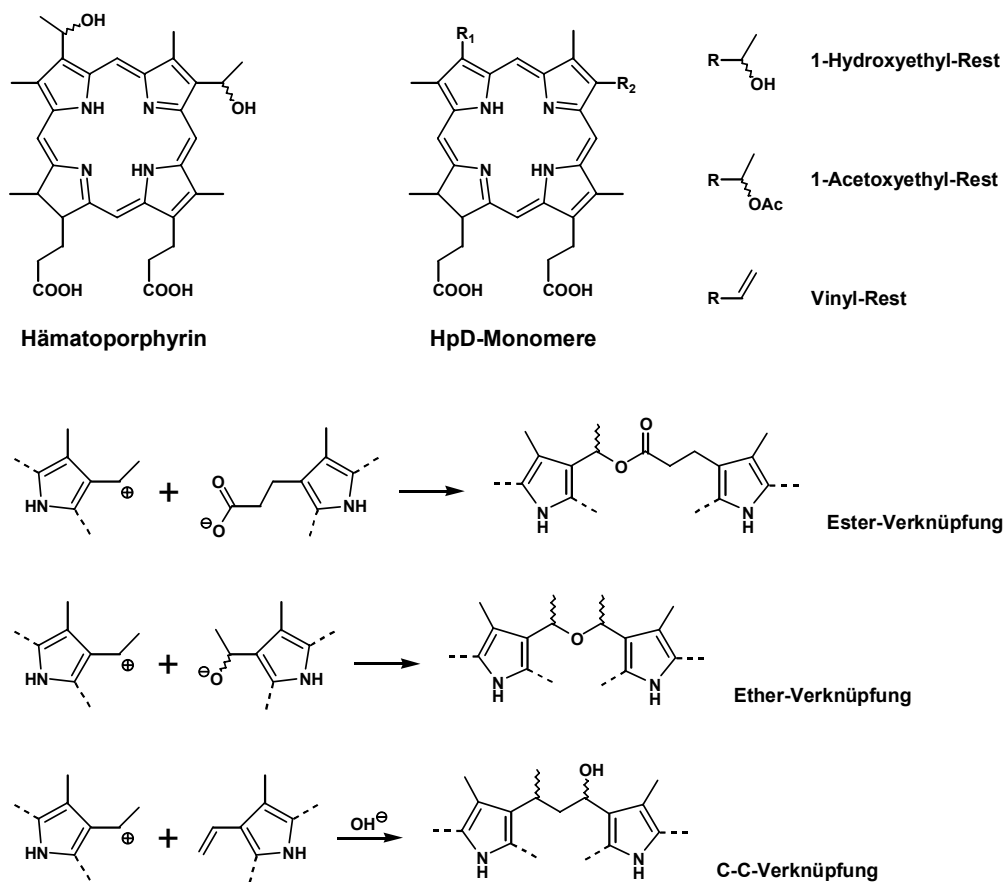


Abb. 1-6: Chemische Strukturen von Hämatoporphyrin (oben links), HpD Stage I (oben rechts), und Verknüpfungen der Di- und Oligomere des HpD Stage II (unten).

Auf der Basis des HpD Stage II sind unter der Bezeichnung *porfimer sodium* eine Reihe von Präparaten kommerziell erhältlich: *Photofrin*<sup>®</sup> (USA), *Photosan*<sup>®</sup> (Deutschland), *Photogem*<sup>®</sup> (Russland), *Hematodrex*<sup>®</sup> (Bulgarien), und *Photocarcinorin*<sup>®</sup> (China).

### 1.2.2 Photosensibilisatoren der 2. und 3. Generation

HpD und alle damit verwandten Substanzen werden als Photosensibilisatoren der ersten Generation bezeichnet. Photosensibilisatoren der zweiten Generation sind Monomere mit einheitlicher chemischer Struktur, die eine verbesserte Effektivität und Selektivität aufweisen (Übersichtsartikel: Brandis *et al.*, 2006a; Brandis *et al.*, 2006b; Bonnett und Martínez, 2001; Bonnett, 2000).

Ein besonderes Augenmerk in der Entwicklung neuartiger Photosensibilisatoren wurde auf eine bathochrome Verschiebung der langwelligsten Absorptionsbanden der Farbstoffe hin zu Wellenlängen innerhalb der Grenzen des therapeutischen Fensters gelegt (Abb. 1-7).

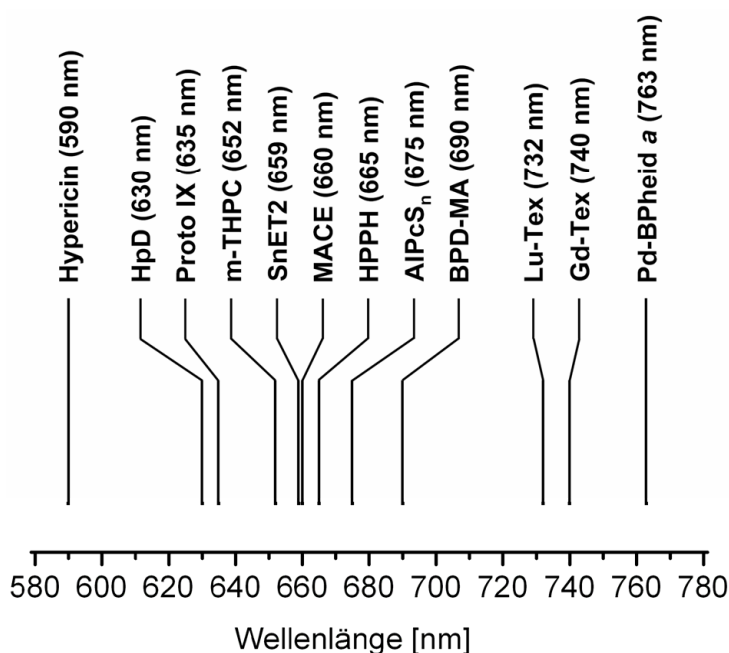


Abb. 1-7: Wellenlängen der langwelligsten Absorptionsbanden einiger ausgewählter, kommerziell erhältlicher Photosensibilisatoren. Die chemischen Strukturen dieser Farbstoffe sind in Abb. 1-8, sowie in Abb. 1-6 (HpD) und Abb. A-1 (Proto IX) dargestellt.

Die erst in den letzten Jahren entwickelten Photosensibilisatoren der dritten Generation besitzen zur weiteren Steigerung der Selektivität zusätzlich kovalent verknüpfte Moleküle biologischen Ursprungs, wie z. B. Antikörper (van Dongen *et al.*, 2004), Hormone (James *et al.*, 1999), Zucker (Chen *et al.*, 2004), oder Aminosäuren (Spikes und Bommer, 1993).

Hypericin, ein Naphthodianthron (erweitertes Chinon), ist ein Inhaltsstoff des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*), das bei grasenden Tieren auf Grund seiner photosensibilisierenden Wirkung zu schwereren Hautverbrennungen führen kann (⇒ Hypericismus der Weidetiere). Das kommerziell vertriebene VIMR<sub>xyn</sub><sup>®</sup> besteht aus synthetisch hergestelltem Hypericin.

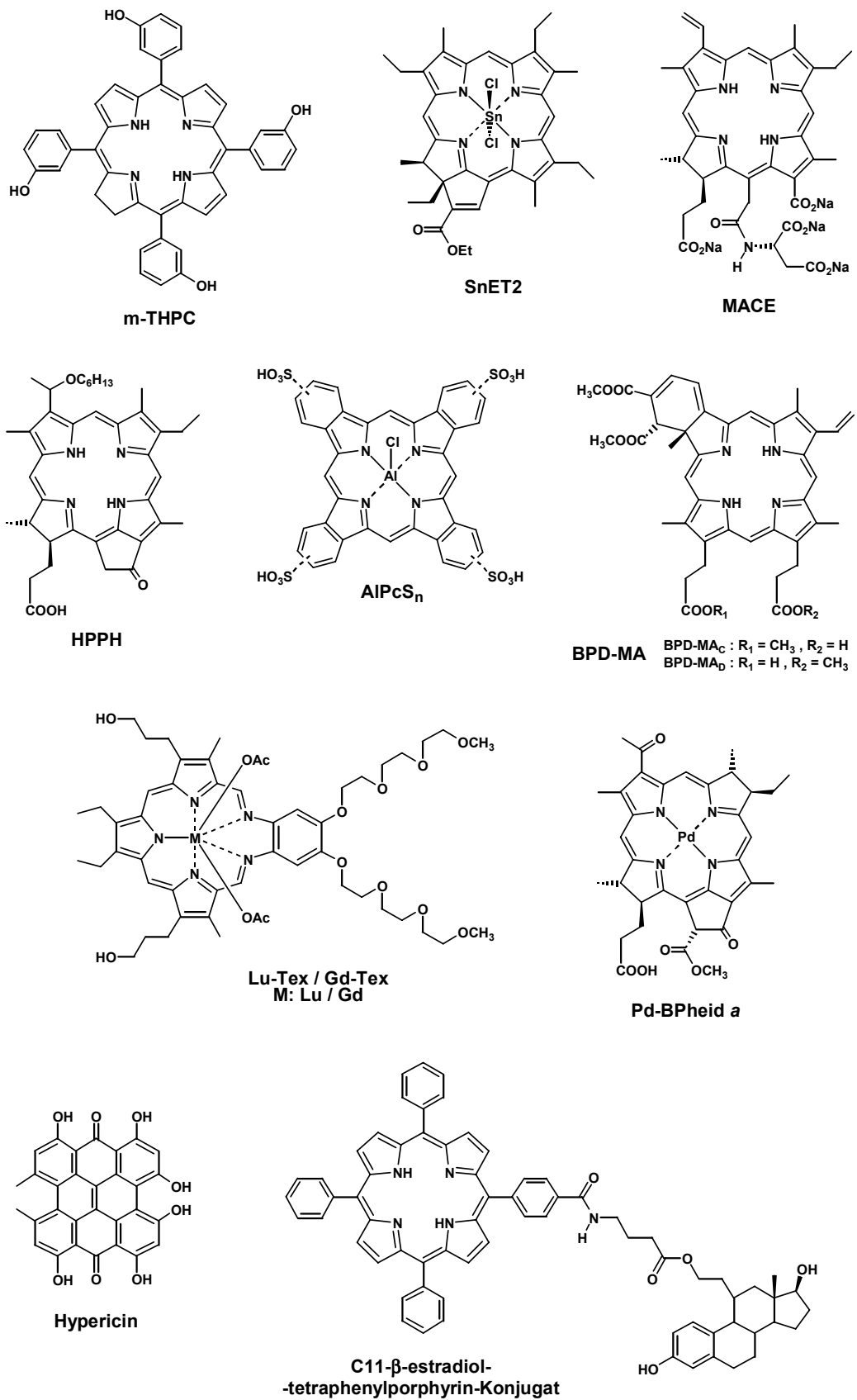


Abb. 1-8: Chemische Strukturen einiger ausgewählter, kommerziell erhältlicher Photosensibilisatoren, sowie eines experimentellen Photosensibilisators der 3. Generation (unten rechts). Vollständige und alternative Namen, sowie Handelsnamen siehe Übersicht nächste Seite.

Eine besondere Strategie stellt die Verabreichung von 5-Aminolävulinsäure (ALA, Levulan<sup>®</sup>) dar. Dieses Zwischenprodukt der Tetrapyrrol-Biosynthese (siehe Abb. A-1) führt zu einer vermehrten Bildung von Protoporphyrin IX (Proto IX), welches dann als Photosensibilisator fungiert (Übersichtsartikel: Gold, 2006). Die PDT-Effektivität kann durch Verabreichung von ALA-Derivaten weiter gesteigert werden, z. B. ALA-Methylester (MAL, Metvix<sup>®</sup>) oder ALA-Hexylester (HAL, Hexvix<sup>®</sup>) (Fotinos *et al.*, 2006).

Alle übrigen Photosensibilisatoren (inklusive HpD) werden synthetisch erzeugt, jedoch oftmals unter Verwendung natürlicher Pigmente als Edukte (Ausgangsstoffe) dieser Synthesen. Unter den kommerziell erhältlichen PDT-Farbstoffen, bei denen es sich mit Ausnahme des Hypericins um Porphyrin-, Texaphyrin- und Phthalocyanin-Derivate handelt, finden sich u. a.:

- ♦ 5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hydroxyphenyl)-chlorin (m-THPC, temoporfin, Foscan<sup>®</sup>)
- ♦ Tin ethyl etiopurpurin (SnET2, rostaporfin, Purlytin<sup>®</sup>)
- ♦ Mono-L-aspartyl chlorin e<sub>6</sub> (MACE, talaporfin sodium, NPe6<sup>®</sup>, LS11)
- ♦ 3-(1-Hexyloxyethyl)-3-Devinylpyropheophorbide *a* (HPPH, Photochlor<sup>®</sup>)
- ♦ Sulfonated Chloroaluminum Phthalocyanine (AlPcS<sub>n</sub>, Photosens<sup>®</sup>)
- ♦ Benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA, verteporfin, Visudyne<sup>®</sup>)
- ♦ Lutetium-texaphyrin (Lu-Tex, motexafin lutetium, Lutrin<sup>®</sup>, Antrin<sup>®</sup>, Optrin<sup>®</sup>)
- ♦ Gadolinium-texaphyrin (Gd-Tex, motexafin gadolinium, Xcytrin<sup>®</sup>)
- ♦ Palladium-Bacteriopheophorbide *a* (Pd-BPheid *a*, padoporfin, Tookad<sup>®</sup>)

Erwähnenswert ist die Reihe der 5,10,15,20-Tetrakis-(*m*-hydroxyphenyl)-porphyrine. Sie stellt das bisher einzige Beispiel für PDT-Experimente dar, bei denen alle drei Oxidationsstufen des Tetrapyrrol-Grundgerüsts ansonsten identischer Moleküle verwendet wurden (Bonnett *et al.*, 1989; Bonnett *et al.*, 1999a; Bonnett *et al.*, 1999b; Bonnett und Martinez, 2002).

Neben dem bereits in der obigen Liste aufgeführten Chlorin-Derivat (m-THPC) sind dies das Porphyrin-Derivat (m-THPP) und das Bakteriochlorin-Derivat (m-THPBC).

Bekannte Photosensibilisatoren sind auch bei den Acridin-Farbstoffen (z. B. Acridinorange; Kusuzaki *et al.*, 2005), den Xanthen-Farbstoffen (z. B. Bengalrosa; Bottone *et al.*, 2006), den Cyanin-Farbstoffen (z. B. Indocyaningrün; Skrivanová *et al.* 2006), sowie den Phenothiazin-Farbstoffen (z. B. Methylenblau; Aghahosseini *et al.*, 2006) zu finden. Daher werden zurzeit alle der oben genannten Farbstoffe auf ihre Verwendbarkeit im Rahmen der PDT getestet.

Weitere interessante Farbstoffe sind auch spezielle Derivate der Quadratsäure, die durch kovalente Verknüpfungen mit Cholesterin- oder Zucker-Resten bereits als Photosensibilisatoren der 3. Generation verfügbar sind (Ramaiah *et al.*, 1997; Jyothish *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Chlorophyll

Pro Jahr werden  $\sim 10^9$  Tonnen Chlorophyll zu Beginn der Wachstumsphase im Frühjahr neu synthetisiert, und nach deren Beendigung im Herbst wieder abgebaut (Hendry *et al.*, 1987). Diese Chlorophyll-Rhythmik kann als das wohl offensichtlichste Zeichen für Leben auf der Erde betrachtet werden (Kräutler und Matile, 1999).

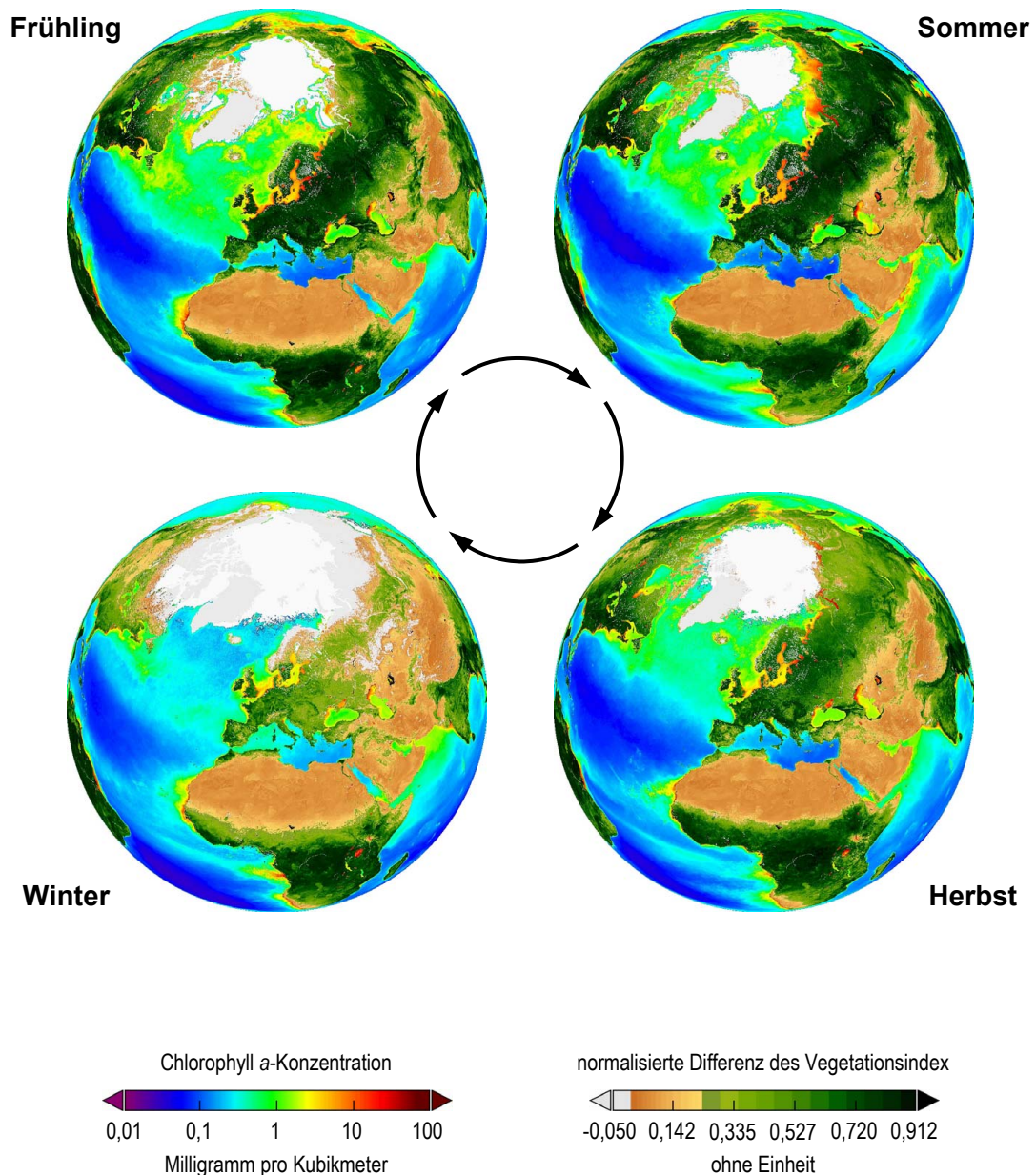


Abb. 1-9: Chlorophyll-Konzentrationen der Ozeane und des Festlandes im Lauf der Jahreszeiten. Es handelt sich bei den dargestellten Karten um Falschfarbendarstellungen der gemittelten Daten aus mehreren Jahren der Erdbeobachtung (SeaWiFS Biosphere Globes). Die Kartenzentren aller vier Globen liegen bei 50° nördlicher Breite und 10° östlicher Länge.

Diese saisonalen Umwälzungen können sogar aus dem Weltraum beobachtet werden. So wurden im Rahmen des Projektes *SeaWiFS* (*Sea-viewing Wide Field-of-view Sensor* an Bord des Satelliten *SeaStar*) vom *Goddard Space Flight Center*, einer Einrichtung der *NASA*, anhand der Oberflächen-Reflektion der Erde detaillierte Verteilungskarten der Chlorophyll-Konzentrationen der Ozeane und des Festlandes erstellt (Abb. 1-9).

Die Hauptaufgabe der Chlorophylle ist, im Gegensatz zu den meisten anderen pflanzlichen Pigmenten, nicht das Anlocken von Insekten zur Bestäubung durch ihr Farbenspiel, sondern das Wahrnehmen der beiden wichtigsten Aufgaben innerhalb des Photosyntheseapparates. Zum einen sammeln sie das auftreffende Sonnenlicht und leiten es zu den zentralen Einheiten des Photosyntheseapparates, den *Reaktionszentren*, weiter. Zum anderen sind sie an der *Ladungstrennung* innerhalb der Reaktionszentren beteiligt – also jenes Prozesses, der zur Ausbildung des zur Energiegewinnung verwendeten Protonen-Gradienten führt.

In den photosynthetischen Systemen bakterieller photoautotropher Organismen finden sich Bakteriochlorophylle, z. B. Bakteriochlorophyll *a*, das sich durch eine C7-C8-Einfachbindung und eine 3-Acetyl-Gruppe vom Chlorophyll *a* unterscheidet.

### 1.2.3.1 Tetrapyrrol-Biosynthese

Die Chlorophylle gehören zur Stoffgruppe der Tetrapyrrole, die aus vier über Methinbrücken verbundenen Pyrrolringen aufgebaut sind. Die in der Mitte dieses Mesomerie-stabilisierten Ringsystems befindlichen Stickstoffatome haben die Eigenschaft Metallionen zu binden, die auf Grund ihrer räumlichen Lage auch als Zentralmetalle bezeichnet werden.

Der Syntheseweg bis zum Tetrapyrrol-Grundkörper, dem Uroporphyrinogen III (Uro III) ist bei allen Tetrapyrrolen identisch, erst danach verzweigt sich dieser mehrfach und ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlichster Chromophore (Abb. 1-10; siehe auch Anhang A).

Die Eigenschaften der einzelnen Tetrapyrrole, und damit ihre Einsatzmöglichkeiten in der Natur, variieren stark in Abhängigkeit ihrer Zentralmetalle und Seitenketten, ihres Sättigungsgrades und zusätzlicher Modifikationen (z. B. weiterer Ringschlüsse) ihres Grundgerüsts. In allen Organismen sind die Tetrapyrrole in unmittelbarer Umgebung von Proteinen zu finden, die nicht nur durch direkte Wechselwirkungen (z. B. ionische Bindungen, WBB, Interaktionen mit den  $\pi$ -Elektronen des Ringes), sondern auch durch rein mechanische Kräfte die Eigenschaften der Pigmente beeinflussen können. So können z. B. Deformationen des eigentlich planaren Ringsystems zum Verlust der Konjugation führen.

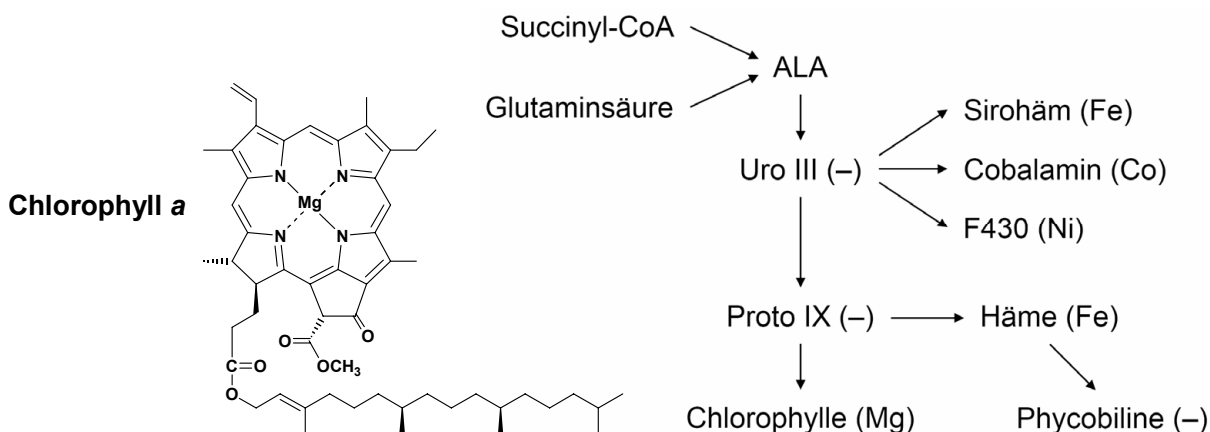


Abb. 1-10: Chemische Struktur von Chlorophyll *a* (links) und schematischer Überblick über die Verzweigungen des Tetrapyrrol-Biosyntheseweges (rechts) (siehe auch Anhang A). Die jeweiligen Zentralmetalle der einzelnen Verbindungen oder Verbindungsgruppen sind in Klammern angegeben.

### 1.2.3.2 Absorptionseigenschaften natürlicher Tetrapyrrole

Die Entstehung der wesentlichen Porphyrin-Absorptionsbanden im UV/VIS/NIR-Bereich wird durch das *Vier-Orbital-Modell* von Gouterman (Gouterman, 1961, Gouterman *et al.*, 1963) als Ein-Elektronenübergänge beschreiben. Alle vier möglichen Übergänge zwischen den beiden energiereichsten besetzten Orbitalen (*HOMOs*) und den beiden energieärmsten unbesetzten Orbitalen (*LUMOs*) sind hierbei erlaubt (graphische Darstellung dieser MOs: siehe Anhang B).

Dieses Orbital-Modell ist auch auf alle Chlorine und Bakteriochlorine anwendbar, die sich von den Porphyrinen lediglich durch eine geringere Sättigung des ringförmigen konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems unterscheiden (Scheer, 2006). Im Vergleich zu den entsprechenden Porphyrinen fehlt den Chlorinen die C17-C18-Doppelbindung ( $\Rightarrow$  17,18-Dihydroporphyrine), den Bakteriochlorinen zusätzlich zu dieser auch die C7-C8-Doppelbindung ( $\Rightarrow$  7,8,17,18-Tetrahydroporphyrine). Das Grundgerüst der Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine kann jedoch stets als überbrücktes (18)Annulen-Derivat beschrieben werden (Vogel, 1996). Auch bei den Chlorinen und Bakteriochlorinen sind alle vier Übergänge erlaubt.

Die Übergänge  $a_{1u} \rightarrow e_{gy}$  (*HOMO*  $\rightarrow$  *LUMO*+1) und  $a_{2u} \rightarrow e_{gx}$  (*HOMO*-1  $\rightarrow$  *LUMO*) sind dabei in Richtung der *x*-Achse, die Übergänge  $a_{2u} \rightarrow e_{gy}$  (*HOMO*-1  $\rightarrow$  *LUMO*+1) und  $a_{1u} \rightarrow e_{gx}$  (*HOMO*  $\rightarrow$  *LUMO*) in Richtung der *y*-Achse polarisiert. Die *x*-Achse entspricht der durch die Ringe B und D des Tetrapyrrols verlaufenden  $C_n$ -Hauptdrehachse, die durch die Ringe A und C verlaufende *y*-Achse steht senkrecht zu dieser.

Im Gegensatz zu den beiden entarteten LUMOs der Porphyrine besitzen diese beiden Orbitale bei Chlorinen und Bakteriochlorinen eine unterschiedliche Energie (Abb. 1-11). Bei den Chlorinen wird die  $e_{gy}$ -MO-Energie durch die wegfallende Doppelbindung erhöht. Dieser Effekt wird bei den Bakteriochlorinen durch das Fehlen der weiteren Doppelbindung verstärkt. Gleiches gilt auch für die  $a_{1u}$ -MO-Energie, wogegen das  $e_{gx}$ -MO und das  $a_{2u}$ -MO energetisch nicht beeinflusst werden, da diese beiden Orbitale an den C-Atomen der fehlenden Doppelbindung(en) keine Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für  $\pi$ -Elektronen aufweisen. Im Folgenden wird anhand des Bakteriochlorins die Entstehung der Absorptionsspektren erläutert.

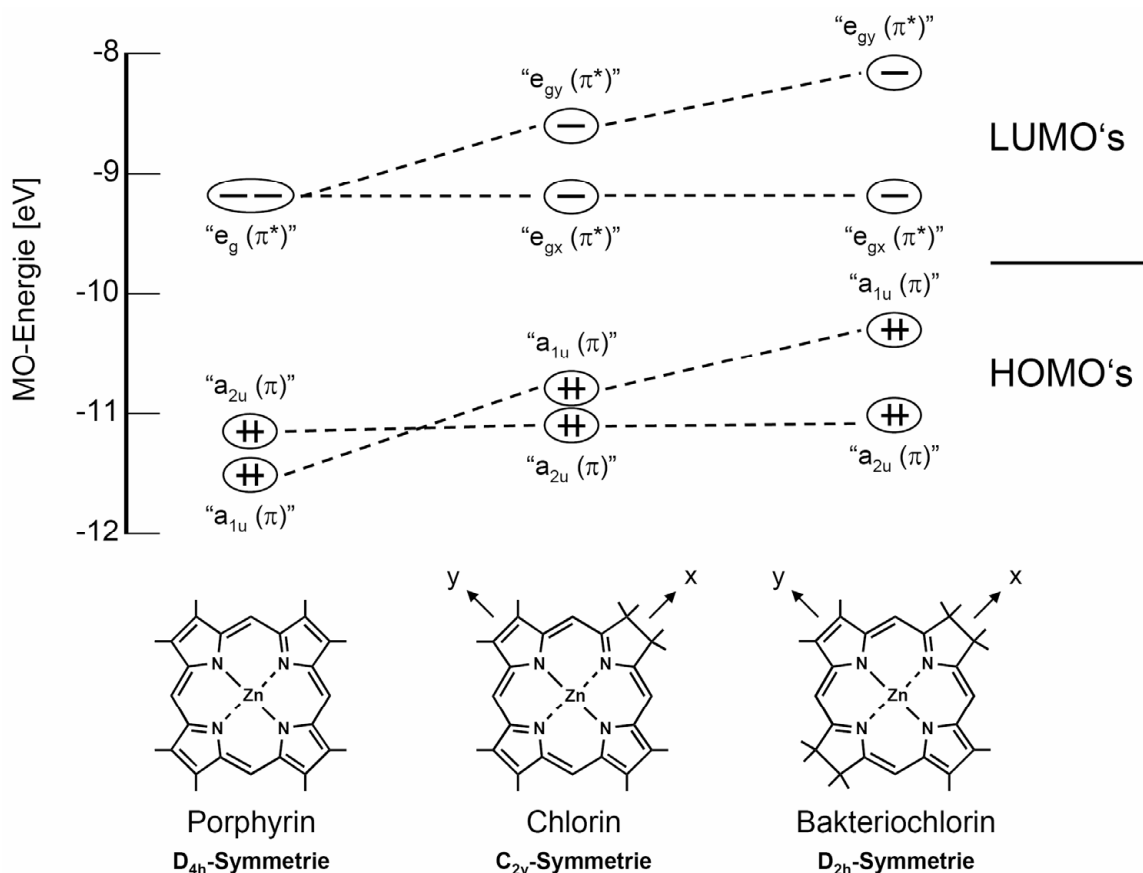


Abb. 1-11: Verschiebungen der Molekülorbital-Energien eines Tetrapyrrois in Abhängigkeit von der Sättigung des  $\pi$ -Elektronensystems am Beispiel der Zink-Derivate der drei Tetrapyrrol-Grundtypen Porphyrin, Chlorin, und Bakteriochlorin (nach Chang *et al.*, 1981). Aus Gründen besserer Vergleichbarkeit wurden die  $D_{4h}$ -Orbitalbezeichnungen auch bei den  $C_{2v}$ - und  $D_{2h}$ -Symmetrien verwendet.

Identisch polarisierte MO-Übergänge kombinieren konstruktiv oder destruktiv miteinander, wodurch im ersten Fall die beiden kurzwelligen *B-Banden*, im zweiten Fall die beiden langwelligen *Q-Banden* entstehen.

Der spektrale Bereich der B-Banden wird auch als *Soret-Bereich* bezeichnet, die B-Banden, wenn sie wie bei den Porphyrinen zu einer Bande zusammenfallen, als *Soret-Bande*.



Auf Grund dieser *Konfigurationswechselwirkung* besitzt das Absorptionsspektrum eines Bakteriochlorins vier Banden ( $B_y$ ,  $B_x$ ,  $Q_x$ ,  $Q_y$ ), deren Absorptionskoeffizienten und Wellenlängen aus den relativen Anteilen der beiden beteiligten MO-Übergänge bei dieser Excitation des Pigments resultieren (graphische Darstellung der Konfigurationswechselwirkung: siehe Anhang B). In der Reihe Porphyrin  $\rightarrow$  Chlorin  $\rightarrow$  Bakteriochlorin nimmt die Wellenlänge und Oszillatorstärke der  $Q_y$ -Bande zu (Abb. 1-12) (Chang *et al.*, 1981; Hanson, 1991), da die Energiedifferenz des HOMO-LUMO-Überganges verringert wird. Zugleich nimmt die Neigung zur Oxidation des Tetrapyrrol-Grundkörpers aufgrund der Destabilisierung des HOMOs in dieser Reihe deutlich zu (Chang *et al.*, 1981; Hanson, 1991).

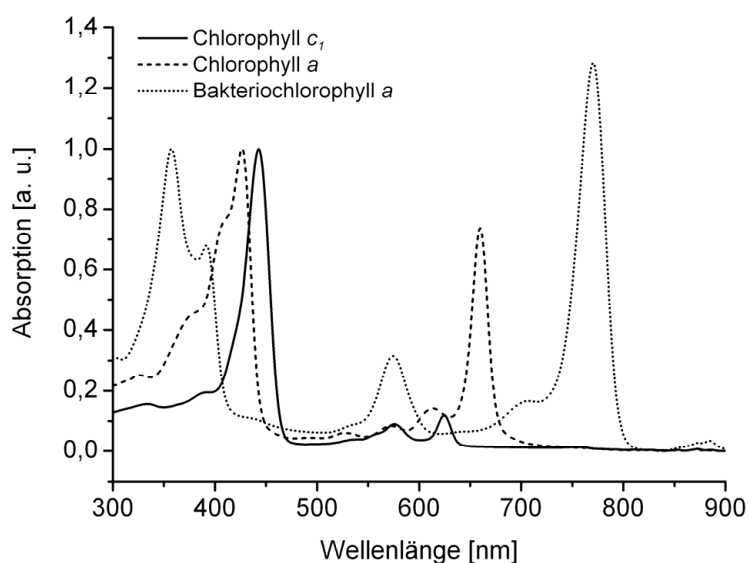


Abb. 1-12: Absorptionsspektren von Chlorophyll  $c_1$ , Chlorophyll  $a$  und Bakteriochlorophyll  $a$  in Diethylether, zur Veranschaulichung der Unterschiede eines typischen Porphyrin-, Chlorin-, und Bakteriochlorin-Absorptionsspektrums. Die Spektren wurden auf die stärkste B-Bande normiert.

Die genaue Lage der Absorptionsbanden eines Tetrapyrrols wird, außer von der Sättigung des  $\pi$ -Elektronensystems, von der Art des Zentralmetalls, den peripheren Seitenketten, evtl. vorhandenen zusätzlichen Ringen, wie auch von der Umgebung des Pigments so wesentlich beeinflusst, dass aus den Spektren z. T. detaillierte Aussagen über die physiko-chemische Umgebung des Moleküls gemacht werden können. So reagiert z. B. die  $Q_y$ -Bande sehr stark auf den Aggregationszustand der Pigment-Moleküle (Monomere  $\leftrightarrow$  Dimere  $\leftrightarrow$  Oligomere), sowie auf die Lösungsmittel-Polarität und -Protizität. Die  $Q_x$ -Bande wird dagegen bei einem Übergang von 5- zu 6-facher Koordination eines zentralen Mg-Atoms deutlich bathochrom verschoben (Evans und Katz, 1975; Callahan und Cotton, 1987).

Um die Feinstruktur insbesondere der kurzwelligen Banden erklären zu können, ist das Gouterman-Modell allerdings zu einfach (Baraldi, 1995).

### 1.2.3.3 Photobleichung von Tetrapyrrolen

*Photobleichung* bezeichnet den Farbverlust eines Pigments bei Belichtung, d. h. einen Rückgang an Absorption oder Emission (Braslavsky, 2007). Er ist meist irreversibel und geht mit chemischen Veränderungen des Chromophors einher (Bonnett *et al.*, 1999b). Bei der Photobleichung wird zwischen einer *Photomodifikation* und einer *echten Photobleichung* unterschieden. Während bei ersterer durch die Chromophor-Modifikation(en) lediglich die Pigmentfarbe verändert wird, entsteht bei letzterer eine Verbindung, welche im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums keine Absorption aufweist, und daher für das menschliche Auge farblos erscheint. Während der Belichtung eines Pigmentes gehen der echten Photobleichung oft Photomodifikationen voraus.

Die chemischen Veränderungen der Chromophore im Rahmen der PDT beruhen meist auf Oxidationen unter Beteiligung von ROS (z. B. Singulett-Sauerstoff) (Bonnett und Martínez, 2001). Bei diesen auch als *Photooxidationen* bezeichneten Reaktionen kommt es bei den Tetrapyrrolen sehr häufig zur Bildung von offenkettigen Tetrapyrrolen, den *Bilinen*, durch Spaltung einer der vier Methinbrücken. Des Weiteren finden sich unter den Oxidationsprodukten oft Tetrapyrrol-Derivate mit Sauerstoff-Funktionalitäten an den peripheren Vinylgruppen, was sich in einer deutlichen Erhöhung der Polarität dieser Pigmente äußert. Die meisten dieser Reaktionen sind durch die Anlagerung von aktiviertem Sauerstoff an Doppelbindungen mit nachfolgenden Umlagerungen erklärbar. Viele dieser Reaktionen ähneln den enzymatisch katalysierten Vorgängen des Häm- (Yoshida und Migita, 2000) und Chlorophyll-Abbaus (Kräutler und Hörtensteiner, 2006) (siehe Anhang C) in tierischen bzw. pflanzlichen Organismen, bei denen das Ringsystem ebenfalls an einer Methinbrücke gespalten wird. Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit werden beim Chlorophyll-Abbau mehrere Seitenketten mit Sauerstoff-Funktionalitäten (OH-Gruppen) versehen, beim Häm-Abbau wird dagegen die Polarität durch eine reversible Veresterung mit Glucuronsäure reguliert.

Neben der direkten Oxidation der Tetrapyrrole durch angeregten Sauerstoff sind in einer natürlichen Pigment-Umgebung auch indirekte Oxidationen möglich. Dabei werden zunächst durch Reaktionen von ROS mit Biomolekülen Peroxide gebildet, welche dann ihrerseits die ROS-erzeugenden Pigmente bleichen können. Bei Zugabe geeigneter Verbindungen kann deshalb eine erhöhte Photobleichung beobachtet werden (Krieg und Whitten, 1984a; Krieg und Whitten, 1984b).

Sind dagegen reduzierende Stoffe zugegen, so kann es auch zu *Photoreduktionen* kommen (Krasnovskii, 1948). Häufig wurde dieser Effekt durch Zugabe von Ascorbinsäure erreicht, deren L(+)-Stereoisomer und einige von dessen Derivaten unter der Bezeichnung *Vitamin C* zusammengefasst werden.

Sehr häufig werden durch Belichtung chemische Bindungen in den Pigmenten gebrochen (Abb. 1-13). So kann mitunter eine Spaltung der Tetrapyrrol-Ringstruktur beobachtet werden, bei der das Zentralmetall die Position der Ringöffnung bestimmt (Iturraspe und Gossauer, 1991): Mit Zink als Zentralatom erfolgt die Ringöffnung zwischen C19 und C20, mit Cadmium zwischen C4 und C5. Mitunter kommt es sogar zu einer praktisch vollständigen Zerlegung des Pigments bis hin zu niedermolekularen organischen Molekülen (Llewellyn *et al.*, 1990).

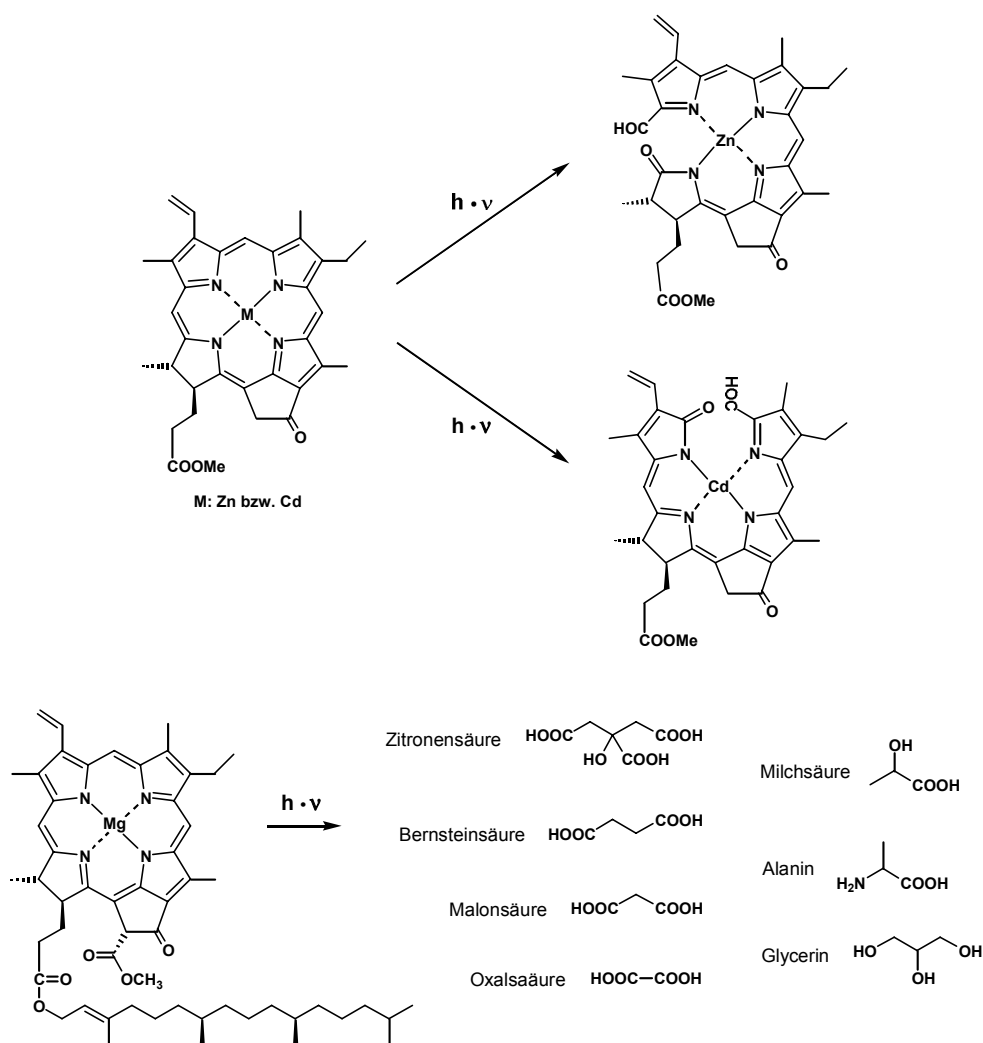


Abb. 1-13: Chemische Strukturen der Produkte ausgewählte Photooxidationen bei Tetrapyrrolen des Chlorin-Typs: Zn- und Cd-Komplex des C17<sup>3</sup>-Methylesters von Pyropheophorbid *a* (Iturraspe und Gossauer, 1991) (oben), sowie Chlorophyll *a* (Llewellyn *et al.*, 1990) (unten).

Die Produkte der Photooxidationen sind bei allen Tetrapyrrolen nicht nur von der chemischen Struktur des Ausgangspigments abhängig, sondern auch in hohem Maße von den exakten Reaktionsbedingungen (z. B. Polarität des Lösungsmittels, Sauerstoff-Konzentration, etc.) (Fiedor *et al.*, 2001; Fiedor *et al.* 2002; Limantara *et al.*, 2006).

### 1.3 Lipoproteine des Blutplasmas

Es existieren zwei grundsätzlich unterschiedliche Gruppen von Lipoproteinen, die nach der Art der Bindung der Lipide unterschieden werden. Zur ersten Gruppe gehören die peripheren Membranproteine, die enzymatisch katalysiert während oder nach der Translation kovalent mit Fettsäuren, Isoprenoiden, oder anderen hydrophoben Resten verknüpft werden, mittels derer sie auf Membran-Oberflächen befestigt werden können. Zur zweiten Gruppe gehören die Lipoproteine des Blutplasmas, Mizellen-ähnliche Strukturen mit äußerst variabler Größe und Zusammensetzung, in denen die Proteine und Lipide ausschließlich über nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten werden.

Da Plasmalipoproteine als Transportvehikel für sämtliche hydrophobe Substanzen im Blut eingesetzt werden, sind sie vor allem bei einer systemischen PDT von großer Bedeutung.

#### 1.3.1 Struktur und Bestandteile der Plasmalipoproteine

Die Plasmalipoproteine bestehen aus einem lipophilen Kern, der von einer etwa 2 nm dicken amphiphilen Hülle umgeben ist (Abb. 1-14). Die hydrophilen Gruppen der die Hülle bildenden Moleküle sind dabei zur wässrigen Umgebung hin ausgerichtet, wodurch das Lipoprotein löslich bleibt (⇒ Mikroemulsion). Der Kern besteht aus Triacylglycerinen und Cholesterinestern, die Hülle aus Phospholipiden, Cholesterin und verschiedenen Apolipoproteinen.

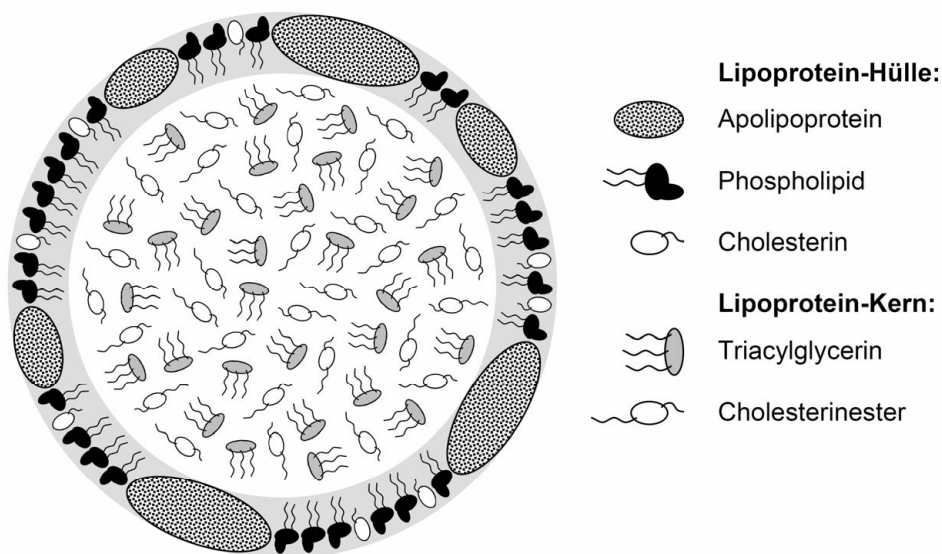


Abb. 1-14: Schematische Struktur eines Plasmalipoproteins: Eine amphiphile Hülle (hellgrau hinterlegt) umgibt einen lipophilen Kern (weiß hinterlegt). Neben den dargestellten fünf Hauptkomponenten enthalten diese Lipoprotein-Komplexe viele weitere Substanzen in geringeren Konzentrationen.

In den ersten Arbeiten zur Klassifizierung von Plasmalipoproteinen nach ihrer Dichte erfolgte eine Einteilung in drei Klassen (Havel *et al.*, 1955): VLDL ( $\rho < 1,019 \text{ kg/l}$ ), LDL ( $1,019 \text{ kg/l} < \rho < 1,063 \text{ kg/l}$ ), und HDL ( $1,063 \text{ kg/l} < \rho < 1,21 \text{ kg/l}$ ). Mittlerweile werden jedoch z. T. bis zu neun Klassen von Lipoproteinen im Blutplasma unterschieden (Tab. 1-2).

Tab. 1-2: Eigenschaften der Lipoproteine des Blutplasmas (Kostner und März, 2001).

Lipoprotein	Größe [nm]	Dichte [kg/l]	Masse [MDa]	Konzentration [g/l]	
				Männer	Frauen
CM	$<10^4$	$<1,0$	$>150$	$<0,1$	$<0,1$
VLDL	50	$<1,005$	5 – 130	0,5 – 2,0	0,5 – 1,5
IDL	30	$<1,019$	3,5	-	-
LDL	21	$<1,063$	2,5	2,0 – 3,5	2,0 – 3,0
Lp(a)	25	$<1,09$	5,5	0,01 – 0,5	0,01 – 0,5
HDL <sub>E</sub>	12	$<1,125$	0,5	$<0,05$	$<0,05$
HDL <sub>2</sub>	10	$<1,125$	0,36	0,5 – 1,0	1,0 – 1,5
HDL <sub>3</sub>	8	$<1,21$	0,2	1,0 – 2,0	1,0 – 2,0
VHDL	7	$<1,25$	0,15	0,1 – 0,2	0,1 – 0,2

Elektrophoretisch können nur die drei Hauptklassen der Lipoproteine getrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit in einer Gelmatrix nimmt dabei in Reihe LDL → VLDL → HDL zu. Die zugehörigen Banden werden oft als  $\beta$  (LDL), Prä- $\beta$  (VLDL) und  $\alpha$  (HDL) bezeichnet.

Die diversen Apolipoproteine werden benötigt zur Sezernierung der Plasmalipoproteine und ihrer Vorstufen aus den Zellen, zur Stabilisierung der Lipidemulsion, zur Aktivierung von fettabbauenden sowie fettaustauschenden Enzymen, zur rezeptorvermittelten Lipoprotein-Erkennung, und zur Endozytose in die Zellen des Zielgewebes.

Eine Sonderstellung nimmt das *Lipoprotein(a)* (*Lp(a)*) ein, dessen physiologische Funktion noch nicht geklärt ist. Das namensgebende *Apolipoprotein(a)*, das über eine Disulfidbrücke an das Apolipoprotein B-100 gebunden ist, tritt in sechs Isoformen mit genetisch determinierter Größe auf. Ein Mensch kann daher ein oder zwei Isoformen des *Lp(a)* besitzen.

Jede der Plasmalipoprotein-Klassen besitzt eine charakteristische chemische Zusammensetzung (Tab. 1-3) und Proteinausstattung (Tab. 1-4).

Tab. 1-3: Chemische Zusammensetzung der Lipoproteine des Blutplasmas (in % der Lipoproteinmasse; PL: Phospholipide; FC: freies Cholesterin; CE: Cholesterinester; TG: Triacylglycerine) (Kostner und März, 2001).

Lipoprotein	Protein	PL	FC	CE	TG
CM	2	5	1	2	90
VLDL	10	16	7	13	54
IDL	17	20	9	34	20
LDL	23	21	11	41	4
Lp(a)	34	18	9	36	3
HDL <sub>E</sub>	35	34	10	20	1
HDL <sub>2</sub>	42	35	5	13	5
HDL <sub>3</sub>	56	23	3	15	3
VHDL	72	20	2	5	1

Tab. 1-4: Apolipoproteine der Lipoproteine des Blutplasmas (Kostner und März, 2001).

Apolipoprotein	Lipoprotein	Masse [kDa]	Konzentration [mg/l]
A-I	CM, HDL	28,5	1200 – 1400
A-II	HDL	17	350 – 500
A-IV	CM, HDL	46	<50
B-100	VLDL, LDL	550	700 – 900
B-48	CM	265	<50
C-I	CM, VLDL	6,5	50 – 80
C-II	CM, VLDL	8,8	30 – 70
C-III	CM, VLDL	8,9	100 – 120
D (A-III)	HDL <sub>3</sub>	29	80 – 100
E	CM, VLDL, HDL <sub>E</sub>	34	30 – 50
F	HDL	30	<50
G	VLDL	72	<50
H	CM	55	150 – 300
J	HDL <sub>2</sub> , HDL <sub>3</sub>	70	70 – 200
(a)	Lp(a)	350 – 900	variabel

### 1.3.2 Stoffwechsel der Plasmalipoproteine

Die physiologische Aufgabe der Plasmalipoproteine ist der zielgerichtete Transport von wasserunlöslichen bzw. -schwerlöslichen Substanzen. Während die Phospholipide, vor allem Phosphatidylcholine (Lecithine) und Sphingomyeline, die in allen Organen gebildet werden, lediglich als Emulgatoren fungieren, dienen die Triglyceride der Energieversorgung der Zielgewebe. Das Cholesterin ist die metabolische Vorstufe der sechs humanen Steroidhormone (Progesteron, Aldosteron, Cortisol, Testosteron, Östradiol, Calcitriol) und der vier Gallensäuren (primäre: Chol- und Chenodesoxycholsäure; sekundäre: Desoxychol- und Lithocholsäure), aber auch ein wichtiger Baustein von Zellmembranen. Die Transportform des Cholesterins sind die Cholesterinester. Ebenfalls transportieren die Lipoproteine die fettlöslichen Vitamine A (Retinol), D (Calcidiol), E (Tocopherol), und K (Phyllochinon). Freie Fettsäuren sind dagegen meist an Serumalbumin gebunden, das sechs Bindungsstellen für langkettige Fettsäuren pro Molekül besitzt.

Der Stoffwechsel der Plasmalipoproteine (Abb. 1-15) lässt sich in drei Hauptwege einteilen. Neben den beiden Transportwegen für Nahrungslipide (exogene Lipide) und körpereigene Lipide (endogene Lipide) zu den Geweben, existiert auch ein Weg für den Rücktransport von Cholesterin aus den Geweben.

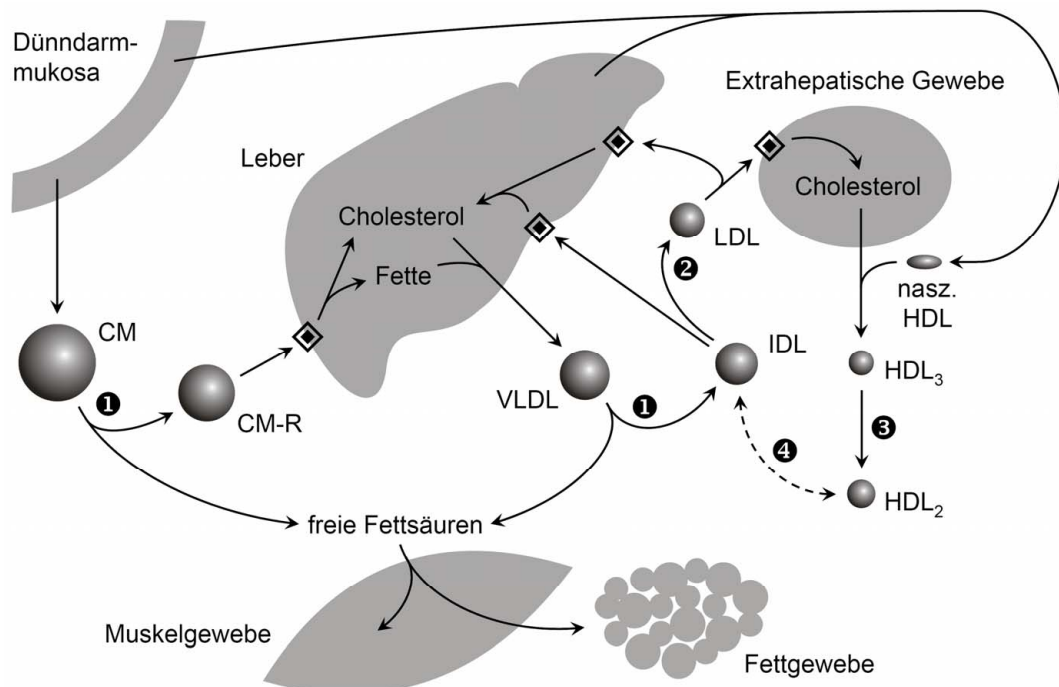


Abb. 1-15: Stoffwechsel der Plasmalipoproteine (Hauptwege). ❶ Lipoprotein-Lipase (LPL); ❷ Hepatische Triglycerid-Lipase (HTGL); ❸ Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT); ❹ Cholesterinester-Transferprotein (CETP); ♦ Rezeptor-vermittelte Endozytose (mod. nach Koolman und Röhm, 1998).

### 1.3.2.1 Transport exogener Lipide zu den Geweben

In Darmlumen werden die emulgierten Triacylglycerine der Nahrung von der Triacylglycerol-Lipase (Pankreas-Lipase), die bevorzugt die Fettsäuren an den Positionen 1 und 3 angreift, durch doppelte Deacylierung zu 2-Monoacylglycerinen (ca. 80%), und zu durch dreifache Deacylierung zu Glycerin (ca. 20%) abgebaut. Alle Produkte der Spaltung werden durch passive Diffusion in die Darmepithelzellen resorbiert. Das Glycerin und die kurzkettigen Fettsäuren (Kettenlänge <12 C-Atome) gelangen über die Pfortader direkt in die Leber. Aus den 2-Monoacylglycerinen und je zwei langkettigen Fettsäuren werden in den Darmepithelzellen neue Triacylglycerine synthetisiert. Für die durch die Acylglycerin-Palmitoyltransferase und die Diacylglycerin-Acyltransferase katalysierten schrittweisen Veresterungen müssen die Fettsäuren zunächst durch die Fettsäure-CoA-Ligase mit Coenzym A aktiviert werden.

In der Dünndarmwand werden die *Chylomikronen (CM)* gebildet, die fast ausschließlich aus den dort synthetisierten Triacylglycerinen bestehen. Des Weiteren enthalten sie das Cholesterin (meist in seiner veresterten Form) und die fettlöslichen Vitamine aus der Nahrung. Die Chylomikronen gelangen über die Lymphe und den *Ductus thoracicus* in den Blutkreislauf, wo sie von den *Lipoproteinen hoher Dichte (HDL)* u. a. das Apolipoprotein C-II aufnehmen. Durch die Aktivierung der *Lipoprotein-Lipase (LPL)* durch das Apolipoprotein C-II werden die Triacylglycerine wieder in 2-Monoacylglycerine und freie Fettsäuren gespalten. Alle Spaltprodukte werden von den Chylomikronen freigesetzt, und können so vom Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden, in deren Endothelien die Lipoprotein-Lipase überwiegend lokalisiert ist. Aus den Chylomikronen werden bei diesem Prozess die *Chylomikronen-Reste (CM-R)*, die durch das ebenfalls von den HDL übertragene Apolipoprotein E durch eine Rezeptor-vermittelte Erkennung in die Leber aufgenommen werden können.

### 1.3.2.2 Transport endogener Lipide zu den Geweben

In der Leber entstehen die *Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL)*, die in den Blutstrom abgegeben werden. Sie sind für den Transport von Triacylglycerinen, Phospholipiden, Cholesterin und Cholesterinestern zu den extrahepatischen Geweben verantwortlich. Wie die Chylomikronen nehmen auch die VLDL aus den HDL u. a. die Apolipoproteine C-II und E auf. Durch die Aktivierung der Lipoprotein-Lipase durch das Apolipoprotein C-II setzen auch die VLDL Spaltprodukte von Triacylglycerinen frei. Dadurch werden sie zu *Lipoproteinen intermediärer Dichte (IDL)* abgebaut, von denen in etwa die Hälfte durch die *hepatische Triglycerid-Lipase (HTGL)* in *Lipoproteine geringer Dichte (LDL)* umgewandelt wird.



Bei sehr niedrigen Triacylglycerin-Vorräten können von der Leber auch direkt IDL oder sogar LDL gebildet werden. Dieser Weg ist vor allem im Hungerzustand von Bedeutung, wenn der Energiebedarf der Gewebe nicht mehr durch die Fracht der Chylomikronen gedeckt werden kann. Bereits die IDL können durch das Apolipoprotein E, sowie durch das Apolipoprotein B-100 durch Rezeptor-vermittelte Erkennung in die Leber aufgenommen werden. Etwa zwei Drittel der LDL werden durch das Apolipoprotein B-100 durch eine Rezeptor-vermittelte Erkennung in nahezu alle Gewebe, darunter auch wieder die Leber, aufgenommen. Die LDL versorgen die Zellen vor allem mit Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen. Das übrige Drittel der LDL wird über den *Scavenger pathway* in Makrophagen eingeschleust, in denen das aufgenommene Cholesterin verestert und in Vakuolen deponiert wird. Im Gegensatz zu den LDL-Rezeptoren der Gewebe, von denen bei einer ausreichenden Cholesterin-Konzentration in der Zelle nur eine geringe Menge an der Zelloberfläche präsentiert werden, bleibt die Anzahl der *Scavenger-Rezeptoren* auf den Makrophagen stets konstant. Dadurch wird eine nahezu unbegrenzte Aufnahme von Cholesterinestern, der Speicherform von Cholesterin, in die Makrophagen ermöglicht. Vor allem durch Oxidation oder Acetylierung modifizierte LDL werden auf diese Weise dem Blutstrom entzogen.

### 1.3.2.3 Rücktransport von Cholesterin aus den Geweben

Da die Leber das einzige Organ ist, das Cholesterin direkt oder in Form von Gallensäuren ausscheiden kann, muss sämtliches Cholesterin aus den Geweben dorthin zurücktransportiert werden. Jedoch werden bei diesem Rücktransport ( $\Rightarrow$  *reverser Cholesterintransport*) die HDL nicht von den extrahepatischen Geweben selbst produziert. In der Leber und im Darm entstehen *naszierende HDL*, deren zunächst diskoidale (scheibchenförmige) Struktur erst mit der Aufnahme von Cholesterinestern kugelförmig wird. Dabei wird zunächst Cholesterin auf die naszierenden HDL übertragen, wodurch diese langsam zu HDL<sub>3</sub> werden. Diese Unterklasse der HDL kann jedoch weiter Cholesterin aufnehmen. Erst durch die Einwirkung der *Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT)* wird das Cholesterin durch die Übertragung von Fettsäuren in Cholesterinester umgewandelt, wobei die HDL<sub>3</sub> zu HDL<sub>2</sub> werden. Die HDL<sub>2</sub> können die Cholesterinester mittels des *Cholesterinester-Transferproteins (CETP)* auf alle Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteine übertragen, und erhalten im direkten Gegenzug Triacylglycerine.

Die als HDL<sub>E</sub> bezeichnete Variante der HDL kann über das Apolipoprotein E von der Leber erkannt und aufgenommen werden. Überschüssiges Cholesterin kann so direkt oder nach Abbau zu Gallensäuren mit der Galle ausgeschieden werden.

## 1.4 Aufgabenstellung

Bei der systemischen photodynamischen Krebstherapie werden die Photosensibilisatoren in die Blutbahn injiziert. Es wurden bisher nur sehr wenige Daten bezüglich deren Interaktionen mit Blutbestandteilen veröffentlicht, obwohl diese für die Optimierung der PDT-Effizienz, der Anwendungsprotokolle, und die gezielte Synthese wirkungsvollerer Photosensibilisatoren von großer Bedeutung sein sollten.

In den letzten Jahren wurden aufgrund ihrer vorteilhaften Absorption im NIR immer mehr Photosensibilisatoren des Bakteriochlorin-Typs auf ihre Verwendbarkeit im Rahmen der PDT getestet. Zwei der in diesem Zusammenhang sehr Erfolg versprechenden Pigmente sind WST09 (Pd-BPheid a) und WST11, an deren Entwicklung unser Labor z. T. beteiligt war. Während die PDT-Effizienz dieser Farbstoffe bereits gut charakterisiert wurde, existieren kaum Daten über deren Photostabilität in Blutplasma.

Auch über die Abbauprodukte der Chlorophyll-basierten Photosensibilisatoren, die stets bei Belichtung entstehen, ist relativ wenig bekannt. Gleiches gilt für die Oxidationsprodukte der Blutbestandteile, die im Rahmen der photosensibilisierten Reaktion entstehen können. Da diese sowohl toxisch, wie auch Initiatoren unerwünschter Nebenwirkungen sein könnten, ist deren Charakterisierung für eine umfassende Pharmakologie dringend notwendig.

Es standen daher folgende Ziele im Vordergrund dieser Arbeit:

- ◆ Etablierung von Methoden zur Fraktionierung von humanem Blut bzw. Blutplasma.
- ◆ Studien zur Pigmentverteilung von Photosensibilisatoren auf die Bestandteile humanen Blutplasmas, inklusive einer umfangreichen Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen.
- ◆ Untersuchungen zur Photostabilität von Photosensibilisatoren in einem dem *in vivo* Zustand (im Rahmen der PDT) möglichst ähnlichen Milieu.
- ◆ Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von Photosensibilisatoren.
- ◆ Identifizierung und Quantifizierung photoinduzierter Modifikationen an den Photosensibilisatoren und Blutplasma-Bestandteilen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, unter Grünlicht ( $<1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Abb. 2-1) und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Alle wässrigen Lösungen, sowie alle organischen Lösungsmittel wurden mit Argon begast, um die Pigmentoxidation durch eine reduzierte Sauerstoff-Konzentration zu minimieren.

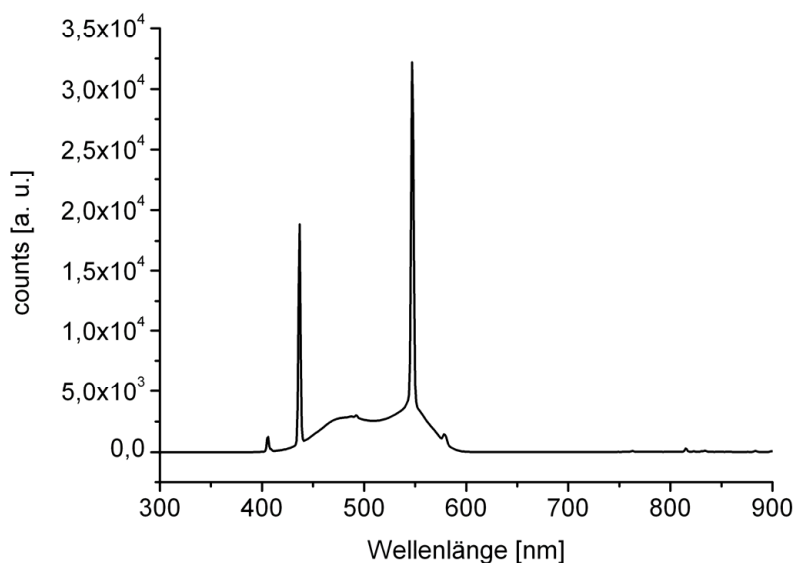


Abb. 2-1: Emissionsspektrum der mit Grünfiltern versehenen Neonröhren zur Laborbeleuchtung.

#### 2.1.1 Geräte

##### Ultrazentrifuge

*Sorvall® Discovery 90* (Thermo Scientific, Langenselbold)

Rotoren: - *Type 70 Ti* (8 × 39 ml; Fixed-Angle Rotor) (Beckman, Palo Alto, USA)

- *VTi 80* (8 × 5,1 ml; Vertical-Tube Rotor) (Beckman, Palo Alto, USA)

##### Tischzentrifugen

- *3K18 C centrifuge* mit *12155-H rotor* (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz)

- *Universal 2S* (Andreas Hettich, Tuttlingen)

- *Heraeus® Biofuge® fresco™ microcentrifuge* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

- *Qualitron DW-41 microcentrifuge* (Chiron Scientific, Sylvania, USA)

Weitere Geräte und deren Hersteller werden bei den entsprechenden Methoden genannt.

### 2.1.2 Software

Die Auswertung aller Absorptions- und Fluoreszenzspektren erfolgte mit *Spectralys 1.82* (J&M, Aalen), basierend auf *Spectacle* (LabControl, Köln). Für die weiteren Auswertungen wurde *Microsoft® Office Excel 2003* (Microsoft, Redmond) verwendet. Die Darstellung aller Spektren (inkl. EDX- und Massenspektren) erfolgte mit *Origin 7.0* (OriginLab, Northampton, USA). Die Bilddaten aller eingescannten Gele und HPTLC-Platten wurden mit *Adobe® Photoshop® CS* (Adobe Systems, San Jose, USA) bearbeitet.

Diese Arbeit wurde mit *Microsoft® Office Word 2003* (Microsoft, Redmond) geschrieben. Schematische Abbildungen in dieser Arbeit wurden mit *CoreIDRAW Graphics Suite 12* (Corel, Ottawa), sowie *Microsoft® Office Powerpoint® 2003* (Microsoft, Redmond) erstellt. Alle chemischen Strukturen wurden mit *CS ChemDraw Pro 4.5* (CambridgeSoft, Cambridge, USA) gezeichnet.

Zur Suche von wissenschaftlichen Veröffentlichungen wurden *SciFinder® Scholar™ 2006* (American Chemical Society, Washington DC) und die im Internet unter der Web-Adresse <http://www.pubmed.gov> erreichbare Suchmaschine *PubMed* (U. S. National Library of Medicine, Bethesda, USA) verwendet. Als Datenbank für alle Veröffentlichungen diente das Bibliografieprogramm *ProCite 5.0.3* (Thompson ResearchSoft, Stamford, USA).

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### Feststoffe

Alle verwendeten Chemikalien waren mindestens von analysenreiner Qualität, und wurden wenn nicht anders angegeben von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), oder Merck (Darmstadt) bezogen. Zum Unternehmen Sigma-Aldrich gehören u. a. auch die beiden Marken Fluka und Riedel de-Haën.

#### Flüssigkeiten

Diethylether (DE) wurde mittels *Alumina B – Super I* (ICN Biomedicals, Eschwege) absolutiert. Pro dazu verwendeter Säule ( $\varnothing_{\text{innen}}$ : ~25 mm; Länge: ~100 mm) wurden ~500 ml DE aufgereinigt. Jeweils die ersten ~100 ml des Durchlaufes wurden stets erneut über die Säule gegeben, da sie Verunreinigungen enthalten können. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln über Molekularsieb (Perform, Porengröße 4Å).

Alle übrigen Lösungsmittel und alle Säuren waren mindestens von analysenreiner Qualität. Alle wässrigen Lösungen wurden mit doppelt demineralisiertem Wasser angesetzt.

### Blutplasma

Ueingefrorenes humanes Blutplasma (für Forschungszwecke) wurde erworben beim Bayerischen Roten Kreuz (München), und durchgehend bei 4 °C gelagert (max. 4 Wochen).

### Reaktionsgefäße

Als Reaktionsgefäße für Volumina bis 2 ml wurden *Safe-Lock Eppendorf Tubes* (Eppendorf, Hamburg), als Reaktionsgefäße für Volumina über 2 ml PP-Schraubverschluss-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in verschiedenen Größen verwendet.

## 2.2 Spektroskopische Methoden

### 2.2.1 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren wässriger Proben außerhalb des UV-Bereichs, d. h. >330 nm wurden mittels Plastik-Küvetten aus Polystyrol (Sarstedt, Nümbrecht) gemessen. Bei einem Probenvolumen >1,5 ml (max. 3 ml) wurden Makro-Küvetten (10 × 10 × 45 mm; 10 mm Lichtweg) verwendet, bei einem Probenvolumen <1,5 ml Halb-Mikro-Küvetten (10 × 4 × 45 mm; 10 mm Lichtweg). Für Absorptionsmessungen im UV-Bereich (<330 nm) wurden verschiedene Küvetten aus *SUPRASIL*<sup>®</sup> Quarzglas verwendet (Hellma, Müllheim), die Schichtdicken von 10 oder 1 mm aufwiesen. Bei einem Probenvolumen <500 µl wurden Ultra-Mikro-Küvetten (*Produkt-Nr. 105.202*; Hellma, Müllheim) verwendet, die bis zu einem Volumen von 50 µl verwendet werden können. Des Weiteren wurden alle Messungen mit organischen Lösungsmitteln in Quarz-Küvetten durchgeführt, da diese Lösungsmittel Polystyrol trüben.

Zur Aufnahme von UV/VIS/NIR-Absorptionsspektren wurden folgende zwei Spektrometer verwendet:

- *UV 2401 PC Spektrometer* (Shimadzu, Duisburg)
  - Software: *Hyper UV 1.5* (Shimadzu, Duisburg)  
[basierend auf *Spectacle* (LabControl, Köln)]
  
- *V-530 Spektrometer* (Jasco, Groß-Umstadt)
  - Software: *Spectra Manager 1.54.03* (Jasco, Groß-Umstadt)

Zur Messung von trüben bzw. stark streuenden Proben wurde das *UV 2401 PC Spektrometer* mit einer Ulbricht-Kugel des Typs *ISR 240-A Integrating Sphere Assembly* (Shimadzu, Duisburg) aufgestattet.

### 2.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit einem *Spex Fluorolog 212 Spektrofluorometer* (HORIBA Jobin Yvon, München) aufgenommen. Zum verwendeten System gehörten eine *SVX/LAX 1450* Lampe (Müller Elektronik - Optik, Moosinning), und ein *R 374 E Photomultiplier* (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City). Als Software fand das von Dr. A. Pazur (Botanisches Institut der LMU München) geschriebene Programm *Quantus* Anwendung.

### 2.2.3 Massenspektroskopie

Massenspektren wurden (teilweise von Dr. B. Müller, Botanisches Institut der LMU München) an einem *LTQ Orbitrap Massenspektrometer* (Thermo Electron, Dreieich) aufgenommen. Die hierbei verwendete Software *Xcalibur<sup>®</sup> 2.0 SR2* (Thermo Electron, Dreieich) diente ebenfalls zur qualitativen Auswertung der gemessenen Spektren. Die chemischen Strukturen von Fragment-Ionen wurden mit der Software *Mass Frontier<sup>™</sup> 5.01.20* (HighChem, Bratislava, Slowakei) berechnet. Monoisotopische Molekularmassen von Verbindungen wurden mit der kostenlos erhältlichen Software *ChemSketch 10.02* (ACD/Labs, Toronto, Kanada) ermittelt. Die zugehörigen Isotopenverteilungen wurden entweder mit der *Xcalibur<sup>®</sup>*-Software, oder mit dem Programm *Sheffield ChemPuter – Isotope Patterns calculator* ermittelt, das im Internet unter der Web-Adresse <http://winter.group.shef.ac.uk/chemputer/isotopes.html> erreichbar ist.

Die Proben wurden unabhängig vom vorliegenden Lösungsmittel jeweils 9:1 mit 1%-iger (v/v) Ameisensäure in Methanol versetzt ( $\Rightarrow$  Ameisensäure-Endkonzentration: 0,1% (v/v)).

### 2.2.4 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

EDX-Spektren wurden (überwiegend von Prof. Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der LMU München) an einem *S-4100 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop* (Hitachi Koki, Tokyo) mit einem *440A-1SPS Vantage EDX-System* (Noran Instruments, Middleton, USA) aufgenommen.

Als Objektträger wurden kleine Plättchen aus *Sigradur*<sup>®</sup>-Glaskohlenstoff (HTW, Thierhaupten) verwendet, auf die jeweils ~1 µl der Probe aufgetropft wurde. Nach vollständiger Trocknung der Probe im Argonstrom wurden die Plättchen mit Kohle bedampft.

## 2.3 Isolierung und Modifizierung der verwendeten Pigmente

Bei der Aufreinigung der Pigmente wurde nicht nach C13<sup>2</sup>-Epimeren unterschieden, da diese weder über präparative TLC, noch über präparative HPLC ausreichend getrennt werden konnten. Das (*R*)-Epimer wird auch als *a*-Form, das (*S*)-Epimer als *a'*-Form bezeichnet. Zudem ist eine Auftrennung grundsätzlich unsinnig, da sich die Epimere in Lösung rasch ineinander umwandeln. Die *a*-Form stellt den überwiegenden Anteil dar, das entstehende Gleichgewicht hängt jedoch stark vom Lösungsmittel ab (Katz *et al.*, 1968; Hynninen und Lötjönen, 1985; Watanabe *et al.*, 1987; Mazaki und Watanabe, 1990; Mazaki *et al.*, 1992).

### 2.3.1 Standardreaktionsbedingungen

Alle Reaktionen wurden bei Grünlicht (siehe Abb. 2-1) und unter Schutzgasatmosphäre (Argon) durchgeführt, wobei der Reaktionsverlauf stets absorptionsspektroskopisch verfolgt wurde. Die absorptionsspektroskopisch bestimmte Ausbeute lagen bei allen Synthesen bei ca. 70–80% (falls nicht anders angegeben), wobei bei unbekanntem Extinktionskoeffizienten der Pheophorbide die der entsprechenden Pheophytine verwendet wurden.

### 2.3.2 Standardaufarbeitung

Der Reaktionsansatz wurde nach der Umsetzung in einen Scheidetrichter überführt, und mit gleichen Volumina Wasser und Ethylacetat bzw. Diethylether versetzt, je nachdem, ob freie Säuren oder deren Ester aufgearbeitet wurden. Die organische Phase wurde zwei bis drei Mal mit Wasser gewaschen, anschließend wurde das Wasser abgelassen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Eventuell vorhandene Restmengen an Wasser wurden durch azeotrope Trocknung mit Aceton/Toluol (~1:3 (v/v)) entfernt. Die Aufreinigung der synthetisierten Pigmente erfolgte mittels präparativer Dünnschicht-Chromatographie (TLC). Pro verwendete Kieselgelplatte können ~200 OD·ml<sub>Ether</sub> Pigment aufgetragen werden. Die Entwicklung der Platten erfolgte mit entgastem und mit Argon gesättigten Laufmitteln (Zusammensetzung siehe folgende Kapitel), sowie unter Schutzgasatmosphäre (Argon).

#### Herstellung der Kieselgelplatten für die präparative TLC:

Es wurden 300 g *Kieselgel 60 H* (Merck, Darmstadt) und 9 g Natriumascorbat mit 1 l Wasser zu einer homogenen Masse verrührt. Nach einstündigem Quellen wurde das Kieselgel durch ein Sieb gestrichen und mittels eines Schlittens auf 20 × 20 cm große Glasplatten in einer Schichtdicke von 0,75 mm aufgetragen. Die etwa 25 Platten wurden mindestens 24 Stunden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Zusammensetzung des Laufmittels wird bei jeder Pigmentsynthese angegeben (in v/v). Nach der Entwicklung wurde mittels eines Spatels die gewünschte Pigment-Kieselgelbande von der Glasplatte abgekratzt und in Aceton aufgenommen. Da sich Natriumascorbat und Kieselgel zu einem geringen Prozentsatz in Aceton lösen, wurde mit der Suspension in gleicher Weise wie mit dem unaufgereinigten Reaktionsansatz verfahren (siehe oben). Alternativ kann die Suspension über ein doppeltes Faltenfilter filtriert werden. Das Filtrat wurde ebenfalls am Rotationsverdampfer durch Codestillation mit Aceton/Toluol (~1:3, (v/v)) getrocknet. Die Pigmente wurden lichtgeschützt in getrocknetem Zustand unter Schutzgasatmosphäre (Argon) bei -20 °C aufbewahrt.

Alle verwendeten Pigmente wurden vor Gebrauch stets absorptionsspektroskopisch oder durch analytische Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) auf Oxidationsprodukte und Entmetallierung überprüft. Dabei fanden zwei Systeme Verwendung:

- stationäre Phase: *C-18-reversed-phase* HPTLC-Platten, 10 × 10 cm (Merck, Darmstadt)  
(Hauptbestandteil der mobilen Phase: Methanol)
- stationäre Phase: *Kieselgel-60* HPTLC-Platten, 10 × 10 cm (Merck, Darmstadt)  
(Hauptbestandteil der mobilen Phase: Toluol)

### **2.3.3 Isolierung der natürlichen Pigmente Chl a und BChl a**

#### Chlorophyll a (Chl a)

40 g sprühgetrocknete *Spirulina platensis* (Behr Import, Bonn) wurden mit 500 ml heißem Methanol aufgeschwemmt, 30 min gerührt und abgenutscht. Die abgenutschte Methanolphase, die nun Chlorophyll und Carotinoide enthielt, wurde am Rotationsverdampfer gemäß Standardaufarbeitung zur Trockne eingengt und im Anschluss über präparative Säulenchromatographie aufgereinigt. Als stationäre Phase wurde dazu *DEAE-Sepharose CL-6B* (Amersham-Pharmacia, Freiburg) verwendet, als mobile Phase reines Aceton (evtl. Gradient auf Aceton/Methanol 3:1 (v/v)). Die aufgefangenen reinen Chlorophyll-Fractionen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und unter Argon bei -20 °C gelagert. Die Ausbeute lag bei ~100 µmol Chl a pro Ansatz.



### Bakteriochlorophyll *a* (BChl *a*)

100 g gefriergetrocknete *Rhodospirillum rubrum* (carotinoidfreie Mutante G9; DSM-Nr. 486; DSMZ, Braunschweig) wurden in 1 l Methanol 20–30 min gerührt. Anschließend wurden jeweils 200 ml der methanolischen Suspension mit dem gleichem Volumen Diethylether in einem Scheidetrichter vermischt. Danach wurde soviel Wasser zugegeben bis eine Phasentrennung erreicht war. Nach mehrmaliger Extraktion der Etherphase mit Wasser wurde dieses abgelassen und den vereinigten Etherphasen durch Zugabe von NaCl innerhalb von 20 min das restliche Wasser entzogen. Die Trocknung des rohen Pigments erfolgte gemäß Standardaufarbeitung. Die Aufreinigung erfolgte über eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule (siehe Isolierung von Chl *a*). Die Ausbeute lag bei ~110 µmol BChl *a* pro Ansatz.

### **2.3.4 Herstellung von 3Ac-Chl *a* und 3Vi-BChl *a***

#### 3-Acetyl-3-devinyl-Chlorophyll *a* (3Ac-Chl *a*)

Ca. 1500 OD·ml<sub>Ether</sub> Bakteriochlorophyll *a* wurden in 100 ml Aceton gelöst. Dieser Lösung wurden Aliquots á 10 ml einer Lösung von 4 mg 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon (DDQ) in 80 ml Aceton zugegeben. Der Fortgang der Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Es wurden erneut einige mg DDQ in Aceton gelöst, und in Aliquots á 1 ml der Lösung zugegeben, bis die Reaktion vollständig abgeschlossen war. Dabei ist ein Über-titrieren der Lösung mit DDQ unbedingt zu vermeiden, da dies zur Bildung von 3Ac-Proto-Chlorophyll *a* führt, das sich mit chromatographischen Methoden praktisch nicht abtrennen lässt. Die Trocknung des Pigments erfolgte gemäß Standardaufarbeitung. Die Aufreinigung erfolgte über eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule (siehe Isolierung von Chl *a*).

#### 3-Vinyl-3-deacetyl-Bakteriochlorophyll *a* (3Vi-BChl *a*)

Aufgereinigtes 3<sup>1</sup>OH-BChl *a* wurde ü. N. unter Vakuum im Exsikkator über CaCl<sub>2</sub> getrocknet.

#### 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-Bakteriochlorophyll *a* (3<sup>1</sup>OH-BChl *a*)

Ca. 2000 OD·ml<sub>Ether</sub> BChl *a* wurden in 150ml Ethanol gelöst. Der im Eisbad gekühlten und mit Argon begasten Lösung wurde spatelweise Natriumborhydrid (NaBH<sub>4</sub>) zugegeben. Der Fortgang der Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Die Lösung wurde in einen 1 l-Scheidetrichter überführt, und mit dem gleichen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> versetzt, um das überschüssige NaBH<sub>4</sub> abreagieren zu lassen. Erst nach Beendigung der z. T. starken Gasentwicklung wurde Diethylether bis zur Phasentrennung zugesetzt. Die Trocknung des Pigments erfolgte gemäß Standardaufarbeitung. Die Aufreinigung erfolgte über eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule (siehe Isolierung von Chl *a*).

Alle verwendeten Glasgeräte wurden ü. N. bei 140 °C ausgeheizt, um absolute Wasserfreiheit zu garantieren. Am nächsten Tag wurde das Pigment in 150 ml Toluol (mindestens zwei Tage über CaCl<sub>2</sub> getrocknet und abfiltriert) gelöst, und in einen 2-Hals-Rundkolben überführt. Die Lösung wurde ~2 Stunden unter Rückfluss gekocht, wobei das freigesetzte Wasser azeotrop mit dem Toluol abdestilliert wurde. Nach Abscheidung des Wassers floss das Toluol bei dem verwendeten Aufbau wieder in den Rundkolben zurück. Der Fortgang der Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach Abkühlen des Ansatzes wurde das Pigment am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte über eine RP-Säule aus einem C-18-Material (Länge: ~12 cm; Ø: ~2 cm). Das Laufmittel Aceton/Acetonitril (1:1 (v/v)) wurde ständig mit Argon gespült.

### 2.3.5 Enzymatische Herstellung von Chlid a und BChlid a

#### (Bakterio)Chlorophyllid a ((B)Chlid a)

Das in *Arabidopsis thaliana* durch das *athcor1*-Gen codierte COR11-Protein besitzt Chlorophyllase-Aktivität (Benedetti und Arruda, 2002). Das Enzym Chlorophyllase (Chlase) ist in der Natur am Chlorophyll-Abbau beteiligt (siehe Anhang C). Durch PCR der codierenden Region der ATHCOR1-cDNA wurde ein DNA-Fragment gewonnen, das in die *EcoRI/SalI*-Schnittstellen des pMal-c2-Vektors (New England Biolabs, Ipswich, USA) inkloniert wurde. Das dadurch entstehende Fusionsprotein aus MBP (Maltosebindeprotein) und COR11 wurde als MBP-COR11 bezeichnet. Dieser Vektor wurde von Herrn Prof. Dr. C. E. Benedetti (Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brasilien) zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid, welches ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthält, wurde in den gegen Tetracyclin resistenten *E.coli*-Stamm ER 2508 transformiert. Durch Zugabe dieser beiden Antibiotika während der Überexpression wurde auf transformierte Zellen selektiert. Die Inkubation erfolgte zunächst bei 37° C, nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression des MBP-COR11-Fusionsproteins durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) gestartet und die Inkubations-Temperatur auf 25 °C erniedrigt. Die Bakterien wurden am nächsten Tag abzentrifugiert, in wenig Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,2) gelöst, und mit etwas Lysozym und DNase versetzt. Die Zellen wurden durch eine Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen, und die so erhaltenen Suspensionen bei -20 °C eingefroren. Da das Fusionsprotein im Zelllysate eine ausreichend hohe Chlorophyllase-Aktivität aufwies, wurde auf eine weitere Aufreinigung bzw. ein Abschneiden des MBP-Anteils des Fusionsproteins verzichtet. Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. U. Oster (Botanisches Institut der LMU München) durchgeführt. Die folgende Vorschrift gilt sowohl für die Herstellung von Chlid a aus Chl a, als auch für die Herstellung von BChlid a aus BChl a.

Es wurden 3 ml des Zell-Lysats mit einer Protein-Konzentration von  $\sim 0,33 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Lösung verwendet ( $\Rightarrow \sim 1 \text{ mg}$  Gesamtprotein). Dieser Lösung wurden  $\sim 150 \text{ OD} \cdot \text{ml}_{\text{Ether}}$  (B)Chl *a* in 3 ml Aceton und eine Spatelspitze Natriumascorbat als Oxidationsschutz zugegeben. Nach einer Inkubation über eine Stunde wurde die Lösung mit 3 ml Aceton und 5 ml Hexan versetzt, kurz gevortext, und zur Phasentrennung bei  $100 \text{ g}$  zentrifugiert (3 min, Tischzentrifuge). Die (B)Chl *a*-haltige Hexanphase wurde abgetrennt und verworfen bzw. wieder verwendet. Die (B)Chl *a*-haltige Aceton/Wasser-Phase wurde erneut mit 5 ml Hexan versetzt, und die obige Prozedur wiederholt. Das (B)Chl *a* der Aceton/Wasser-Phase wurde zunächst in einige ml Essigester überführt, der anschließend zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  ausgeschüttelt und am Rotationsverdampfer abgezogen wurde. Das so erhaltene Pigment wurde bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Argon-Atmosphäre gelagert. Die Ausbeute an Chl *a* betrug  $\sim 50\%$ , die Ausbeute an Bchl *a* dagegen sogar  $80\%$ .

HPTLC-Analysen auf RP-Platten mit Methanol/Aceton/ $\text{H}_2\text{O}$  (58:38:4 (v/v)) als Laufmittel zeigten keine messbare Verunreinigungen der Aceton/Wasser-Phasen mit (B)Chl *a*, daher wurde auf eine weitere Aufreinigung des (B)Chl *a* verzichtet. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den  $R_f$ -Werten von an Position C17<sup>3</sup> mit Phytol veresterten und unveresterten Pigmenten (Chl *a*: 0,43; Chl *a*: 0,87; BChl *a*: 0,50; BChl *a*: 0,89) wären im verwendeten System auch geringste Verunreinigungen erkennbar gewesen.

### 2.3.6 Herstellung zentralmetallfreier Derivate

#### Pheophytin *a* (Phe *a*) und Bakteriopheophytin *a* (BPhe *a*)

Die folgende Vorschrift gilt sowohl für die Herstellung von Phe *a* aus Chl *a*, als auch für die Herstellung von BPhe *a* aus BChl *a*.  $5\text{--}10 \mu\text{mol}$  (B)Chl *a* wurden in  $2\text{--}4 \text{ ml}$  Eisessig gelöst und  $10\text{--}15 \text{ min}$  unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Säure mit Argon abgeblasen. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton, 95:5), bei der auch Säure-Rückstände entfernt werden.

#### Pheophorbid *a* (Pheid *a*) und Bakteriopheophorbid *a* (BPheid *a*)

Die folgende Vorschrift gilt sowohl für die Herstellung von Pheid *a* aus Chl *a*, als auch für die Herstellung von BPheid *a* aus BChl *a*.  $5\text{--}10 \mu\text{mol}$  (B)Chl *a* wurden in  $2\text{--}4 \text{ ml}$  Trifluoressigsäure (TFA) gelöst und  $10\text{--}15 \text{ min}$  unter Argon bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Säure mit Argon abgeblasen. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton/Methanol/2-Propanol, 70:15:12:3), bei der auch Säure-Rückstände entfernt werden.

### 2.3.7 Synthese transmetallierter Chlorine

#### Zn-Pheophytin a (Zn-Phe a)

10 mg Phe a wurden in 10 ml Eisessig mit einem 1000-fachen Überschuss  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$  und katalytischen Mengen ( $\sim 10$  mg) Natriumascorbat 10 min unter Rückfluss auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Lösung wurde unter Argon abgekühlt. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton, 95:5).

#### Pd-Pheophytin a (Pd-Phe a)

1000 OD·ml<sub>Ether</sub> Pheo a wurden in 200 ml Methanol gelöst, und in einem 3-Hals-Kolben unter Rühren  $\sim 15$  Minuten mit Argon gespült. Nach Zugabe von 60 mg  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  wurde der Ansatz unter Rühren und Argon bei  $70^\circ\text{C}$  unter Rückfluss gekocht. Nach 15–30 Minuten (spektroskopische Verfolgung des Reaktionsfortschritts) wurde der Ansatz abgekühlt. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton, 90:10).

#### Zn-Pheophorbid a (Zn-Pheid a)

10–15  $\mu\text{mol}$  Pheid a wurden in einem Schlenkkolben in einigen ml Methylenchlorid gelöst und mit Argon begast. Unter Sauerstoffausschluss wurden nun 5–7,5 ml Zink-Insertionslösung zugefügt und unter Rühren und Rückflusskühlung 10–15 min erhitzt.

#### Zink-Insertionslösung:

Um Oxidationen während der Metall-Insertion zu vermeiden, wurde eine sauerstofffreie Lösung von Zn- und Cd-Acetat hergestellt (Helfrich, 1995). Hierzu wurden 230 mg  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und 150 mg  $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 20 ml Methylenchlorid/Methanol (2:1) gelöst und an einer Hochvakuum-Anlage durch Einfrier-Auftau-Zyklen entgast.

Hierbei wurde die Lösung jeweils mit flüssigem Stickstoff eingefroren und die Anlage auf ca. 0,01 Torr evakuiert. Sodann wurde das Reaktionsgefäß verschlossen und die Probe wieder vollständig aufgetaut. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis zu Beginn der Entgasung kein Druckunterschied mehr zu erkennen war.

Die so entgaste Lösung wurde nun mit Stickstoff gespült und unter Argon luftdicht in 1,5 ml Aliquote portioniert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur, wobei die Lösung über Jahre ohne Funktionsverlust aufbewahrt werden konnte.

Der Grad der Komplexbildung wurde währenddessen absorptionsspektroskopisch verfolgt. Die Lösung wurde unter Argon abgekühlt. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton/Methanol/2-Propanol, 80:10:8:2).

#### Pd-Pheophorbid a (Pd-Pheid a)

1000 OD/ml Phe a wurden in 200 ml Essigsäure gelöst, und in einem 3-Hals-Kolben unter Rühren ca. 15 Minuten mit Argon gespült. Nach Zugabe von 60 mg Pd(OAc)<sub>2</sub> wurde der Ansatz unter Rühren und Argon bei 118 °C Rückfluss gekocht. Nach ~5 Minuten (Verfolgung des Fortschritts der Reaktion über Absorptionsspektren) wurde der Ansatz abgekühlt. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: A/B, 60:40; A: Methanol/Acetonitril/wässriges Pyridin, 45:35:20; B: Aceton; wässriges Pyridin: 20 ml Pyridin in 1 l H<sub>2</sub>O ad pH 5,0 mit HCl).

### **2.3.8 Synthese transmetallierter Bakteriochlorine**

#### Zn-Bakteriopheophytin a (Zn-Bphe a)

10 mg BPhe a wurden in 10 ml Eisessig mit einem 1000-fachen Überschuss Zn(OAc)<sub>2</sub> und katalytischen Mengen (10 mg) Na-Ascorbat 30 min in einer Rückflussapparatur auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde Zn-Bphe a mit Ether extrahiert. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton, 95:5).

#### Pd-Bakteriopheophytin a (Pd-Bphe a)

Cd-Bphe a wurde in Aceton (über CaCl<sub>2</sub> getrocknet) gelöst (~50 mM), in einen Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Argon-Zufuhr überführt, und die Lösung mit Argon gespült.

#### Cd-Bakteriopheophytin a (Cd-BPhe a)

Ca. 30 µmol aufgereinigtes BPhe a wurden in 30 ml DMF gelöst und die Lösung 10 min mit Argon gespült. Anschließend wurde bis zur Sättigung der Reaktionslösung getrocknetes Cd(OAc)<sub>2</sub> zugefügt und die Lösung dann unter Rückflusskühlung auf 80 °C erhitzt. Während der Reaktion darf die Temperatur von 80 °C nicht überschritten werden, da andernfalls Pyro-Cd-BPhe a als schwer abzutrennendes Nebenprodukt gebildet wird.

Der Fortgang der Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach etwa zwei Stunden wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und in Ether aufgenommen. In einem Scheidetrichter wurde die Etherphase zweimal mit Ethanol/Wasser (1:2) extrahiert und anschließend so lange mit Wasser gewaschen, bis der pH-Wert der Wasserphase ~7 betrug. Der Etherphase wurde vor Trocknung am Rotationsverdampfer mit NaCl restliches Wasser entzogen. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton/Methanol/2-Propanol, 90:5:4:1).

Nach Zugabe eines 300-fachen molaren Überschusses von PdCl<sub>2</sub> wurde die Apparatur unter Argon gesetzt und das Reaktionsgemisch ~40 min unter Rückfluss gekocht. Die Transmetallierungsreaktion ist spektroskopisch verfolgbar und verläuft vollständig. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton, 95:5).

#### Zn-Bakteriopheophorbid a (Zn-BPheid a)

10 µmol BPheid a wurden in 10 ml Eisessig mit einem 1000-fachen Überschuss an Zn(OAc)<sub>2</sub> und katalytischen Mengen (10 mg) Na-Ascorbat versetzt. Die Lösung wurde für ~30 min unter Argon und Rückfluss bei 100 °C gerührt. Die Reaktion wurde dabei spektroskopisch verfolgt. Die Lösung wurde unter Argon abgekühlt. Die Aufarbeitung des Pigments erfolgte nach Standardmethode (TLC-LM: Toluol/Aceton/Methanol/2-Propanol, 80:10:8:2).

#### Pd-Bakteriopheophorbid a (Pd-BPheid a)

Pd-BPheid a (WST09; Handelsname Tookad<sup>®</sup>) war ein Geschenk der Firma *Negma-Lerads* (Magny-Les-Hameaux, Frankreich).

Die Synthese erfolgt industriell durch Umsetzung von BPheid a mit Pd(OAc)<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>-begastem Chloroform (Scherz *et al.*, 2000). Als Oxidationsschutz wird dieser Lösung 6-O-Palmitoyl-L-ascorbat in N<sub>2</sub>-begastem Methanol zugegeben. Die abschließende Aufreinigung erfolgt über eine mit 0,4% Ascorbinsäure versetzte *Silica Gel 60*-Säule. BPheid a wird gewonnen durch Umsetzung von aus *Rhodovulum sulfidophilum* gewonnenem BChl a mit 80%-iger wässriger Trifluoressigsäure. Ebenfalls möglich ist die Synthese aus BPheid a und Pd(OAc)<sub>2</sub> in Dichlormethan, der Natriumascorbat in Methanol zugesetzt wird.

Das erhaltene Pd-BPheid a wurde mittels einer Kieselgel 60-Säule nochmals aufgereinigt (LM: 1–10% Methanol in Chloroform).

### **2.3.9 Weitere verwendete Pigmente**

Das Dikalium-Salz von Pd-Bakteriochlorin-13<sup>1</sup>-(2-sulfoethyl)amid (WST11; genauer: Pd-3<sup>1</sup>-Oxo-15-methoxycarbonylmethyl-rhodobakteriochlorin-13<sup>1</sup>-(2-sulfoethyl)amid) wird durch die Umsetzung von Pd-BPheid a in Ar-begastem DMSO mit Taurin in K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 8,2) synthetisiert (Scherz *et al.*, 2004; Brandis *et al.*, 2005). Dessen zentralmetallfreies Derivat wird nach der gleichen Vorschrift aus BPheid a synthetisiert.

Beide Pigmente waren ein Geschenk von Prof. Dr. A. Scherz (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Mittlerweile wird WST11 von der Firma *Steba Biotech* (Toussus-Le-Noble, Frankreich) unter dem Handelsnamen Stake<sup>®</sup> vertrieben.

3-(1-Hydroxy)ethyl-Pd-BPheid *a* ( $3^1\text{OH-Pd-BPheid } a$ ) wurde aus Pd-BPheid *a* durch Reduktion mittels Natriumborhydrid synthetisiert. Es wurde die gleiche Vorschrift wie zur Synthese von  $3^1\text{OH-BChl } a$  verwendet (siehe Kap. 2.3.4)

Das verwendete Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) Photosan<sup>®</sup> ist ein Produkt der Firma Seelab (Seehof Laboratorium, Wesselburenerkoog).

Das verwendete all-*trans*- $\beta$ -Carotin war synthetischer Natur (Produkt-Nr. C-9750; Sigma, Taufkirchen).

## 2.4 SDZ-Lipoprotein-Fraktionierung

SDZ: Sequentielle Dichtezentrifugation (mod. nach Havel *et al.*, 1955; Graham, 2001).

### Verwendete Puffer

- TE-Puffer I ( $\rho = 1,0 \text{ kg/l}$ ): 10 mM Tris, 1 mM EDTA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ; ad pH 7,5 mit HCl
- TE-Puffer II ( $\rho = 1,019 \text{ kg/l}$ ): TE-Puffer I + 27,81 g NaCl / I TE-Puffer I
- TE-Puffer III ( $\rho = 1,063 \text{ kg/l}$ ): TE-Puffer I + 96,25 g NaCl / I TE-Puffer I
- TE-Puffer IV ( $\rho = 1,21 \text{ kg/l}$ ): TE-Puffer III + 234,93 g KBr / I TE-Puffer III

Für jeweils zwei Zentrifugenröhrchen werden etwa 55 ml des gut durchmischten Blutplasmas benötigt. Auf eine Abtrennung der im Blutplasma enthaltenen Chylomikronen kann bei dieser Fraktionierung verzichtet werden.

Externes Pigment wurde in 110  $\mu\text{l}$  einer Cremophor<sup>®</sup> EL/Ethanol-Lösung (1:1 v/v) durch Vortexen gelöst, und nach Verdünnung mit „physiologischer“ Kochsalzlösung auf 1,1 ml dem Blutplasma zugesetzt (mod. nach: Colussi *et al.*, 1999; Whitacre *et al.*, 2000). Die Ansätze wurden drei Stunden unter langsamer Rotation an einem KGB-Rührer inkubiert.

Die Dichte des Blutplasmas ( $\rho$ :  $\sim 1,03 \text{ kg/l}$ ; Graham, 2001) wurde zunächst mit TE-Puffer I auf  $1,019 \text{ kg/l}$  verdünnt. Alle Dichten wurden mittels Aräometern bestimmt und kontrolliert. Das verdünnte Blutplasma wurde in ein Quick-Seal<sup>™</sup>-Zentrifugenröhrchen (Nr. 342414; 39 ml;  $25 \times 89 \text{ mm}$  bzw.  $1 \times 3\frac{1}{2} \text{ in}$ ; Beckman, Palo Alto, USA) eingefüllt, wobei Kanülen mit einem großen Innendurchmesser (1,2 mm) verwendet wurden, damit die Arbeiten schnell und ohne Aufschäumen der Lösung durchgeführt werden konnten. Da die Röhrchen nur im vollständig gefüllten Zustand die nötige Stabilität zur Zentrifugation aufweisen, wurden diese mit TE-Puffer II bis zu ihrem Schaft aufgefüllt, und mittels eines Verschweißgerätes (*Tube Sealer*; Beckman, Palo Alto, USA) verschlossen.

Nach einer Zentrifugation über 20 Stunden bei ~120000 g (70 Ti-Rotor, 40000 Upm, 10 °C) befanden sich in der obersten Zone des Röhrchens die milchig weißlich gefärbte VLDL-Fraktion. Die Röhrchen wurden mittels eines speziellen Schneidegerätes (*Tube Slicer*, Beckman, Palo Alto, USA; Abb. 2-2) in zwei Teile zerschnitten.

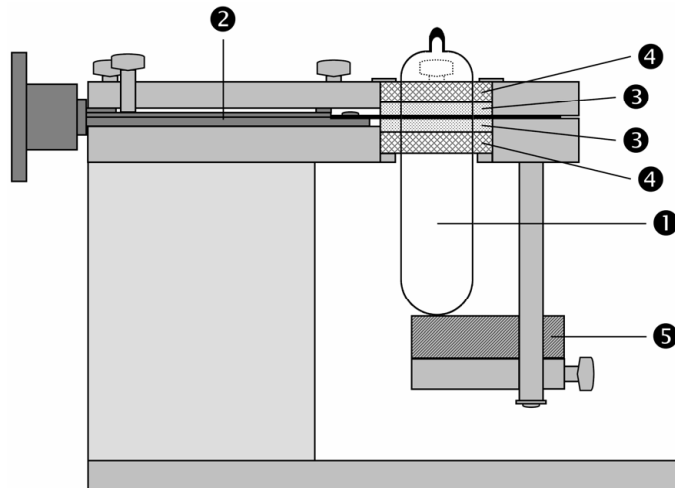


Abb. 2-2: Schematischer Querschnitt durch den *Tube Slicer*. ①: UZ-Röhrchen; ②: Messer (Klinge schwarz); ③: Metallringe; ④: Gummiringe (wirken zusammen mit ③ als Dichtung); ⑤: höhenverstellbare Halterung (schraffierter Teil schwenkbar).

In die Oberseite der Röhrchen wurden mittels einer Spritze mit spitzer Kanüle zwei Löcher gestochen. Die Flüssigkeit wurde durch eines derselben entnommen, das andere diente zur Belüftung. Nach Abheben des oberen Teils des Röhrchens wurden die Flüssigkeitsreste auf der Messeroberseite mit derselben Spritze sorgfältig entfernt, und die an der Innenwand des Röhrchens anheftenden Lipoproteine mit der in der Spritze befindlichen Flüssigkeit gründlich abgewaschen. Nach Zurückfahren des Messers wurde die Flüssigkeit im unteren Teil des Röhrchens mit einer neuen Spritze in ein Becherglas überführt.

Die oben beschriebene Prozedur wurde nun prinzipiell zwei weitere Male wiederholt, daher werden im Folgenden nur die sich ändernden Parameter erwähnt (siehe auch Abb. 2-3). Die Dichte der verbliebenen Flüssigkeit wurde durch Zugabe von NaCl auf 1,063 kg/l erhöht (siehe Kap. 2.4.1). Die Röhrchen wurden mit TE-Puffer III aufgefüllt. Nach Zentrifugation über 24 Stunden bei ~120000 g (70 Ti-Rotor, 40000 Upm, 10 °C) befanden sich in der obersten Zone des Röhrchens die gelblich gefärbte LDL-Fraktion. Nach deren Entfernung wurde die Dichte der verbliebenen Flüssigkeit durch Zugabe von KBr auf 1,21 kg/l erhöht (siehe Kap. 2.4.1). Die Röhrchen wurden mit TE-Puffer IV aufgefüllt. Nach Zentrifugation über 48 Stunden bei ~120000 g (70 Ti-Rotor, 40000 Upm, 10 °C) befanden sich in der obersten Zone des Röhrchens die bräunlich gefärbte HDL-Fraktion. Der verbleibende untere Teil der Flüssigkeit war die HDP-Fraktion, die u. a. das Albumin und die  $\gamma$ -Globuline enthielt.



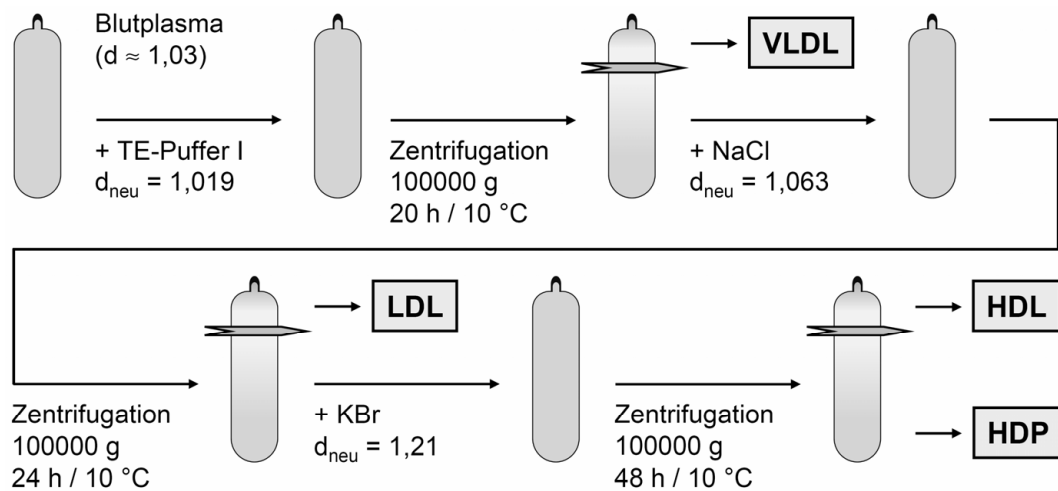


Abb. 2-3: Schematische Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte bei der sequentiellen Dichtezentrifugation (SDZ) von menschlichem Blutplasma.

#### 2.4.1 Dichteerhöhung mittels Salzzusatz

Dazu wurden die bekannten Werte für die enthaltenen Salz- und Wassermengen von NaCl- und KBr-Lösungen in Abhängigkeit ihrer relativen Dichte herangezogen (Wolf *et al.*, 1986).

Soll eine Lösung mit dem Volumen  $V^{\text{alt}}$  und der Dichte  $\rho^{\text{alt}}$  durch Zugabe eines Salzes auf eine neue Dichte  $\rho^{\text{neu}}$  eingestellt werden, so kann die zuzugebende Menge des Salzes mittels folgender Formel berechnet werden:

$$m_{\text{Salz}} = \left( \frac{c_s^{\text{neu}}}{c_w^{\text{neu}}} - \frac{c_s^{\text{alt}}}{c_w^{\text{alt}}} \right) \times \frac{c_w^{\text{alt}}}{c_w^0} \times V^{\text{alt}}$$

$m_{\text{Salz}}$  : zuzugebene Menge Salz [g] zur Erhöhung der Dichte von  $\rho^{\text{alt}}$  auf  $\rho^{\text{neu}}$

$c_s^{\text{neu}}$  : neue (erwünschte) Salz-Konzentration [g/l]

$c_w^{\text{neu}}$  : neue Wasser-Konzentration [g/l]

$c_s^{\text{alt}}$  : alte (vorhandene) Salz-Konzentration [g/l]

$c_w^{\text{alt}}$  : alte Wasser-Konzentration [g/l]

$c_w^0$  : Wasser-Konzentration in reinem Wasser (998,23 g/l)

$V^{\text{alt}}$  : Volumen der vorliegenden Lösung [ml]

Durch die Einbettung dieser Formel in eine Excel-Datei konnte die zuzugebende Salzmenge schnell und Präzise ermittelt werden.

Zur Berechnung von  $c_w^{alt}$  muss die Ausgleichskurve desjenigen Salzes angewendet werden, mit dem die bisherige Dichte eingestellt wurde. Dies ist damit begründet, dass sich die zuzugebende Salzmenge nicht nach dem Volumen der Lösung, sondern nach der in der Lösung vorhandenen Wasserkonzentration richtet. Dieser Effekt macht sich jedoch erst bei Lösungen sehr hoher Dichte bemerkbar.

Für Blutplasma wurde stets die Ausgleichsgerade für NaCl herangezogen, da dieses Salz darin den prozentual größten Anteil an den anorganischen Salzen stellt.

Für die zur Berechnung der Salz- und Wasser-Konzentrationen benötigten Ausgleichskurven ergeben sich folgende Funktionen (Abb. 2-4):

- a)  $c_s(\text{NaCl}) = 689,79 \times \rho^2 + 54,931 \times \rho - 742,48$
- b)  $c_w(\text{NaCl}) = -686,78 \times \rho^2 + 938,61 \times \rho + 745,93$
- c)  $c_s(\text{KBr}) = 128,11 \times \rho^2 + 1158,5 \times \rho - 1284,4$
- d)  $c_w(\text{KBr}) = -127,75 \times \rho^2 - 159,46 \times \rho + 1285,1$

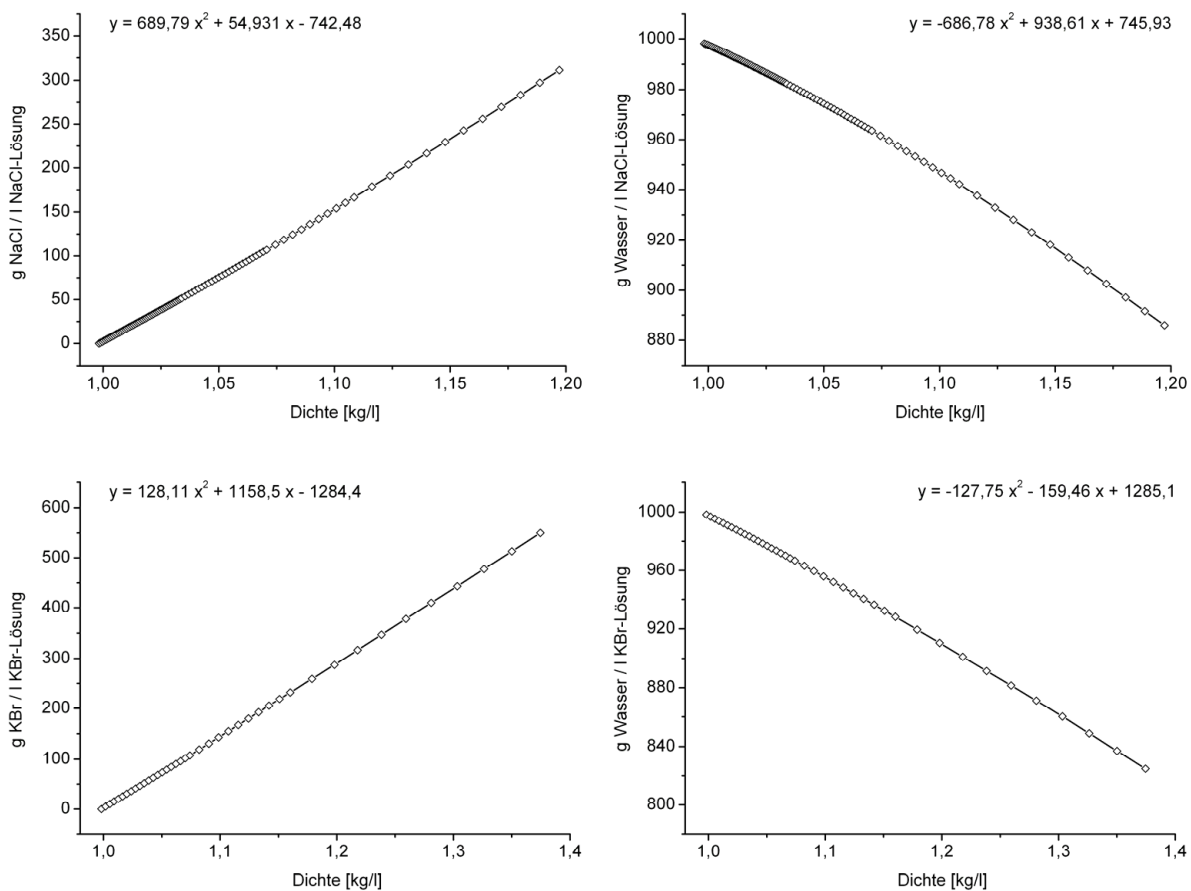


Abb. 2-4: Zusammensetzung von Salzlösungen in Abhängigkeit von ihrer Dichte: Salzgehalt einer NaCl-Lösung (oben links), Wassergehalt einer NaCl-Lösung (oben rechts), Salzgehalt einer KBr-Lösung (unten links), Wassergehalt einer KBr-Lösung (unten rechts). Die mathematischen Funktionen der Ausgleichskurven sind in der Form  $y = f(x)$  angegeben.

### 2.4.2 Dialyse der Fraktionen

Die verwendeten *Servapor*<sup>®</sup>-Dialyseschläuche (Ø: 16 mm; Serva, Heidelberg) besaßen ein Ausschlussgewicht von 12–14 kDa, d. h. auch die kleinsten Lipoproteine, die VHDL mit einer Masse von etwa 150 kDa, wurden durch die Membran zurückgehalten. Die Dialyse erfolgte ü. N. bei 4 °C und unter Rühren gegen 3 Liter TE-Puffer III (siehe Kap. 2.4).

Die Proben wurden abschließend mittels *Whatman FP30/0,45 CA-S*-Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm Porengröße; Whatman, Dassel) oder vergleichbaren Filtern steril filtriert.

### 2.4.3 HDL<sub>2</sub>-HDL<sub>3</sub>-Subfraktionierung

Zur weiteren Fraktionierung der HDL in die beiden Subfraktionen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> wurden jeweils 5,5 ml der zu fraktionierenden HDL-Proben ü. N. gegen TE-Puffer III dialysiert (siehe Kap. 2.4 und 2.4.2), dessen Dichte durch Zugabe von 94,24 g KBr / l TE-Puffer III auf 1,125 kg/l erhöht worden war. Die dialysierten Proben wurden in *Quick-Seal*<sup>™</sup>-Zentrifugenröhrchen (Nr. 342412; 5,1 ml; 13 × 51 mm bzw. ½ × 2 in; Beckman, Palo Alto, USA) überführt, und die mittels eines Verschweißgerätes (*Tube Sealer*; Beckman, Palo Alto, USA) verschlossenen Röhrchen für vier Stunden bei ~260000 g (VTi 80-Rotor; 60000 Upm; 10 °C) zentrifugiert.

Nach Zentrifugation befand sich im obersten Teil jedes Röhrchens die HDL<sub>2</sub>-Subfraktion (~0,75 ml), im unteren Teil die HDL<sub>3</sub>-Subfraktion (~4,5 ml). Die beiden Subfraktionen wurden mittels einer am unteren Ende der Röhrchen eingestochenen Spritze in separate Probengefäße transferiert, nachdem die Röhrchen zunächst mittels einer Kanüle an ihrem oberen Ende zur Belüftung punktiert worden waren.

### 2.4.4 Konzentrierung der Proben

Zur ggf. nötigen Konzentrierung von Proben wurden *Centricon*<sup>®</sup> *YM-30*-Zentrifugenröhrchen (Millipore, Schwalbach) verwendet, deren Membranen eine Ausschlussgröße von 30 kDa aufwiesen. Die Zentrifugation erfolgte bei 5000 g (Rotor 12155-H; 7010 Upm; 10 °C) bis zum Erreichen des gewünschten Volumens.

Die Röhrchen wurden nach Benutzung gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült, und bis zur nächsten Benutzung mit Ethanol gefüllt bei 4 °C gelagert.

## 2.5 IGZ-Lipoprotein-Fraktionierung

IGZ: Iodixanolgradienten-Zentrifugation (mod. nach Graham *et al.*, 1996; Graham, 2001).

Externes Pigment wurde in 40  $\mu\text{l}$  (1% v/v) einer Cremophor<sup>®</sup> EL/Ethanol-Lösung (1:1 v/v) durch Vortexen gelöst, und 4 ml Blutplasma zugesetzt. Die Ansätze wurden drei Stunden bei RT unter Grünlicht und langsamer Rotation an einem KGB-Rührer inkubiert.

Eine 60%-ige Lösung von Iodixanol (1,3-Bis(acetylamino)-N,N'-bis[3,5-bis(2,3-dihydroxypropylaminocarbonyl)-2,4,6-triiodophenyl]-2-hydroxypropan).;  $\rho = 1,32 \text{ kg/l}$ ) ist unter dem Handelsnamen *OptiPrep*<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; ursprünglich: Axis-Shield, Oslo) erhältlich. Es wurden 4 ml des Blutplasmas mit 0,8 ml *OptiPrep*<sup>™</sup> versetzt ( $\Rightarrow$  Iodixanol-Endkonzentration: 10% v/v). Auch bei dieser Fraktionierung ist eine Abtrennung der Chylomikronen des Blutplasmas durch Zentrifugation nicht erforderlich.

Mittels einer Spritze mit mindestens 60 mm langer Kanüle wurden 0,5 ml TE-Puffer I in ein *Quick-Seal*<sup>™</sup>-*Ultra-Clear*<sup>™</sup>-Zentrifugenröhrchen (Nr. 344075; 5,1 ml; 13  $\times$  51 mm bzw.  $\frac{1}{2}$   $\times$  2 in; Beckman, Palo Alto, USA) gefüllt, und dieses mit 4 ml des Ansatzes unterschichtet. Der Ansatz wiederum wurde mit 0,6 ml reinem *OptiPrep*<sup>™</sup> unterschichtet.

Die mittels eines Verschweißgerätes (*Tube Sealer*; Beckman, Palo Alto, USA) verschlossenen Röhrchen wurden für vier Stunden bei  $\sim 260000 \text{ g}$  (VTi 80-Rotor; 60000 Upm; 10 °C) zentrifugiert. Es bildete sich ein Iodixanol-Gradient aus, in dem mehrere mit dem bloßen Auge unterscheidbare Zonen sichtbar waren.

Mittels einer Spritze konnten nun Proben eines Dichte-Intervalls entnommen (siehe Kap. 2.5.1) oder der Gradient spektrophotometrisch erfasst werden (siehe Kap. 2.5.2). Bei der Probenentnahme wurden besonders spitze Kanülen verwendet, da diese beim Einstechen nicht verstopfen können. Des Weiteren kann durch Abkleben der Einstichstelle mit einem Streifen Isolierband das Austreten von Flüssigkeit verhindert werden.

### 2.5.1 Refraktometrische Dichtebestimmung

Die Dichte der entnommenen Proben kann durch Messung der Refraktion bestimmt werden. Dafür wurde ein analoges Abbe-Refraktometer (nicht näher spezifiziertes Modell; Atago, Tokyo) verwendet. Zur Berechnung der Dichte wurde folgende aus der Ausgleichsgerade (Abb. 2-5) bestimmte Formel verwendet:

$$\rho = \frac{RI - 1,06463}{0,27448}$$

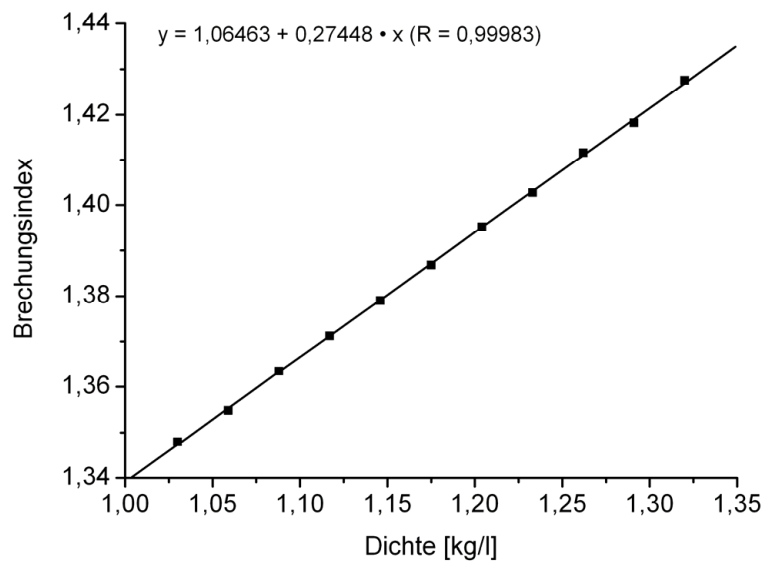


Abb. 2-5: Eichgerade für die Dichtebestimmung von Blutplasma-Iodixanol-Gradienten durch Messung der Refraktion. Die verwendeten Ansätze waren Mischungen aus OptiPrep™ ( $\rho = 1,32 \text{ kg/l}$ ) und Blutplasma ( $\rho = 1,025 \text{ kg/l}$ ), und enthielten 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, oder 100% OptiPrep™ (Rest = Blutplasma).

## 2.5.2 Spektrophotometrische Gradienten-Erfassung

Die Iodixanol-Gradienten, die sich in den *Quick-Seal™-Ultra-Clear™*-Zentrifugenröhrchen gebildet hatten (siehe Kap. 2-5), wurden entlang ihrer Längsrichtung spektrophotometrisch erfasst, wobei das Zentrifugenröhrchen selbst als Küvette mit einer Schichtdicke von 12 mm fungierte (Abb. 2-6). Dazu wurde dieses in einen Kunststoffblock (30 × 30 × 92 mm) mit einer zentralen Bohrung in Längsrichtung ( $\varnothing$ : 14 mm) eingeführt. Durch Anheben des Röhrchens wurde der Gradient beginnend mit seinem oberen Ende geringerer Dichte an den Lichtleitern des DAD-Spektrophotometers vorbeigeschoben, die durch zwei kleinere, mittige, und sich gegenüberstehende Bohrungen des Blocks in Querrichtung ( $\varnothing$ : 4 mm) unmittelbar auf der Oberfläche des Röhrchens positioniert wurden. Das Anheben wurde durch einen 4V-Elektromotor bewerkstelligt, der mittels eines Transformators mit etwa 2V betrieben wurde. Durch die Verwendung von fünf hintereinander angeordneten 3:1-Untersetzungen (24- auf 8-zählige Zahnräder) wurde eine Gesamtuntersetzung von 243:1 ( $3^5:1$ ) erreicht. Durch die Verwendung einer Zahnstange nach der letzten Untersetzung wurde die Drehbewegung der letzten Achse in einen linearen Vortrieb von  $\sim 1 \text{ cm/min}$  umgewandelt. Das Röhrchen wurde mit der Zahnstange durch ein doppelseitiges Klebeband verbunden, um ein Verdrehen desselben während der Aufwärtsbewegung zu vermeiden. Auf die Auswertung der bei dieser Erfassung erhaltenen 3D-Densitogramme wird in Kapitel 3.4.2 eingegangen.

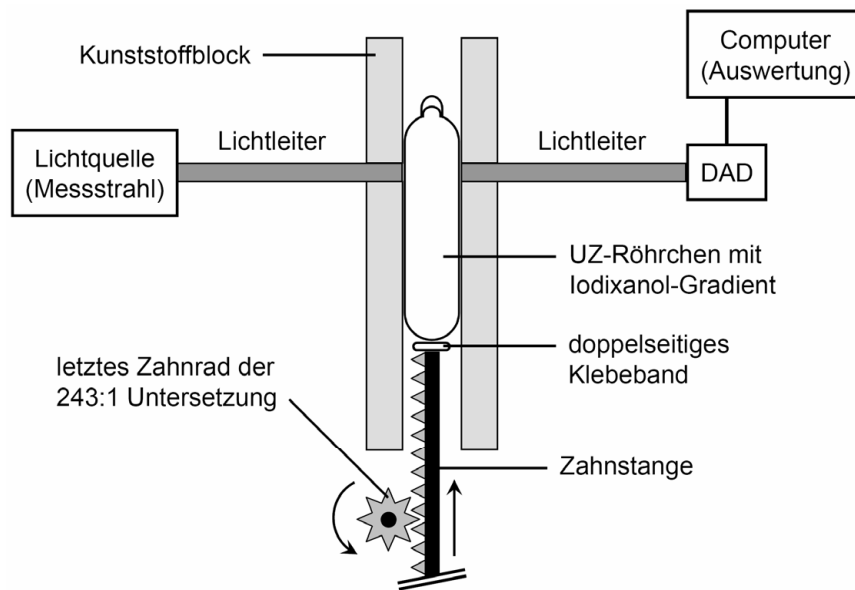


Abb. 2-6: Schematische Darstellung der Mess-Apparatur zur spektrophotometrischen Erfassung der Iodixanol-Dichtegradienten. Nicht dargestellt sind die weiteren Zahnräder der Untersetzung, sowie der Elektromotor und der Transformator.

## 2.6 Größenbestimmung von Proteinen / Proteinkomplexen

### 2.6.1 Native Agarose/Agar/Albumin-Gelelektrophorese

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete native Agarose/Agar/Albumin-Gelelektrophorese (AAAGE; mod. nach Noble, 1968) diente zur Größenbestimmung bzw. Oberflächenladungsanalyse von nativen Lipoproteinen.

Für die Gel-Lösung wurden 0,4 g Agarose und 0,1 g Agar in 100 ml 60 mM Barbitol-Puffer pH 8,6 (Sigma, Taufkirchen) unter Rühren vorsichtig aufgekocht. Die klare Lösung wurde auf 45–50 °C abgekühlt, und unter Rühren 1 ml Rinderserumalbumin-Lösung zugegeben.

#### Rinderserumalbumin-Lösung:

1 g BSA (Fraktion V) wurden in ~7,5 ml „physiologischer“ Kochsalzlösung (0,9% w/v NaCl in H<sub>2</sub>O) gelöst und der pH-Wert mit 1 M Tris-Puffer auf 8,6 eingestellt. Diese Lösung wurde anschließend mit „physiologischer“ Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt.

Jeweils etwa 33 ml der noch warmen Gel-Lösung wurden in eine Gel-Kammer (70 × 50 × 9,5 mm) eingefüllt und ein Kamm für die Proben-Taschen eingesetzt. Eine mit einigen Kristallen Bromphenolblau gefärbte BSA-Lösung wurde als Vergleichsprobe verwendet.

Die Lipoproteine wurden bei ~80 mA (~200 V) für ~100 Minuten aufgetrennt. Die Gelkammer wurde dabei ständig mit Eis gekühlt, um ein Überhitzen des Gels zu verhindern.

Zur Fixierung wurde das Gel in eine Ethanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>/Eisigsäure-Lösung (75:20:5 v/v/v) überführt, und nach Inkubation im Trockenofen bei 80 °C getrocknet (~30 min), bis die Oberfläche des Gels völlig transparent erschien. Eine Färbung der Lipoproteine (z. B. derer Lipide mit Sudanschwarz B) war nicht nötig, da diese bei der Fixierung als weiße Banden sichtbar wurden. Das mit Leitungswasser gründlich abgewaschene Gel wurde eingescannt.

### 2.6.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Delipidierung der Apolipoproteine erfolgte durch eine 1:9-Verdünnung mit einer eiskalten Ethanol/Diethylether-Lösung (3:2 v/v) (Scanu, 1966). Am nächsten Tag wurde der Ansatz für 10 min bei ~14240g (14000 Upm; Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen, der Protein-Niederschlag mit eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter den obigen Bedingungen wurde erneut der Überstand dekantiert und verworfen, der gereinigte Protein-Niederschlag durch Einblasen von Argon getrocknet und dann in Auftragspuffer-Puffer (Lämmli, 1970) gelöst. Die gelösten Niederschläge wurden mindestens fünf Minuten im Wasserbad bei 100 °C denaturiert und zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

#### Auftragspuffer-Puffer

- Tris/HCl, pH 6,8	625 mM
- Glycerin	10% (v/v)
- 2-Mercaptoethanol	5% (v/v)
- SDS	2% (w/v)
- Bromphenolblau	0,003% (w/v)

Es wurden gebrauchsfertige Tris-HCl Polyacrylamid-Gele verwendet, die einen linearen Polyacrylamid-Gradienten von 4–20% aufwiesen (Cat.-Nr.: 161-1105; Bio-Rad, München). Die Taschen der Gele wurden vor Gebrauch gründlich mit SDS-PAGE-Laufpuffer gespült.

#### SDS-PAGE-Laufpuffer

- Tris / HCl pH 8,3	8,325 mM
- Glycin	192 mM
- SDS	0,1% (v/v)

Der *ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range* (New England Biolabs, Ipswich, USA; Details siehe Tab. 2-1) diente zu Abschätzen der Molekulargewichte der Proteine. Von diesem Marker, dessen Proteine bereits in verschiedenen Farben vorgefärbt sind, wurden jeweils 7 µl in den beiden Spuren links und rechts von den Proben aufgetragen wurden.

Tab. 2-1: ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (MBP: Maltose-Bindeprotein; CBD: Chitin-bindende Domäne; <sup>1</sup> Fusionsproteine).

Protein	Herkunft	scheinbares MW [kDa]
MBP-β-Galaktosidase <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	175,0
MBP-verkürzte β-Galaktosidase <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	83,0
MBP-CBD <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	62,0
Aldolase	Kaninchenmuskel	47,5
Triosephosphat-Isomerase	<i>E. coli</i>	32,5
Myoglobin	Pferdeskelettmuskel	20,5
Lysozym	Hühnereiweiß	16,5
Aprotinin	Rinderlunge	6,5

Die Proteine wurden zunächst ~10 min bei ~50 V, danach bei ~150 V aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte.

Die Proteine im Gel wurden durch eine kolloidale Coomassie-Brillant-Blau G250-Färbung mittels der *Roti®-Blue* Färbelösung (Roth, Karlsruhe) gefärbt. Die Gele wurden mit einer Auflösung von 600 dpi im Graustufen-Modus gescannt.

### 2.6.3 Gelfiltration

Das Säulenmaterial *Sephadex™ G-25 Medium* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) dient auf Grund seiner Eigenschaft alle Moleküle mit einem MW <10 kDa zurückzuhalten in erster Linie zur Entsalzung von Flüssigkeiten. Es eignet sich jedoch auch für Bindungsstudien zwischen extern zugesetzten Pigmenten und Lipoproteinen, da alle ungebunden vorliegenden Pigmente (MW <1kDa) aus der Probe entfernt werden. Die Säulen wurden in Pasteurpipetten (Länge: ~150 mm) gegossen. In die Säulen wurde ein nasses Wattestück eingeführt, um ein Auslaufen des feinkörnigen Säulenmaterials zu verhindern.



Mittels eines elastischen Plastikschlauchstücks wurde das obere Ende der Pasteurpipette mit einem 15 ml Polypropylen-Röhrchen verbunden, das durch Abschneiden seines unteren Endes als Säulenpuffer-Vorratsgefäß diente. Die Pipettenspitze wurde mittels *Parafilm M*<sup>®</sup> (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) mit der Einlassöffnung einer 80µl-Durchfluss-Küvette (*Produkt-Nr. 178.010*; Hellma, Müllheim) verbunden. Ein dünner Schlauch leitete die Flüssigkeit von deren Auslassöffnung in ein Auffanggefäß.

Es wurden 400 mg des trocken gelagerten Säulenmaterials in 4 ml TE-Puffer III gelöst und auf die Watte aufgetragen. Nachdem sich das Material gesetzt hatte entstand eine ~70 mm lange Säule. Nach vollständiger Entfernung der Flüssigkeitssäule über der Säulenoberfläche wurde die Probe mittels einer 50 µl Glas-Spritze vorsichtig aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig eingezogen war, wurden 50 µl TE-Puffer III auf die Säulenoberfläche aufgetragen und die Messung gestartet. Da die Höhe der über der Säule stehenden Flüssigkeitssäule die Durchlaufgeschwindigkeit beeinflusst, wurden genau 5 ml Säulenpuffer hinzugefügt.

Zur Kontrolle der Säulenlaufeigenschaften wurden Bromphenolblau und Blue Dextran (*LMW Gel Filtration Calibration Kit*, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) verwendet.

## 2.7 Analytik der Lipoprotein-Zusammensetzung

### 2.7.1 Protein-Bestimmung

Die Protein-Bestimmung wurde mit dem *Fluka*<sup>®</sup> *Advanced Protein Assay Reagent 78006* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) durchgeführt, der auf einem Bradford-Lowry-Fujita-Methodenmix beruht.

Die 5-fach konzentrierte Reagenz-Stammlösung wurde stets frisch nach den Angaben des Herstellers verdünnt. Pro Testansatz wurden 10 µl Probe in einer Halbmikro-Plastikküvette mit 1 ml Reagenz-Lösung vermischt, 5 s gevortext, und die OD<sub>590</sub> des Testansatzes gegen die Reagenz-Lösung als Referenz gemessen. Es war keine Kalibrierung erforderlich.

$$c_{\text{Protein}} (\mu\text{g/ml Reagenz}) = 30 \times \Delta E \quad [\text{Angabe des Herstellers}]$$

$$\Rightarrow c_{\text{Protein}} (\text{mg/dl Probe}) = 300 \times \Delta E \quad [\text{in der Medizin gebräuchliche Einheit}]$$

### 2.7.2 Phospholipid-Bestimmung

Die Phospholipid-Bestimmung wurde mit dem *Roche® Phospholipide Farb-Test 691844* (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt, der auf der enzymatischen MPR2-Methode beruht (Takayama *et al.*, 1977; Trinder, 1969).

Da die Reaktion auf dem Cholin-Rest der Phospholipide beruht, ist ein Kalibrator in Form einer Cholinchlorid-Lösung (54,1 mg/dl) im Lieferumfang enthalten. Diese entspricht einer Probe mit einer Phospholipid-Konzentration von 3,88 mmol/l bzw. 300 mg/dl.

Pro Testansatz wurden 6,67 µl Probe (oder Kalibrator) mit 1000 µl Reagenzlösung vermischt, 10 min bei 37 °C inkubiert, und die OD<sub>500</sub> des Proben- oder Kalibratoransatzes gegen die Reagenzlösung als Referenz gemessen.

- C<sub>Phospholipide</sub> (mM) = 3,88 × (ΔE<sub>Probe</sub> / ΔE<sub>Kalibrator</sub>) [Angabe des Herstellers]

- C<sub>Phospholipide</sub> (mg/dl) = 300 × (ΔE<sub>Probe</sub> / ΔE<sub>Kalibrator</sub>) [in der Medizin gebräuchliche Einheit]

### 2.7.3 Cholesterin(ester)-Bestimmung

Die Cholesterin(ester)-Bestimmung wurde mit dem *Roche® Cholesterin Farb-Test 2016630* (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt, der auf der enzymatischen CHOD-PAP-Methode beruht (Siedel *et al.*, 1983; Kattermann *et al.*, 1984; Trinder, 1969).

Bei diesem Farb-Test werden sowohl freies Cholesterin, wie auch alle Cholesterinester bestimmt, da die Ester in einem ersten Schritt in freies Cholesterin überführt werden.

Pro Testansatz wurden 10 µl Probe mit 1000 µl Reagenz vermischt, 5 min bei 37 °C inkubiert, und die OD<sub>500</sub> des Probenansatzes gegen das Reagenz als Referenz gemessen. Es war kein Kalibrator erforderlich.

- C<sub>Cholesterin</sub> (mM) = 14,9 × ΔE [Angabe des Herstellers]

- C<sub>Cholesterin</sub> (mg/dl) = 575 × ΔE [in der Medizin gebräuchliche Einheit]

### 2.7.4 Triglycerid-Bestimmung

Die Triglycerid-Bestimmung wurde mit dem *Roche® Triglyceride Farb-Test 2016648* (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt, der auf der enzymatischen GPO-PAP-Methode beruht (Siedel *et al.*, 1993; Trinder, 1969).

Als Kalibrator wurde der *Human Triglycerid-Kalibrator 10163* (HUMAN, Wiesbaden) mit einer Triglycerid-Konzentration von 2,28 mmol/l bzw. 200 mg/dl verwendet.

Pro Testansatz wurden 10 µl Probe (oder Kalibrator) mit 1000 µl Reagenz vermischt, 5 min bei 37 °C inkubiert, und die OD<sub>500</sub> des Proben- oder Kalibratoransatzes gegen die Reagenz als Referenz gemessen.

- C Triglyceride (mM) =  $2,28 \times (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Kalibrator}})$  [Angabe des Herstellers]
- C Triglyceride (mg/dl) =  $200 \times (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Kalibrator}})$  [in der Medizin gebräuchliche Einheit]

## 2.8 Photooxidationsexperimente

Als Lichtquelle wurde eine Weißlicht erzeugende Kaltlichtlampe mit Lichtleiter verwendet, mittels derer die Probe von oben belichtet wurde (Abb. 2-7). Gleichzeitig wurde jede Sekunde (durch die Glasflächen der Küvette) ein Absorptionsspektrum gemessen. Mittels eines Lichtmessgerätes, das die Lichtintensität in  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) maß, konnten die Proben mit definierten Lichtmengen belichtet werden.

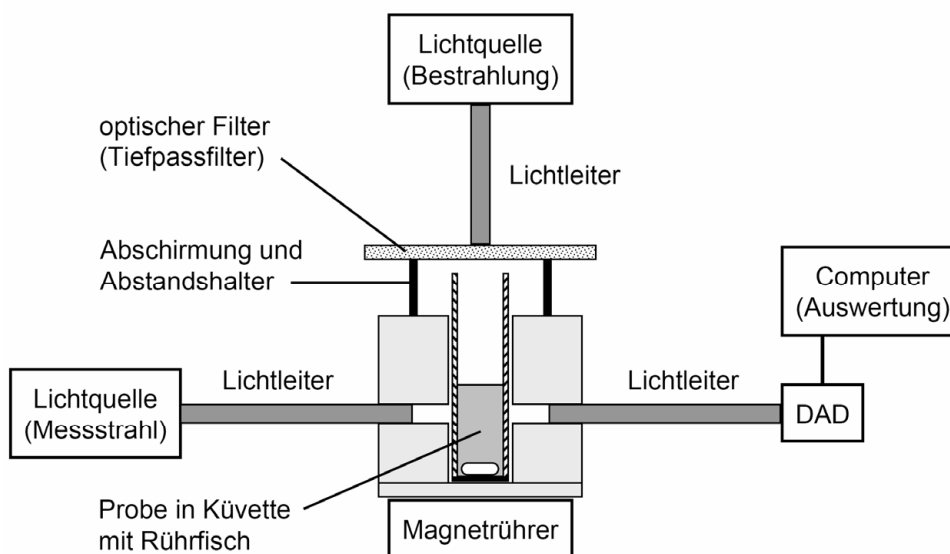


Abb. 2-7: Schematische Darstellung der Mess-Apparatur für die Belichtungsexperimente.

### Kaltlichtlampen mit Lichtleiter

- *KL 1500 electronic* (Schott, Mainz)
- *Intralux 150 H universal* (Volpi, Denzlingen)

Die Pigment-Konzentration wird bei allen Versuchen in OD angegeben. Die OD (optische Dichte) gibt die Extinktion der Lösung (Schichtdicke: 1 cm) beim Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximum des verwendeten Pigments wieder.

Die Stoffmenge des Pigments wird folglich oft in *OD·ml* angegeben, welche sich aus dem Produkt der gemessenen OD (siehe oben) und dem Volumen der vorliegenden Lösung errechnet. Für ein trocken vorliegendes Pigment bedeutet dies, dass x OD·ml dieses Pigments in 1 ml Solvens gelöst eine OD von x besitzen würden (unter Annahme einer ausreichenden Löslichkeit). Da die OD einer gegebenen Pigmentmenge vom verwendeten Solvens abhängig ist, muss dieses mit angegeben werden. Fehlt diese Angabe, so beziehen sich alle im Rahmen dieser Arbeit genannten OD·ml-Werte auf Diethylether (DE) als Lösungsmittel. Damit kann eine (nicht einwiegbare) Pigmentmenge ohne Kenntnis des Absorptionskoeffizienten des Pigments im verwendeten Lösungsmittel angegeben werden.

Für die Messung der Lichtintensität wurden zwei Lichtmessgeräte verwendet. Das eine maß die *PAR (Photosynthetically Active Radiation)* zwischen 400 und 700 nm, das andere die Intensität im NIR bei 730 nm.

Lichtmessgeräte:

- *LI-250 Light Meter + LI-190SA Quantum Sensor*  
(Lichtmessung zwischen 400 und 700 nm (PAR); LI-COR Biosciences, Bad Homburg)
- *SKP 200 Display Meter + SKP 218 / 730 Far-Red Sensor*  
(Lichtmessung bei 730 nm; Skye Instruments, Llandrindod Wells, Wales)

Die Lichtintensitäten (in  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) der Kaltlichtlampe *KL 1500e* in Abhängigkeit von der gewählten Belichtungsstufe sind der Tabelle 2-2 zu entnehmen.

Tab. 2-2: Lichtintensität der fünf Belichtungsstufen der Kaltlichtlampe *KL 1500e* in  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ohne Filter, Entfernung 10 cm.

Belichtungsstufe	PAR-Messgerät	NIR-Messgerät
1	21	1,7
2	140	9,0
3	425	23,0
4	990	45,0
5	1950	74,5

Die Lichtintensitäten (in  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) der Kaltlichtlampe *KL 1500e* in Abhängigkeit von einigen ausgewählten Entfernungen vom Ende des Lichtleiters sind der Tabelle 2-3 zu entnehmen.

Tab. 2-3: Lichtintensität bei einigen ausgewählten Entfernungen vom Ende des Lichtleiters der Kaltlichtlampe *KL 1500e* in  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ohne Filter, 1. Belichtungsstufe.

Entfernung [mm]	PAR-Messgerät
0	330
25	174
30	150
50	78
60	55
100	21
120	15

Für die Belichtung wurden *RG630*- und *RG695*-Tiefpassfilter (Schott, Mainz) verwendet (Abb. 2-8). Die Belichtungszeiten werden bei allen Experimenten stets in Stunden (h), Minuten (min), oder Sekunden (s) angegeben.

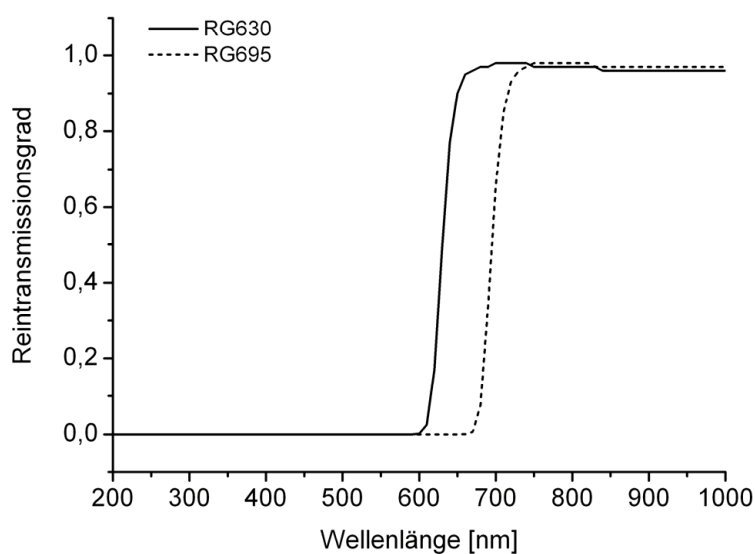


Abb. 2-8: Transmissionsspektren der beiden verwendeten Rotfilter *RG630* und *RG695*.

Die Lichtintensität im NIR bei 730 nm nahm durch den *RG630*-Filter auf 98%, durch den *RG695*-Filter auf 96% ab. Das PAR-Lichtmessgerät dagegen detektierte einen Rückgang der Lichtintensität auf ~40% (*RG630*) bzw. ~3% (*RG695*).

### 2.8.1 Pigment-Extraktion

Zur Extraktion der Pigmente aus Lipoprotein-Fractionen wurde 1 ml der Probe mit 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt und 30 Sekunden gevortext. Danach wurden 5 ml Methylenchlorid zugegeben und der Ansatz erneut für 30 Sekunden gevortext. Methylenchlorid wurde anstelle des häufiger verwendeten Chloroforms aufgrund seiner geringeren Toxizität, sowie seiner durch den niedrigeren Siedepunkt bedingten schnelleren Entfernbarkeit verwendet. Lipid-Extraktionen mit Methylenchlorid/Methanol 2:1 (v/v) führen normalerweise zu identischen Ergebnissen wie Lipid-Extraktionen mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) (Carlson, 1985). Je nach Probenvolumen und -konzentration wurden auch die halben oder doppelten Volumina verwendet. Nach einer Zentrifugation bei 1000 g (3 Minuten, Tischzentrifuge) wurde die Methylenchlorid-Phase möglichst vollständig entnommen und am Rotationsverdampfer getrocknet. Der Rückstand wurde mit Aceton extrahiert, wobei der Großteil der Lipide als farbloser Niederschlag an der Wand des Kolbens verblieb. Die Lösung wurde in einen neuen Kolben überführt, und erneut am Rotationsverdampfer getrocknet. Die extrahierten Pigmente wurden bis zu ihrer HPLC-Analyse unter Argon bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.8.2 HPLC-Analyse der Pigmente

Die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde zur Reinheitsanalyse der isolierten oder modifizierten Pigmente, sowie zur Strukturbestimmung ihrer photoinduzierten Abbauprodukte verwendet.

Das verwendete HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

- Pumpe / Kontrolleinheit: *600E multisolvent delivery system* (Waters, Frechen)
- RPC-Säule: *GROM-SIL 120 ODS-5 ST, 5  $\mu\text{m}$*  (Alltech Grom, Rottenburg-Hailfingen)
- oder
- NPC-Säule: *Econosphere™ Silica, 5  $\mu\text{m}$*  (Alltech, Unterhaching)
- DAD-Lampe: *CLH 20W* (J&M, Aalen)
- DAD-Spektrophotometer: *Tidas UVNIR/16 - 1024/100-1* (J&M, Aalen)
- Software: *Spectralys 1.82* (J&M, Aalen)

[basierend auf *Spectacle* (LabControl, Köln)]

Sämtliche verwendeten Lösungsmittel wurden vor Benutzung sorgfältig entgast. Die Identifikation unbekannter Pigmente erfolgte cochromatographisch, d. h. durch Vergleich deren Retentionszeiten mit denen bekannter Pigmente.

Verwendete Gradientenprogramme (GP):

In allen Fällen handelte es sich zwischen den unten angegebenen Zeitpunkten um lineare Gradienten.

- GP LP (RPC-Säule): für alle aus den Lipoprotein-Fractionen extrahierten Pigmente

Kanal A: 30% H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad pH 3,5 mit Essigsäure / 70% Aceton; Kanal B: 100% Aceton

Gradient: 0 min: 100% A  
4 min: 100% A  
19 min: 100% B  
20 min: 100% B  
24 min: 100% A  
30 min: 100% A

Flussrate: 1,2 ml/min

- GP NPC-UPP (NPC-Säule): Isolierung von UPP

Kanal A: 100% n-Hexan; Kanal B: 100% Aceton; Kanal C: 100% Methanol

Gradient: 0 min: 50% A, 50% B  
5 min: 50% A, 50% B  
15 min: 100% B  
40 min: 40% B, 60% C  
45 min: 100% C  
50 min: 100% C  
60 min; 100% B  
70 min: 50% A, 50% B  
80 min: 50% A, 50% B

Flussrate: 3,0 ml/min

- GP RPC-UPP (RPC-Säule): Trennung von UPP1 und UPP2

Kanal A: 30% H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad pH 3,5 mit Essigsäure / 70% Aceton; Kanal B: 100% Aceton

Gradient: 0 min: 50% A, 50% B  
10 min: 50% A, 50% B  
20 min: 25% A, 75% B  
25 min: 100% B  
30 min: 100% B  
35 min: 50% A, 50% B  
40 min: 50% A, 50% B

Flussrate: 1,2 ml/min

### 2.8.3 Sauerstoff-Entzug

In Anwesenheit von Dithionit-Ionen werden wässrige Lösungen vollständig von Sauerstoff befreit. Dazu wurde eine Thunberg-Küvette (Abb. 2-9) verwendet, in deren oberem Reservoir entweder festes oder in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gelöstes 1 M Natriumdithionit vorgelegt wurde. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde dieses durch mehrmaliges Kippen der Küvette in der Probe gelöst bzw. mit dieser vermischt.

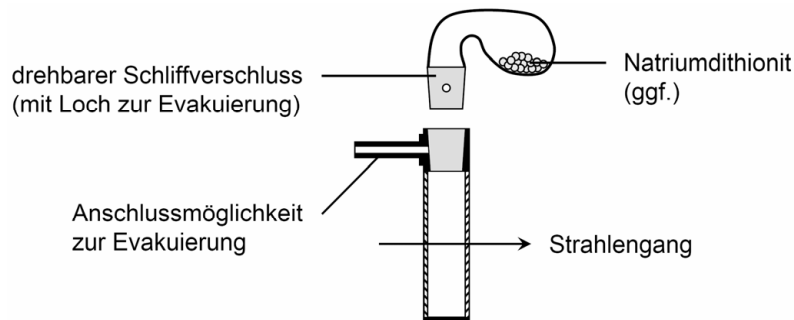


Abb. 2-9: Schematische Darstellung der verwendeten Thunberg-Küvette.

### 2.8.4 Sauerstoff-Begasung

Durch die ständige Begasung einer wässrigen Lösung mit reinem Sauerstoff kann dagegen auch während Sauerstoff-verbrauchenden Reaktionen die Sauerstoff-Konzentration nahe ihrer Sättigung gehalten werden. Dies kann mit einem *Sauerstoff-Generator* bewerkstelligt werden.

In einem Zweihalskolben wurden 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (30%) mit 40 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verdünnt. Dieser Lösung wurden unter Rühren langsam 3 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95–97%) zugegeben. Dem Kolben wurde ein oben unverschlossener Tropftrichter mit ~7 g  $\text{KMnO}_4$  in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  aufgesetzt. An den zweiten (seitlichen) Anschluss des Zweihalskolbens wurde ein Schlauch angeschlossen, der an seinem anderen Ende mit einer Plastikpipettenspitze (10  $\mu\text{l}$ ) versehen war. Diese wurde knapp über dem Boden der zu begasenden Küvette positioniert und mit einem Klebeband fixiert.

Der stark gerührten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung wurde die  $\text{KMnO}_4$ -Lösung mit einer Tropfgeschwindigkeit von ~1 Tropfen pro 3 Sekunden zugeführt, wobei der bei jedem Tropfen entstehende Sauerstoff rhythmisch durch die Küvette entwich. Der Flüssigkeitsspiegel im Tropftrichter wurde gelegentlich durch Zugabe weiterer  $\text{KMnO}_4$ -Lösung wieder erhöht, damit der Sauerstoff nicht durch den Tropftrichter entwich. Erst bei merklich nachlassender Sauerstoff-Produktion wurde die angesäuerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung erneuert.



### 2.8.5 Sauerstoff-Konzentrationsbestimmung (Clark-Elektrode)

Die Messung der Sauerstoff-Konzentration erfolgte auf elektrochemischem Wege. Das dabei verwendete Messsystem (Hansatech, Pentney, UK) bestand aus einer *DW1*-Elektroden-Kammer mit integrierter Clark-Elektrode (Abb. 2-10), die über eine *Oxylab*-Kontrolleinheit mit einem Computer verbunden, und mittels der Software *Oxylab 1.10* angesteuert wurde.

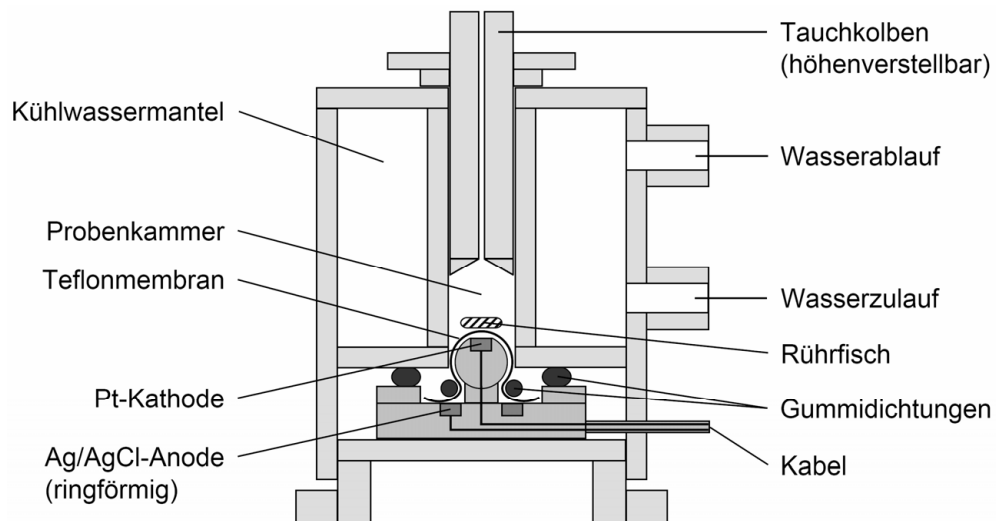


Abb. 2-10: Schematische Abbildung der *DW1*-Elektroden-Kammer mit integrierter Clark-Elektrode. Die dunkelgrau hinterlegte Elektrodeneinheit ist etwas vergrößert dargestellt.

Das Volumen der Flüssigkeit in der Probenkammer, deren Temperatur mittels des Kühlwassermantels konstant bei 25 °C gehalten wurde, betrug stets 1 ml. Ein eingebauter Rührer (Leistung: 30%) sorgte dabei für eine stetige Durchmischung der Flüssigkeit. Die Eichung der Elektrode erfolgte mit sauerstoffgesättigtem Wasser ( $C_{\text{Sauerstoff}} = 0,253 \mu\text{mol/ml}$ ) und einer Natriumdithionit-Lösung (Endkonzentration: 15 mM  $\Rightarrow C_{\text{Sauerstoff}} = 0 \mu\text{mol/ml}$ ).

## 2.9 Analytik photoinduzierter Peroxide

### 2.9.1 Quantifizierung von Hydroperoxiden (DCF-Test)

DCF-Testlösung (mod. nach Cathcart, 1984):

Es wurde 1 ml einer 1 mM 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat-Lösung ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) in Ethanol mit 2 ml 0,1 M NaOH versetzt, wodurch 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ) entstand. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurden 47 ml 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,2) und 50  $\mu\text{l}$  einer Lösung von 1 mg Hämatin in 1 ml 0,1 M NaOH zugegeben.

Es wurden 50 µl Probe zu 1,45 ml DCF-Testlösung in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und im Wasserbad bei 50 °C für 50 Minuten inkubiert. Die Fluoreszenz des entstehenden Dichlorofluoresceins (DCF;  $\lambda_{\text{ex}} = 512 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ ) wurde bei einer Excitation von 502 nm und einer Emission von 540 nm gemessen.

Als Standard wurde 0,1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verwendet.

## 2.9.2 Quantifizierung von Endoperoxiden (TBARS-Test)

TBARS-Testlösung (mod. nach Reyftmann *et al.*, 1984; Sparrow *et al.*, 1988):  
0,5% (w/v) 2-Thiobarbitursäure, 5% (v/v) Trichloressigsäure (TCA) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ .

Es wurden 50 µl Probe zu 200 µl TBARS-Testlösung in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und im Wasserbad bei 100 °C 15 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 1,25 ml 2-Propanol zugegeben. Die Fluoreszenz des entstehenden Malondialdehyd-Thiobarbitursäure-Adduktes ( $\lambda_{\text{ex}} = 534 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$ ) wurde bei einer Excitation von 524 nm und einer Emission von 565 nm gemessen.

Als Standard wurde 2 µM 1,1,3,3-Tetraethoxypropan in Ethanol verwendet.

## 2.9.3 Färbung von Cholesterin-Hydroperoxiden (TMPD-Färbung)

TMPD-Färbelösung (mod. nach Korytowski *et al.*, 1991; Kriska und Girotti, 2004):  
0,1 g N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin (TMPD) in 50 ml Methanol, 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  und 1 ml Essigsäure.

Die Lipide wurden mit Methylenchlorid/Methanol (1:1 v/v) extrahiert und auf HPTLC-Platten (Kieselgel 60 auf Alufolien; Merck, Darmstadt) appliziert, die mit n-Hexan/Ethylacetat (1:1 v/v) in einer Horizontalkammer entwickelt wurden. Die Platten wurden vollständig in eine TMPD-Lösung getaucht, wodurch sich die Cholesterin-Hydroperoxide bei RT innerhalb weniger Sekunden durch Bildung von Wurster's Blau anfärbten.

Als Referenzverbindung für Photoreaktionen des Typs II diente 5 $\alpha$ -Hydroperoxy-Cholesterin (Herstellung siehe Kap. 2.9.4). Eine Referenzverbindung (7 $\alpha$  $\beta$ -Hydroperoxy-Cholesterin) für Photoreaktionen des Typs I stand leider nicht zur Verfügung.

## 2.9.4 Färbung reduzierter Cholesterin-Peroxide (CuSO<sub>4</sub>-Färbung)

CuSO<sub>4</sub>-Färbelösung (mod. nach Bitman und Wood, 1982):

8% (w/v) CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, 10% (v/v) konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5% (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>.

Die Lipide wurden mit Methylenchlorid/Methanol (1:1 v/v) extrahiert und auf HPTLC-Platten (Kieselgel 60 auf Alufolien; Merck, Darmstadt) appliziert, die mit n-Hexan/Ethylacetat (1:1 v/v) in einer Horizontalkammer entwickelt wurden. Die Platten wurden vollständig in eine CuSO<sub>4</sub>-Lösung getaucht, wodurch sich das Cholesterin und alle seine Derivate nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 110 °C durch eine mechanistisch noch unbekannte Farbreaktion anfärbten. Die Färbung ist abhängig von der Derivatisierungstemperatur und der Struktur der nachgewiesenen Moleküle.

Als deutlich schnellere und zuverlässigere Methode der Entwicklung erwies sich jedoch die Verwendung einer Heißluftpistole. Bei Entwicklung in einem Trockenofen kam es dagegen zu einer teilweisen Ablösung des Chromatographiematerials von der Aluminium-Trägerfolie.

Als Referenzverbindung für Photoreaktionen des Typs I diente 7 $\alpha$  $\beta$ -Hydroxy-Cholesterin, für Photoreaktionen des Typs II 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin (Girotti *et al.*, 1987; Bachowski *et al.*, 1988b).

Standard für Typ I-Oxidationsreaktionen (7 $\alpha$  $\beta$ -OH-Chol-Standard):

Durch Reduktion von kommerziell erhältlichem 7-Keto-Cholesterin mittels NaBH<sub>4</sub> entsteht sowohl 7 $\alpha$ -, als auch 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterin.

Dazu wurden 100  $\mu$ l des in Methanol gelösten 7-Keto-Cholesterins (5 mg/ml) mit 100  $\mu$ l 50 mM NaBH<sub>4</sub> / 10 mM NaOH in Methanol mindestens 15 Minuten bei RT inkubiert, das Lösungsmittel im Argonstrom abgeblasen, und die Produkte in Methylenchlorid/Methanol (1:1 v/v) aufgenommen.

Standard für Typ II-Oxidationsreaktionen (5 $\alpha$ -OH-Chol-Standard):

Durch photoinduzierte Oxidation von Cholesterin mit Bengalrosa und anschließender Aufarbeitung mit NaBH<sub>4</sub> entsteht 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin.

Dazu wurden 100  $\mu$ l des in Methanol gelösten Cholesterins (5 mg/ml) und 100  $\mu$ l 50 mM Bengalrosa in Methanol mindestens eine Stunde mit Weißlicht (Kaltlichtquelle) bestrahlt. Diese Lösung diente als 5 $\alpha$ -OOH-Chol-Standard (siehe Kap. 2.9.3).

Anschließend wurde der Ansatz mit 100  $\mu$ l 50 mM NaBH<sub>4</sub> / 10 mM NaOH in Methanol mindestens 15 Minuten bei RT inkubiert, das Lösungsmittel im Argonstrom abgeblasen, und die Produkte in Methylenchlorid/Methanol (1:1 v/v) aufgenommen.

### **2.9.5 Cholesterin-Esterase**

Es wurden 2,5 mg Cholesterin-Esterase (aus Schweinepankreas; 33,1 U/mg; Fluka, Taufkirchen) und 20 mg Natriumcholat in 15 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst. Pro Ansatz wurden 400 µl dieser Lösung mit 100 µl der zu untersuchenden Probe versetzt und mindestens eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurde eine Lösung von Cholesterinoleat (8 mg/ml) in 2-Propanol verwendet.

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1 Verwendete Pigmente: Chemische Struktur und Absorption

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den chemischen Strukturen, sowie den absorptions-spektroskopischen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pigmente.

Zu Beginn der systematischen Untersuchungen zur Pigmentverteilung von Tetrapyrrolen in Lipoprotein-Fractionen wurden 16 Pigmente ausgewählt, die sich in wichtigen Details ihrer chemischen Struktur voneinander unterscheiden (Tab. 3-1; Abb. 3-1). Die Wahl fiel auf acht Chlorin- und acht Bakteriochlorin-Derivate. Erstere besitzen eine C7-C8-Doppelbindung und einen C3-Vinylrest, letztere dagegen eine C7-C8-Einfachbindung und einen C3-Acetylrest. Jeweils vier dieser Derivate waren an Position C17<sup>3</sup> mit Phytol verestert, die anderen vier wiesen an Position C17<sup>3</sup> die freie Carbonsäure auf.

Tab. 3-1: Übersicht über das Grundgerüst, den C17<sup>3</sup>-Substituent (R) und das Zentralmetall (M) der verwendeten Pigmente. Die chemische Struktur der Grundgerüste ist in Abb. 3-1 dargestellt.

Pigment	Grundgerüst	R	M
Chl <i>a</i>	Chlorin	Phy	Mg
Zn-Phe <i>a</i>	Chlorin	Phy	Zn
Pd-Phe <i>a</i>	Chlorin	Phy	Pd
Phe <i>a</i>	Chlorin	Phy	– (2 H)
Chlid <i>a</i>	Chlorin	H	Mg
Zn-Pheid <i>a</i>	Chlorin	H	Zn
Pd-Pheid <i>a</i>	Chlorin	H	Pd
Pheid <i>a</i>	Chlorin	H	– (2 H)
BChl <i>a</i>	Bakteriochlorin	Phy	Mg
Zn-BPhe <i>a</i>	Bakteriochlorin	Phy	Zn
Pd-BPhe <i>a</i>	Bakteriochlorin	Phy	Pd
BPhe <i>a</i>	Bakteriochlorin	Phy	– (2 H)
BChlid <i>a</i>	Bakteriochlorin	H	Mg
Zn-BPheid <i>a</i>	Bakteriochlorin	H	Zn
Pd-BPheid <i>a</i>	Bakteriochlorin	H	Pd
BPheid <i>a</i>	Bakteriochlorin	H	– (2 H)

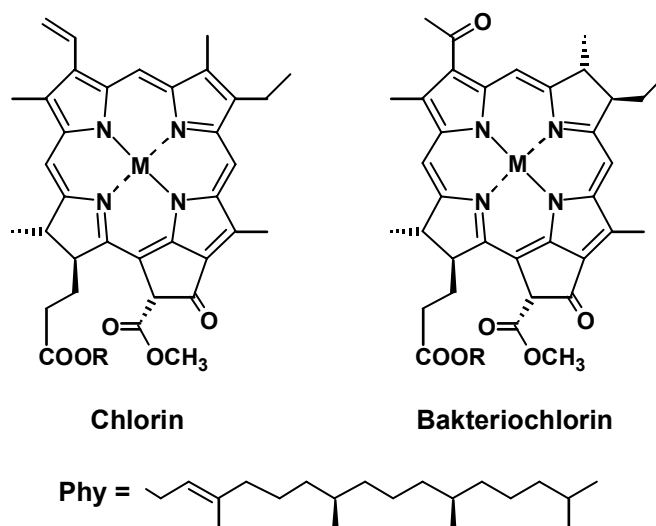


Abb. 3-1: Allgemeine chemische Strukturen der Chlorine (17,18-Dihydroporphyrine) und Bakteriochlorine (7,8,17,18-Tetrahydroporphyrine), sowie des ggf. durch eine Esterbindung an Position C17<sup>3</sup> gebundenen Phytol-Rests (Phy). Weitere Abkürzungen siehe Tab. 3-1.

Erstere Gruppe wird auch als Pheophytine bzw. Bakteriopheophytine bezeichnet, letztere als Pheophorbide bzw. Bakteriopheophorbide. Weiter unterschieden sich die vier Pigmente in jeder dieser vier oben genannten Gruppen hinsichtlich ihres Zentralmetalls. Dabei waren außer den natürlichen Mg-Derivaten die Zn- und Pd-Derivate, sowie die zentralmetallfreien Derivate vertreten. Bei den zentralmetallfreien Derivaten werden die Stickstoffe durch zwei Wasserstoffatome abgesättigt (formal: 2 H). Alle Tetrapyrrole wurden (falls keine etablierten Kurznamen existierten) durchgehend semisystematisch nach IUPAC benannt (Moss, 1988).

Die absorptionsspektroskopischen Eigenschaften dieser Tetrapyrrole unterscheiden sich zum Teil deutlich voneinander (Tab. 3-2; Abb. 3-2). Die Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima der Bakteriochlorine sind im Vergleich zu den entsprechenden Chlorinen stark bathochrom verschoben (Mg: ~110 nm; Zn: ~110 nm; Pd: ~120 nm; – (2 H): ~82 nm).

Der Phytol-Rest hat dagegen nur einen sehr geringen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums, d. h. die Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima der entsprechenden (Bakterio)Pheophytine und (Bakterio)Pheophorbide sind nahezu identisch. So weist Chlid *a* in Vergleich zu Chl *a* in verschiedenen organischen Lösungsmitteln lediglich 0,5–3,1 nm bathochrom verschobene Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima auf (Fiedor *et al.*, 2003). Der Unterschied ist wahrscheinlich in einer Störung der Lösungsmittelhülle des Tetrapyrrols durch die Kohlenwasserstoffkette des Phytols begründet.

Die Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima aller Zink-Derivate sind im Vergleich zu den Mg-Derivaten ~7 nm hypsochrom verschoben. Bei den Pd-Chlorinen beträgt diese Verschiebung ~25 nm, bei den Pd-Bakteriochlorinen ~15 nm.

Tab. 3-2: Absorptionsspektroskopische Merkmale verwendeter Pigmente in Diethylether (Teil I). Der relative Absorptionskoeffizient  $\epsilon_{rel}$  wurde in dieser Zusammenfassung jeweils auf die Intensität des (0-0)-Übergangs des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums normiert.

Pigment	$B_y$	$B_x$	$Q_x$	$Q_y$
	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{rel}$ )	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{rel}$ )	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{rel}$ )	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{rel}$ )
Chl <i>a</i>	426 (1,351)		573 (0,112)	659 (1,000)
			527 (0,081)	613 (0,192)
Zn-Phe <i>a</i>	422 (1,351)		561 (0,091)	653 (1,000)
			520 (0,066)	605 (0,159)
Pd-Phe <i>a</i>	388 (0,860)	414 (0,800)	530 (0,070)	634 (1,000)
			492 (0,074)	589 (0,178)
Phe <i>a</i>	407 (2,044)		533 (0,195)	667 (1,000)
			504 (0,236)	609 (0,162)
Chlid <i>a</i>	425 (1,434)		574 (0,125)	660 (1,000)
			530 (0,103)	615 (0,226)
Zn-Pheid <i>a</i>	420 (1,559)		560 (0,104)	652 (1,000)
			516 (0,089)	606 (0,189)
Pd-Pheid <i>a</i>	389 (0,790)	416 (0,728)	531 (0,065)	635 (1,000)
			493 (0,070)	590 (0,169)
Pheid <i>a</i>	407 (2,023)		533 (0,195)	667 (1,000)
			504 (0,238)	609 (0,165)
BChl <i>a</i>	356 (0,827)	391 (0,547)	573 (0,250)	769 (1,000)
				710 (0,142)
Zn-BPhe <i>a</i>	352 (0,793)	389 (0,539)	557 (0,261)	763 (1,000)
				699 (0,121)
Pd-BPhe <i>a</i>	331 (0,450)	384 (0,352)	528 (0,151)	755 (1,000)
				691 (0,095)
BPhe <i>a</i>	356 (1,641)	383 (0,911)	524 (0,423)	749 (1,000)
			492 (0,098)	679 (0,163)
			458 (0,055)	621 (0,066)
BChlid <i>a</i>	357 (0,788)	391 (0,530)	574 (0,221)	770 (1,000)
				709 (0,120)
Zn-BPheid <i>a</i>	352 (0,804)	388 (0,544)	557 (0,258)	763 (1,000)
				699 (0,121)
Pd-BPheid <i>a</i>	330 (0,487)	384 (0,339)	528 (0,140)	755 (1,000)
				692 (0,086)
BPheid <i>a</i>	356 (1,617)	382 (0,881)	524 (0,415)	749 (1,000)
			492 (0,091)	678 (0,143)
			458 (0,048)	621 (0,053)

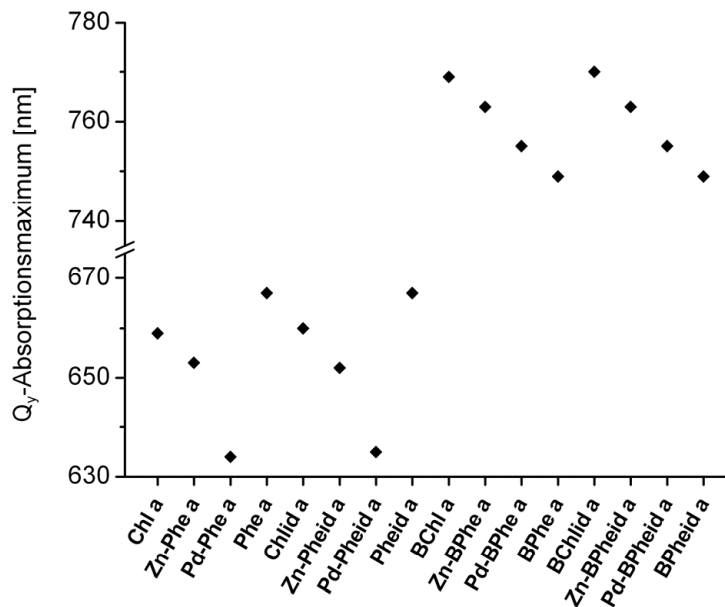


Abb. 3-2: Position der Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima der verwendeten Tetrapyrrole.

Dagegen unterscheiden sich die zentralmetallfreien Chlorine mit ~8 nm bathochrom verschobenen Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima gegenüber den Mg-Derivaten sehr deutlich von den zentralmetallfreien Bakteriochlorinen, die ~20 nm hypsochrom verschobene Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima im Vergleich zu dem Mg-Derivaten zeigen.

Metalloporphyrine werden anhand ihrer Absorptions- und Fluoreszenz-Eigenschaften in zwei Gruppen eingeteilt (Marsh und Mink, 1996). Die *regulären Metalloporphyrine* enthalten Zentralmetall-Ionen mit einer geschlossenen Valenzschale ( $d^0$ , z. B. Mg;  $d^{10}$ , z. B. Zn). Durch die daraus resultierende relativ geringe Energie der  $d_{\pi}$ -Orbitale des Metalls werden die Absorptions-Eigenschaften nur minimal verändert. Die *Hypsoporphyrine* dagegen enthalten Zentralmetall-Ionen mit einer nur teilweise besetzten Valenzschale ( $d^{6-9}$ , z. B. Pd mit  $d^8$ ). Durch die dadurch bedingte verhältnismäßig starke Interaktion der  $d_{\pi}$ -Orbitale des Metalls mit den  $\pi^*$ -Orbitalen des angeregten Porphyrins (*metal to ligand  $\pi$ -backbonding*) kommt es zu einer Vergrößerung der Energielücke vom Grundzustand zum angeregten Zustand des Porphyrins und damit zu einer hypsochromen Verschiebung der Q-Banden.

Die beiden C13<sup>2</sup>-Diastereomere (Epimere) des BChl, d. h. BChl a und BChl a', unterscheiden sich im Bereich ihrer Q<sub>x</sub>-Absorptionsbanden geringfügig voneinander, was wohl durch eine veränderte Liganden-Koordination an das Mg-Zentralatom begründet ist (Kania und Fiedor, 2006). Diese Vermutung wird durch die vollkommen identischen Absorptionsspektren von Bphe a und Bphe a' unterstützt.



Weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pigmente waren 3Ac-Chl *a* und 3Vi-BChl *a* (siehe Kap. 3.4.6). Auf das durch Reduktion aus Pd-BPheid *a* (WST09) synthetisierte Pigment 3-(1-Hydroxy)ethyl-Pd-BPheid *a* (3<sup>1</sup>OH-WST09), sowie die freundlicherweise von Prof. Dr. Avigdor Scherz (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellten Pigmente WST11 und dessen Pd-freies Derivat wird näher in Kap. 3.4.8 eingegangen. Ferner kam Poly-Hämatoporphyrin (hematoporphyrin derivative; HpD) zum Einsatz (siehe Kap. 1.2.1), welches als Photosan<sup>®</sup> käuflich erworben wurde. Die absorptions-spektroskopischen Eigenschaften dieser Tetrapyrrole sind der Tabelle 3-3 zu entnehmen. Bezüglich der chemischen Strukturen dieser Pigmente wird auf die bereits oben genannten Kapitel verwiesen.

Tab. 3-3: Absorptionsspektroskopische Merkmale verwendeter Pigmente in Diethylether<sup>1</sup> (Teil II) und Methanol<sup>2</sup>. Der relative Absorptionskoeffizient  $\epsilon_{\text{rel}}$  wurde in dieser Zusammenfassung jeweils auf die Intensität des (0-0)-Übergangs des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums normiert (Ausnahme: HDP; normiert auf die Intensität der Soret-Bande).

Pigment	B <sub>y</sub>	B <sub>x</sub>	Q <sub>x</sub>	Q <sub>y</sub>
	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{\text{rel}}$ )	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{\text{rel}}$ )	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{\text{rel}}$ )	$\lambda$ [nm] ( $\epsilon_{\text{rel}}$ )
3-Ac-Chl <i>a</i> <sup>1</sup>	385 (0,692)	433 (1,413)	584 (0,112)	675 (1,000)
			538 (0,060)	628 (0,188)
3-Vi-BChl <i>a</i> <sup>1</sup>	349 (1,045)	388 (0,637)	557 (0,318)	744 (1,000)
				684 (0,171)
WST09 <sup>1</sup>	330 (0,491)	384 (0,471)	518 (0,125)	754 (1,000)
3 <sup>1</sup> OH-WST09 <sup>1</sup>	326 (0,555)	377 (0,508)	514 (0,127)	714 (1,000)
				659 (0,130)
WST11 <sup>2</sup>	331 (0,470)	384 (0,386)	518 (0,126)	747 (1,000)
WST11 Pd-frei <sup>2</sup>	355 (1,224)		518 (0,300)	749 (1,000)
				692 (0,107)
				629 (0,034)
HpD <sup>2</sup>	377 (1,0)		505 (0,108)	575 (0,062)
			537 (0,073)	626 (0,032)

Die Werte für WST09 (Pd-BPheid *a*) beziehen sich auf das grob aufgereinigte Pd-BPheid *a*, wie es als Tookad<sup>®</sup> in der PDT verwendet wird. Dagegen bezieht sich die entsprechenden Angaben für Pd-BPheid *a* in Tabelle 3-2 auf eine säulenchromatographisch aufgereinigte Probe. Das Q<sub>x</sub>-Absorptionsmaximum des „rohen“ Tookad<sup>®</sup> ist ~10 nm hypsochrom im Vergleich zu dieser nachmals aufgereinigten Probe verschoben. Dies wird wahrscheinlich durch Verunreinigungen unbekannter Art verursacht, die auch dazu führen, dass eine Lösung von Tookad<sup>®</sup> in Diethylether stets eine leichte Trübung aufweist.

### 3.2 Verteilung von Pd-BPheid a (WST09) in Blut

Bei diesem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Marion Schneider (Universitätsklinikum Ulm) durchgeführten Versuch wurden sog. *Buffy-Coats* verwendet. Diese stellen ein mit Leukozyten angereichertes Blutpräparat dar, bei welchem ein Großteil der Erythrozyten und des Blutplasmas entfernt wurden.

Nach einer 30-minütigen Inkubation der Buffy-Coats mit Pd-BPheid a (zugegeben in DMSO; DMSO-Endkonzentration 2‰) wurden diese mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) verdünnt und mit einer Schicht Ficoll ( $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$ ) unterschichtet. Ficoll ist ein synthetisches Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin. Nach Zentrifugation (20 min;  $800 \times g$ ) können vier Fraktionen gewonnen werden (Abb. 3-3). Erythrozyten ( $\rho \approx 1,100 \text{ g/ml}$ ) und Granulozyten ( $\rho \approx 1,082 \text{ g/ml}$ ) passieren auf Grund ihrer im Vergleich zu Ficoll höheren Dichte die Ficoll-Schicht und setzen sich am Boden des Zentrifugenröhrchen als roter Niederschlag ab.

Dagegen bilden Lymphozyten ( $\rho \approx 1,070 \text{ g/ml}$ ) und Monozyten ( $\rho \approx 1,062 \text{ g/ml}$ ) auf Grund ihrer im Vergleich zu Ficoll niedrigeren Dichte einen gelbbraun (engl.: buff  $\Rightarrow$  buffy coat) gefärbten Ring über der Ficoll-Schicht. Die meisten Thrombozyten ( $\rho \approx 1,058 \text{ g/ml}$ ) sind unmittelbar oberhalb dieses Rings zu finden.

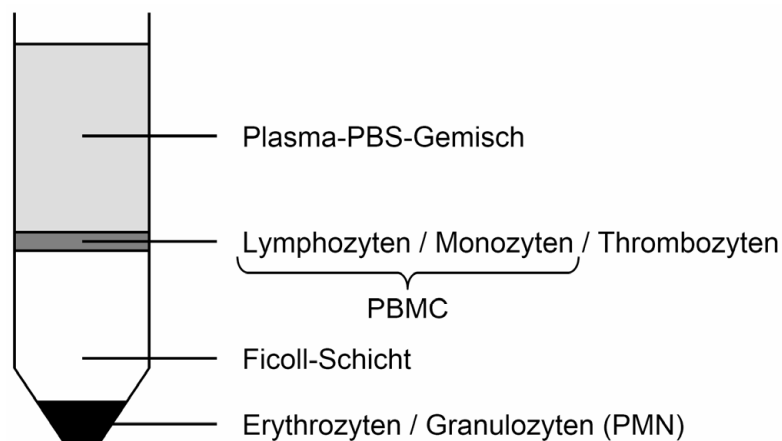


Abb. 3-3: Fraktionierung von Blut (Buffy-Coats) mittels Ficoll-Unterschichtung und Zentrifugation. Schematische Darstellung der Schichten des entstandenen Dichte-Gradienten.

Lymphozyten und Monozyten werden auch unter dem Namen *PBMC* (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) zusammengefasst. Die auch als *PMN* (*Polymorphonuclear Neutrophils*) bezeichneten reinen Granulozyten, können aus dem gemeinsamen Niederschlag mit den Erythrozyten durch eine nachfolgende Lyse der Erythrozyten gewonnen werden.

Die spektroskopische Auswertung der Fraktionen ergab eine deutliche Anreicherung des zugesetzten Pigments in der Plasma-PBS-Fraktion, obwohl im Vergleich zu Vollblut die Konzentration aller Blutplasma-Bestandteile in den Buffy-Coats stark reduziert ist (Abb. 3-4).

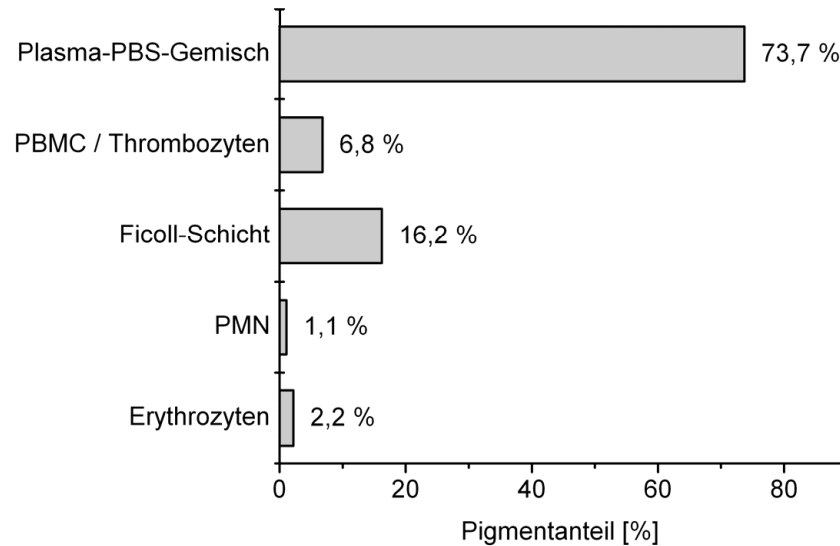


Abb. 3-4: Verteilung von Pd-BPheid a (WST09) auf die wichtigsten Fraktionen von humanem Blut. Die Fraktionierung erfolgte nach der in Abb. 3-3 schematisch dargestellten Fraktionierung von Blut (Buffy-Coats) mittels Ficoll-Unterschichtung und Zentrifugation. PBMC: Lymphozyten und Monozyten. PMN: Granulozyten.

Während in der Plasma-PBS-Fraktion fast  $\frac{3}{4}$  des zugesetzten Pigments zu finden waren, beinhalteten alle Schichten mit zellulären Bestandteilen (alle übrigen Fraktionen bis auf die Ficoll-Schicht) nur  $\sim 10\%$  des zugesetzten Pd-BPheid a. Das in der Ficoll-Schicht gefundene Pigment könnte entweder durch die Erythrozyten und Granulozyten unspezifisch mitgerissen worden sein, oder auf eine äußerst schwache, reversible Bindung des Pd-BPheid a an diese Zellen hindeuten.

Auf Grund der deutlichen Anreicherung des zugesetzten Pd-BPheid a in der Plasma-Fraktion wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Wechselwirkungen von Tetrapyrrolen mit Bestandteilen des Blutplasmas verlegt. Bei allen folgenden Versuchen wurden daher als Ausgangsmaterial keine Buffy-Coats, sondern reine Blutplasmen verwendet.

### 3.3 Pigmentverteilung in humanem Blutplasma I: SDZ-Fraktionierung

Die gängigste Methode zur Fraktionierung von humanem Blutplasma ist die sequentielle Dichtezentrifugation (SDZ; siehe Kap. 2.4). Dabei wird das Blutplasma gewöhnlich in vier Fraktionen aufgetrennt, die sich bezüglich der Dichte ihrer Inhaltsstoffe unterscheiden (siehe Tab. 1-2):

Fraktion ①: **VLDL** ( $d < 1,019$ ; ~18 ml): enthält CM, VLDL, IDL

Fraktion ②: **LDL** ( $1,019 < d < 1,063$ ; ~ 18 ml): enthält LDL

Fraktion ③: **HDL** ( $1,063 < d < 1,21$ ; ~ 18 ml): enthält Lp(a), HDL<sub>E</sub>, HDL<sub>2</sub>, HDL<sub>3</sub>

Fraktion ④: **HDP** ( $d > 1,21$ ; ~60 ml): enthält VHDL, Plasmaproteine (v. a. Albumin)

Die Absorptionsspektren der so gewonnenen Blutplasma-Fraktionen waren qualitativ stets nahezu identisch, wiesen jedoch quantitativ bei verschiedenen Blutplasma-Chargen große Unterschiede auf. Da in den LDL- und HDL-Fraktionen fast ausschließlich die Carotinoide für die Absorption im sichtbaren Bereich verantwortlich sind (Abb. 3-5), war im Wesentlichen deren Konzentration in der jeweiligen Charge Blutplasma entscheidend für die Absorptionsintensität in den daraus gewonnenen Fraktionen. In einer diesbezüglich durchschnittlichen Charge Blutplasma enthielt die LDL-Fraktion etwa 2- bis 3-mal mehr Carotinoide als die HDL-Fraktion, da ähnliche Absorptionskoeffizienten der Carotinoide in den verschiedenen Fraktionen vorausgesetzt werden können. Die VLDL-Fraktion, deren Absorptionsspektrum fast eine ideale Streukurve darstellt, enthält dagegen kaum Carotinoide. Das Absorptionsspektrum der HDP-Fraktion wird dagegen beherrscht von der Soret-Bande des Hämoglobins bei ~414 nm, welches durch vereinzelte rote Blutkörperchen in diese Fraktion gelangt.

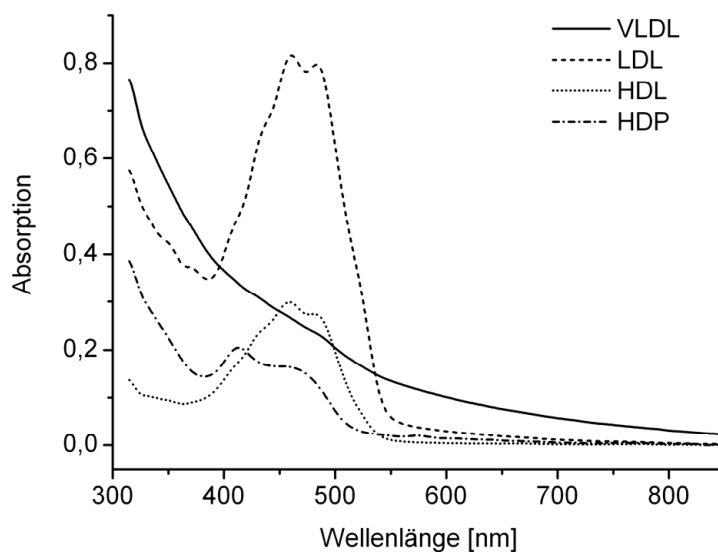


Abb. 3-5: Ausgewählte Absorptionsspektren durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnener Blutplasma-Fraktionen.

Dabei handelt es sich um die sauerstoffhaltige Hämoglobin-Form, das sog. *Oxyhämoglobin* ( $\text{HbO}_2$ ), das Absorptionsmaxima bei 415, 542, und 577 nm aufweist (Zonios *et al.*, 1999). Das (sauerstoff)unbeladene *Deoxyhämoglobin* (Hb) besitzt dagegen Absorptionsmaxima bei 430 und 555 nm, und ist damit spektroskopisch deutlich vom Oxyhämoglobin unterscheidbar.

### 3.3.1 Verteilung von Pd- und Zn-BPheid a auf die Lipoproteinfraktionen

Zur Untersuchung der Pigmentverteilung wurde das Blutplasma für drei Stunden mit einem mittels des CES-Insertionssystems (siehe Kap. 2.4) zugegebenen Tetrapyrrol inkubiert. Ein Teil des zugegebenen Pigments war nach dem ersten Zentrifugationsschritt am Boden des UZ-Röhrchens als Niederschlag zu finden. Es wurde bedeckt von einer zähen, unlöslichen Substanz, bei der es sich wohl um Teile der HDP handelte.

Alle im Folgenden angegebenen prozentualen Werte zur Pigmentverteilung beziehen sich daher nicht auf die ursprünglich zugegebene Pigmentmenge, sondern auf die Summe des in den vier Fraktionen wieder gefundenen Pigments. Die Quantifizierung der Pigmente erfolgte durch absorptionspektroskopische Messungen, bei denen ein (im Rahmen der Messgenauigkeit) identischer Absorptionskoeffizient des jeweiligen Pigments in den verschiedenen Fraktionen angenommen wurde. Des Weiteren handelt es sich stets um Mittelwerte mehrerer Blutplasma-Chargen, da deren Lipoprotein-Verteilung natürlich auch maßgeblich für die Pigment-Verteilung ist.

Als erstes Tetrapyrrol wurde Pd-BPheid a (WST09) getestet, da dieses auf Grund seiner Verwendung im Rahmen der PDT (siehe Kap. 1.2.2) von besonderer Bedeutung ist. In der VLDL-Fraktion (~3,5%) fand sich wie in der HDP-Fraktion (~7,5%) nur relativ wenig des Pigments, während die Hauptmenge in der LDL-Fraktion (~32%), sowie in der HDL-Fraktion (~57%) lokalisiert war (Abb. 3-6, oben). Die Verteilung der Carotinoide in den verschiedenen Fraktionen war bei allen Blutplasma-Chargen identisch mit der Verteilung, die sich bei einem Experiment ohne zugesetztes Pigment ergab (siehe Abb. 3-5).

Das zweite Pigment, welches näher untersucht wurde, war Zn-BPheid a. Die Wahl fiel auf dieses Pigment, da die Zn-Tetrapyrrole im Gegensatz zu den Pd-Tetrapyrrolen in der Lage sind, mit ihrem Zentralmetall einen Liganden zu koordinieren (siehe Kap. 3.5.5). Auf der anderen Seite sind die Zn-Tetrapyrrole deutlich stabiler als die entsprechenden (natürlichen) Mg-Derivate, die zunächst nicht weiter berücksichtigt wurden. In der VLDL-Fraktion (~1%) fand sich etwas weniger, in der HDP-Fraktion (~9%) etwas mehr Zn-BPheid a als in den Blutplasma-Fraktionen mit Pd-BPheid a. In der LDL-Fraktion (~13%) war jedoch die Pigmentmenge deutlich reduziert, in der HDL-Fraktion (~77%) deutlich erhöht (Abb. 3-6, unten).

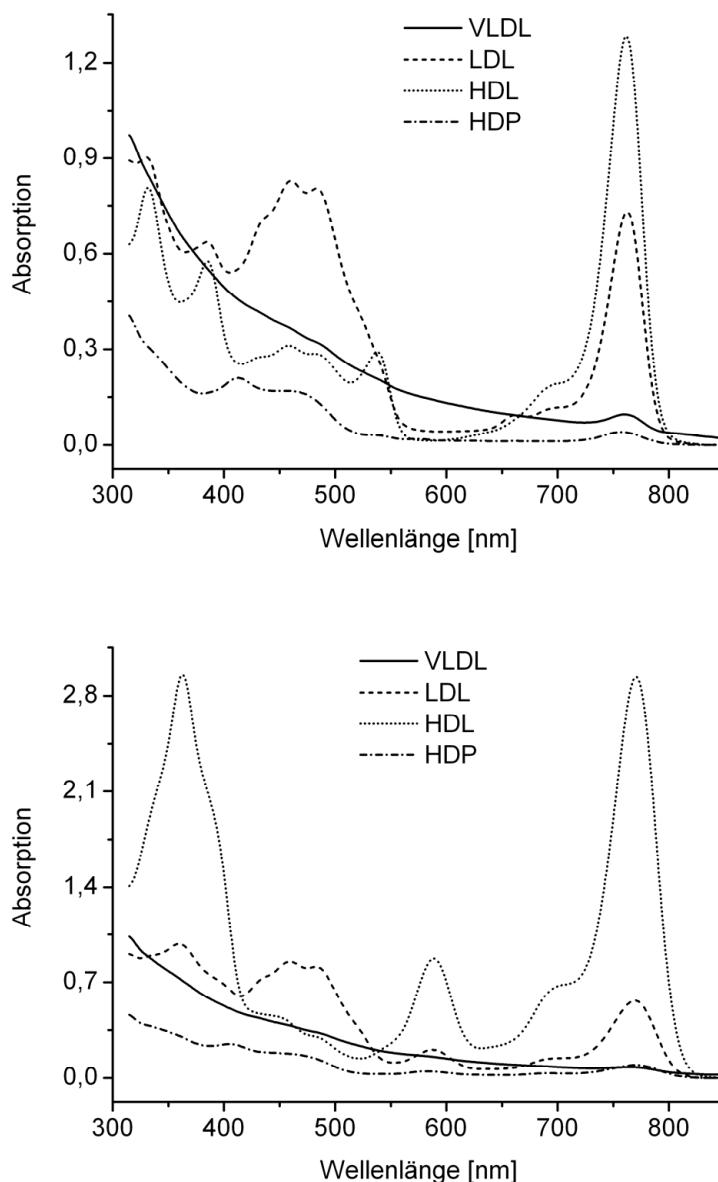


Abb. 3-6: Ausgewählte Absorptionsspektren durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnener Blutplasma-Fractionen nach Inkubation des Blutplasmas mit Pd-BPheid a (oben) oder Zn-BPheid a (unten). Das HDL-Spektrum mit Zn-BPheid a wurde verdünnt gemessen (1:2) und nachträglich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (3) korrigiert.

Die Pigmentverteilung war folglich in unerwartet großem Ausmaß von der Art des zugesetzten Pigments abhängig. Es gab jedoch bei einigen Blutplasma-Chargen relativ große Abweichungen der Pigment-Verteilung von den oben angegebenen Werten, die in den meisten Fällen auf ungewöhnliche Konzentrationen bestimmter Lipoproteine zurückzuführen waren. Dies äußerte sich bei den LDL- und HDL-Fractionen in einer Standardabweichung von ~8% im Falle des Pd-BPheid a bzw. von ~4% im Falle des Zn-BPheid a (Abb. 3-7).

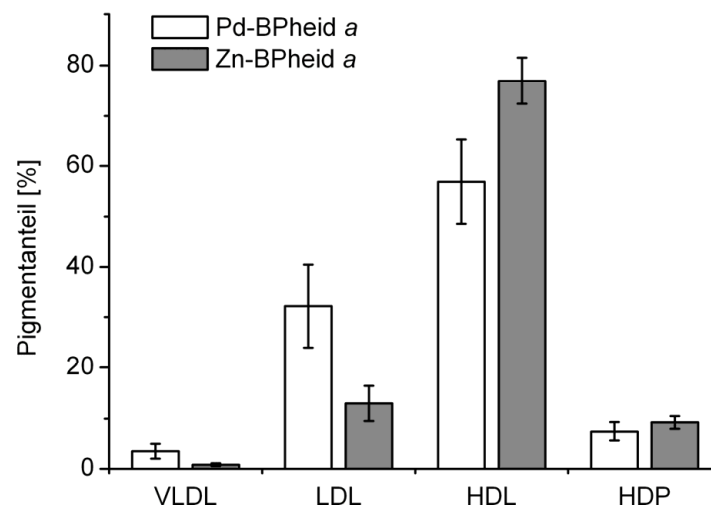


Abb. 3-7: Verteilung von Pd-BPheid a und Zn-BPheid a auf durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnene Blutplasma-Fractionen. n (Pd-BPheid a): 7. n (Zn-BPheid a): 4.

In einem weiteren Experiment konnte die große Bedeutung der Lipoprotein-Konzentrationen auf die beobachtete Pigment-Verteilung sehr anschaulich verdeutlicht werden. Dabei wurde anstelle des „normalen“ Blutplasmas, in dem die Chylomikronen und die VLDL sehr stark reduziert sind, ein natürlich belassenes, d. h. besonders „fettes“ Blutplasmas verwendet.

Die Pigment-Verteilung des Pd-BPheid a verschob sich dadurch dramatisch zugunsten der VLDL-Fraktion (3,5% → 43%). In allen anderen Fraktionen nahm die Pigmentmenge deutlich ab (LDL: 32% → 18%; HDL: 57% → 33%; HDP: 7,5% → 6%). Auffallend ist hierbei, dass die Pigment-Verteilung zwischen den LDL- und HDL-Fractionen nahezu gleich geblieben ist („normal“: 32% / 57% ≈ 0,56; „fett“: 18% / 33% ≈ 0,55).

In *fötalem Kälber-Serum* (FCS) liegt das protein-gebundene Pd-BPheid a (WST09) zu über 90% an HDL assoziiert vor, allerdings aggregiert ein signifikanter Teil des Pigments in der verwendeten Cremophor® EL-Lösung (Brandis *et al.*, 2005). Die Lipoprotein-Verteilung von Pd-BPheid a unterscheidet sich damit erheblich von der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten (Tab. 3-4). Die Differenzen sind jedoch mit den deutlich voneinander abweichenden Pigment-Bindungseigenschaften von menschlichem Serum und FCS zu erklären (Haylett und Moore, 2002). So ist auf der einen Seite die Verteilung einer Mischung verschiedener *Hämatoporphyrinester* (HpE) in menschlichem Serum nahezu identisch mit der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, auf der anderen Seite ähnelt die Verteilung von HpE in FCS sehr der von Pd-BPheid a in FCS.

Tab. 3-4: Einfluss verschiedener Lipoproteinquellen auf die Verteilung von Pd-BPheid a auf durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnene Blutplasma- bzw. Blutserum-Fractionen (a: diese Arbeit; b: Haylett und Moore, 2002; c: Brandis *et al.*, 2005).

Pigment	Lipoproteinquelle	Pigmentverteilung [%]			Ref.
		VLDL	LDL	HDL	
Pd-BPheid a	humanes Blutplasma	4	35	61	a
HpE	humanes Blutserum	2	32	66	b
HpE	FCS	0	12	88	b
Pd-BPheid a	FCS	k. A.	k. A.	>90	c

### 3.3.2 Einfluss des Insertionssystems auf die Pigmentverteilung

Beim CES-Insertionssystem (siehe Kap. 2.4) wurde das Pigment zunächst in einer Mischung (1:1 (v/v)) aus Cremophor® EL und Ethanol konzentriert gelöst. Nachfolgend wurde diese Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung (engl.: *saline* ⇒ CES) auf das 10-fache Volumen verdünnt. Cremophor® EL wird industriell hergestellt durch Reaktion von Ethylenoxid mit Rizinusöl in einem molaren Verhältnis von 35:1. Rizinusöl besteht gewöhnlich zu ~90% aus dem Triglycerid der Ricinolsäure (12-Hydroxy-Ölsäure).

Zu Beginn der Experimente zur Pigmentverteilung wurde reines Dimethylsulfoxid (DMSO) als Insertionssystem verwendet, da in vielen Veröffentlichungen so verfahren wurde. Aufgrund der vielen pharmakologischen Nebenwirkungen ist DMSO als Formulierungsmittel für Photosensibilisatoren nur bedingt zu empfehlen (Jacob und Herschler, 1986; Santos *et al.*, 2003). Daher wird zunehmend das CES-Insertionssystem verwendet, das daher auch in dieser Arbeit als Standard-Insertionssystem definiert wurde.

Das verwendete Insertionssystem hat jedoch einen Einfluss auf die Pigment-Verteilung auf die Blutplasma-Fractionen (Abb. 3-8). Bei Verwendung des CES-Insertionssystems kam es im Vergleich zu entsprechenden Fractionen bei Verwendung des DMSO-Insertionssystems zu einer deutlichen Erhöhung des Pigmentanteils in den LDL-Fractionen (21,5% → 32%). In den drei übrigen Fractionen nahm der Pigmentanteil dagegen geringfügig ab (VLDL: 5% → 3,5%; HDL: 61,5% → 57%; HDP: 12% → 7,5%).

Ähnliches wurde auch bei Verwendung anderer Photosensibilisatoren gefunden. Wird z. B. SnET2 dem Blutplasma in Cremophor® EL solubilisiert zugegeben, so reichert es sich im Vergleich zur Zugabe in Ethanol, DMSO, Cyclodextrinen oder Liposomen gelöst vermehrt in LDL an (Garbo, 1990; Kessel *et al.*, 1991; Polo *et al.*, 1992; Kongshaug *et al.*, 1993).



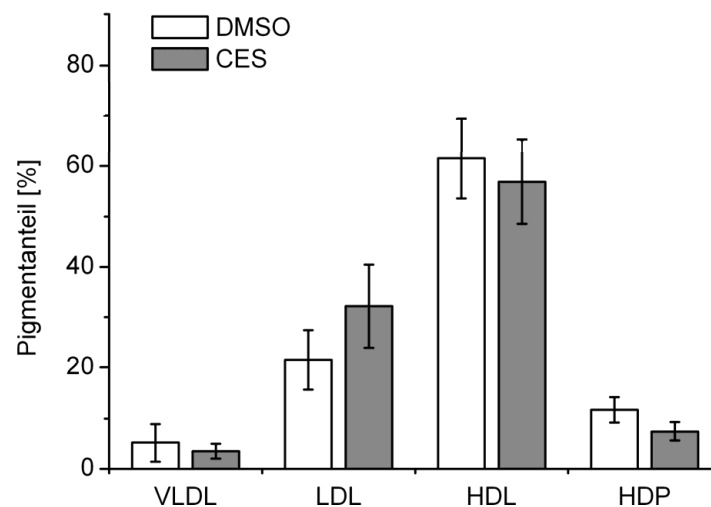


Abb. 3-8: Verteilung von Pd-BPheid a in durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fractionen in Abhängigkeit vom verwendeten Insertionssystem. DMSO: Dimethylsulfoxid; CES: Cremophor® EL / Ethanol / phys. Kochsalzlösung (1:1:18 (v/v/v)) (siehe Kap. 2.4). n (DMSO): 5. n (CES): 7.

Werden derartige Pigmentverteilungen aus Veröffentlichungen entnommen, so muss daher stets das verwendete Insertionssystem beachtet, und die Werte ggf. entsprechend korrigiert werden.

Ein großer Vorteil von Cremophor® EL ist dessen Eigenschaft, dass die gebildeten Mizellen stabiler als die anderer gebräuchlicher Detergentien (z. B. Triton X-100, SDS) sind, und auch noch unterhalb der Cremophor® EL-CMC-Konzentration (0,009% (w/v)) für einige Stunden bestehen bleiben (Kessel, 1992). Jedoch auch Cremophor® EL darf nicht als „inerte“ Substanz angesehen werden (Webster *et al.*, 1997). So wird es u. a. mit der Ausbildung von Hypersensibilität in Verbindung gebracht, und sollte daher nicht mehr bedenkenlos in der klinischen Praxis angewendet werden (Yang *et al.*, 2007).

Des Weiteren ist die Verteilung von Pigmenten auf die Blutplasma-Fractionen oft erheblich von weiteren Parametern der Pigment-Zugabe abhängig. So kann sich bei einer konstanten Pigmentmenge durch Verwendung einer weniger konzentrierten, dafür aber voluminöseren Insertionslösung der Pigment-Anteil in den Lipoprotein-Fractionen von 26,5% auf 93,4% erhöhen, während er sich dementsprechend in der HDP-Fraktion von 73,5% auf 6,6% erniedrigt (Hopkinson *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde dem Blutplasma stets das gleiche Volumen Insertionslösung zugesetzt, und auf ähnliche Pigment-Konzentrationen in dieser Lösung geachtet.

### 3.3.3 Pigmentverteilung auf die HDL-Subfraktionen

Die HDL können weiter in HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> subfraktioniert werden. Als Grenze ist eine Dichte von 1,125 kg/l festgelegt, d. h. die HDL<sub>2</sub> sind im Dichtebereich von 1,063–1,125 kg/l zu finden, die HDL<sub>3</sub> im Dichtebereich von 1,125–1,21 kg/l (siehe Tab. 1-2). Die Dichtegrenze von 1,125 g ml<sup>-1</sup> zur Unterteilung der HDL in die beiden wichtigsten Subfraktionen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> bestand bereits bevor die Fraktionen ihre heutigen Namen erhielten (Havel *et al.*, 1955). Die mittlere Dichte von HDL<sub>2</sub> beträgt ~1,096 g ml<sup>-1</sup>, die von HDL<sub>3</sub> ~1,143 g ml<sup>-1</sup> (Patsch *et al.*, 1980).

HDL-Fraktionen wurden dazu gegen TE-Puffer III dialysiert, dessen Dichte durch Zusatz von Kaliumbromid auf 1,125 kg/l erhöht worden war. Nach Dialyse ü. N. wurden die Fraktionen mittels Zentrifugation in eine leichtere HDL<sub>2</sub>- und eine schwerere HDL<sub>3</sub>-Fraktion getrennt. Zur Quantifizierung der Lipoprotein-Menge in den beiden Subfraktionen wurde die Verteilung des Cholesterins und seiner Ester ermittelt, da deren prozentualer Gehalt an der Lipoprotein-Gesamtmasse sowohl bei HDL<sub>2</sub>, wie auch bei HDL<sub>3</sub> ~18% beträgt (siehe Tab. 1-3). Das Cholesterin(ester)-Verhältnis zwischen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> entspricht daher auch dem Verhältnis der Lipoprotein-Massen. Es wurden vier HDL-Fraktionen analysiert, von denen je zwei aus der gleichen Blutplasma-Charge gewonnen worden waren. Von den beiden HDL-Fraktionen einer Charge war jeweils eine mit Pd-BPheid a, die andere mit Zn-BPheid a beladen.

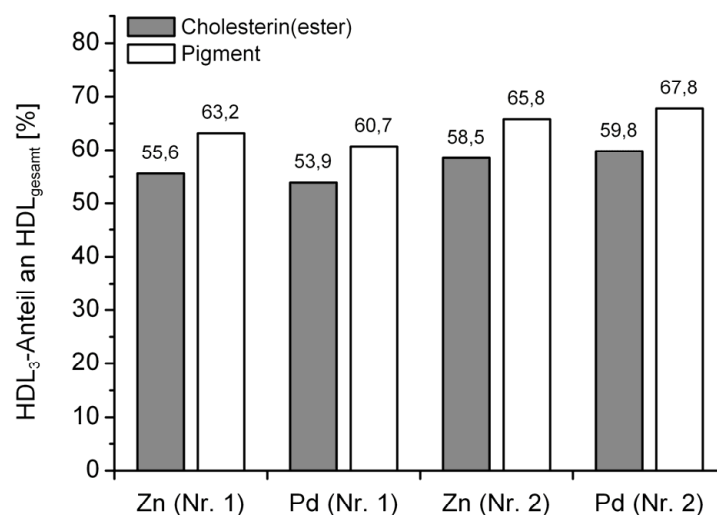


Abb. 3-9: Cholesterin- und Pigmentverteilung zwischen den HDL-Subfraktionen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>. Es sind nur die HDL<sub>3</sub>-Anteile angegeben, die HDL<sub>2</sub>-Anteile ergeben sich aus den zu 100 fehlenden Prozent. Zn, Pd: mit Zn- oder Pd-BPheid a beladene HDL-Fraktion. Nr. 1, Nr. 2: Blutplasma-Chargen-Nummer.

Der HDL<sub>3</sub>-Anteil an HDL<sub>gesamt</sub> (HDL<sub>2</sub> + HDL<sub>3</sub>) betrug gemessen am Cholesterin(ester)-Anteil ~54–60%, dagegen fanden sich ~61–68% der Pigmente in der HDL<sub>3</sub>-Fraktion (Abb. 3-9). Es kam folglich in allen Fällen zu einer ~1,12–1,14-fachen Anreicherung des Pigments in der HDL<sub>3</sub>-Fraktion in Relation zur Lipoprotein-Gesamtmasse.

Diese erhöhte Bindungskapazität lässt sich möglicherweise mit der in Relation zu ihrer Masse größeren Oberfläche der HDL<sub>3</sub>-Partikel im Vergleich zu den HDL<sub>2</sub>-Partikeln erklären. Das Oberfläche/Masse-Verhältnis ist bei einem durchschnittlichen HDL<sub>3</sub>-Partikel um das ~1,16-fache größer als bei einem durchschnittlichen HDL<sub>2</sub>-Partikel. Diese Abschätzung basiert auf der Annahme folgender Durchschnittswerte:  $m(\text{HDL}_2) \approx 360 \text{ kDa}$ ;  $d(\text{HDL}_2) \approx 1,09$ ;  $m(\text{HDL}_3) \approx 200 \text{ kDa}$ ;  $d(\text{HDL}_3) \approx 1,17$ . Dies würde bedeuten, dass die Pigment-Aufnahmefähigkeit der verschiedenen HDL-Klassen im Wesentlichen von der Größe ihrer Oberfläche bestimmt wird.

### 3.4 Pigmentverteilung in humanem Blutplasma II: IGZ-Fraktionierung

Eine alternative Möglichkeit zur Fraktionierung von humanem Blutplasma stellt die Ultrazentrifugation in selbstgenerierenden Iodixanol-Dichtegradienten dar (IGZ; siehe Kap. 2.5). Eine 60%-ige Lösung des ursprünglich als Kontrastmittel entwickelten Iodixanols ist unter dem Namen Optiprep<sup>®</sup> im Handel erhältlich.

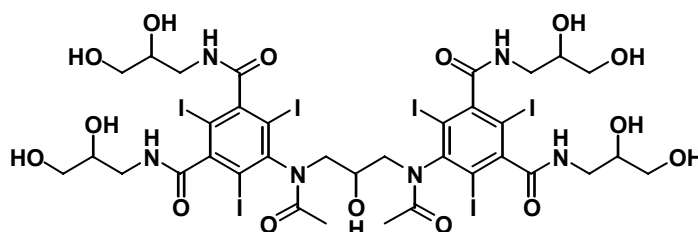


Abb. 3-10: Chemische Struktur von Iodixanol (1,3-Bis(acetylamino)-N,N'-bis[3,5-bis(2,3-dihydroxypropylaminocarbonyl)-2,4,6-triodophenyl]-2-hydroxypropan).

Iodixanol ist nicht nur eine inerte und nicht-ionische Verbindung (Abb. 3-10), seine selbstgenerierenden Dichtegradienten sind des Weiteren durchgehend isoosmotisch, von hoher Reproduzierbarkeit, und großer Stabilität. Das Dichteprofil der Gradienten kann durch Variation der Iodixanol-Startkonzentration und der Zentrifugationsparameter problemlos modifiziert werden (Ford *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1996). Iodixanol ist gegenüber Säuren, Basen, Sauerstoff und Hitze sehr stabil, die zentrale „Brücke“ des Moleküls kann jedoch durch UV-Strahlung in einer *Norrish-Typ-II-Reaktion* gespalten werden (Priebe *et al.*, 1999).

Diese Methode zur Fraktionierung (siehe Kap. 2.5) hat Vor- und Nachteile gegenüber der Fraktionierung mittels sequentieller Dichtezentrifugation (siehe Kap. 2.4). Sie ist vor allem zur Analyse der Pigmentverteilung in Blutplasma-Fractionen geeignet, da pro Ansatz nur 4 ml Blutplasma und maximal 2 OD·ml<sub>Ether</sub> Pigment benötigt werden. Die benötigte Zeit für die Fraktionierung inklusive Pigment-Inkubation und vollständiger Auswertung beträgt nur einen Tag (davon 4 h Zentrifugationszeit), allerdings erfolgt nur eine relativ unvollständige Trennung der Fraktionen. Dagegen benötigt die Fraktionierung mittels sequentieller Dichtezentrifugation 5 Tage (davon 92 h Zentrifugationszeit), liefert allerdings sauber voneinander getrennte Fraktionen. Durch die stark hyperosmotischen Salz-Konzentrationen kommt es zudem durch Wasserentzug zu Dichte-Veränderungen der Lipoproteine. Zwar werden pro Ansatz (2 UZ-Röhrchen) 55 ml Blutplasma und mindestens 100 OD·ml Pigment benötigt, jedoch werden auch ~18 ml von jeder Lipoprotein-Fraktion erhalten, wodurch genug Material für viele nachfolgende Versuche zur Verfügung steht.

### 3.4.1 Iodixanol-Gradienten: Fraktionen und Dichteverteilung

In den durch Zentrifugation entstandenen Iodixanol-Blutplasma-Gradienten bilden sich fünf zumeist bereits mit dem bloßen Auge deutlich unterscheidbare Banden aus (Abb. 3-11, links). Unmittelbar im Bereich des oberen Endes des UZ-Röhrchens war die milchig weiße Bande der VLDL erkennbar. Durch eine klare Zwischenphase getrennt folgte darunter die durch die hohe Konzentration an Carotinoiden stark gefärbte Bande der LDL. Diese ging ohne eine vollständige Trennung in die zumeist nur sehr schwach gefärbte Bande der HDL über. Ebenfalls nur unvollständig getrennt von den HDL folgte eine intensiv rot gefärbte Bande, die stets nur eine Höhe von ~1 mm aufwies. Mikroskopische Untersuchungen dieser Bande zeigten, dass es sich dabei um rote Blutkörperchen handelte, die in allen Blutplasma-Chargen als Verunreinigungen in geringer Konzentration vorhanden waren (ohne Abb.). Als fünfte und letzte Bande folgte die stark gelblich gefärbte Bande der HDP, welche nach unten fast ohne einen Übergangsbereich durch die reine Optiprep™-Lösung begrenzt wurde.

Vor Zentrifugation enthielt das UZ-Röhrchen drei Flüssigkeitsschichten unterschiedlicher Dichte. Zuoberst eine Schicht Te-Puffer I (0,5 ml,  $\rho$ : 1,000 kg/l), darunter die Schicht Blutplasma mit 10% Iodixanol (4,0 ml;  $\rho$ : ~1,074 kg/l), abschließend eine Schicht der reinen Optiprep™-Lösung (0,6 ml;  $\rho$ : 1,320 kg/l). Nach Zentrifugation ergab sich ein Dichteverlauf entlang der Längsachse des UZ-Röhrchens, der besonders in der Mitte des Gradienten durch einen relativ flachen Verlauf die weitgehende Trennung der beiden sehr wichtigen LDL- und HDL-Banden ermöglichte (Abb. 3-11, rechts).

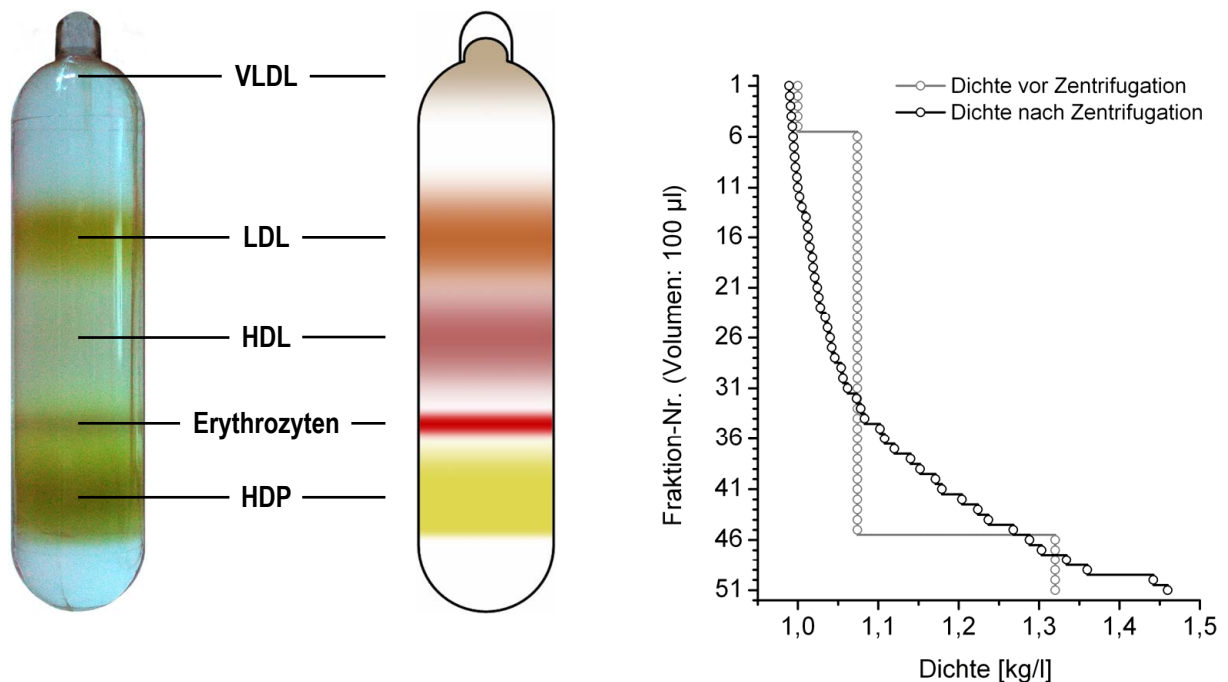


Abb. 3-11: Photographie eines durch Zentrifugation generierten Iodixanol-Blutplasma-Gradienten mit  $4,0 \text{ OD} \cdot \text{ml}_{\text{Ether}}$  Pd-BPheid *a* (links) und dessen über den Brechungsindex ermittelter Dichteverlauf entlang der Längsachse (rechts). Die zartrosa gefärbten HDL (siehe Anhang E), sowie die milchig weißen VLDL wurden von der Digitalkamera nur unzureichend erfasst. Deshalb ist zusätzlich ein schematisches Bandenmuster abgebildet (Mitte). Zur Messung des Brechungsindex wurde der Iodixanol-Gradient (5,1 ml) in 51 Fraktionen á 100 µl fraktioniert. Alle Fraktionen wurden vom Boden des am oberen Ende geöffneten UZ-Röhrchens mittels einer Spritze entnommen. Eine Eichgerade zur Umrechnung des Brechungsindex in die Dichte wurde separat dazu erstellt (siehe Kap. 2.5.1).

Die Dichte der Lipoprotein-Fractionen war in allen Fällen deutlich geringer als in entsprechenden durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen. Dies ist dadurch bedingt, dass Iodixanol eine isoosmotische Flüssigkeit in Relation zum Blutplasma darstellt, wodurch die Proteine ihre natürliche Hydrathülle behalten (Graham *et al.*, 1996; Graham, 2001). Der Effekt nimmt daher mit dem Protein-Gehalt der Lipoproteine zu (VLDL < LDL < HDL). In den stark hyperosmotischen Salzgradienten dagegen, wie sie im Rahmen der sequentiellen Dichtezentrifugation verwendet werden, kommt es zu einem Wasserverlust der Proteine, und dadurch zu einer Erhöhung der Lipoprotein-Dichte.

Bei der IGZ fanden sich die LDL im Dichtebereich von 1,008–1,026 kg/l, die HDL im Dichtebereich von 1,027–1,12 kg/l. Diese Werte sind nahezu identisch mit den in der Originalpublikation angegebenen Werten von 1,010–1,030 kg/l für LDL, und 1,03–1,14 kg/l für HDL (Graham *et al.*, 1996). In Volumen umgerechnet bedeutet dies für alle Werte Abweichungen von weniger als 100 µl, d. h. lediglich einer Fraktion.

Andere Autoren geben Bereiche von 1,016–1,043 kg/l für LDL, und von 1,043–1,119 kg/l für HDL an (Yee *et al.*, 2008). Die Erythrozyten mit einer Dichte von ~1,11 kg/l befinden sich noch knapp innerhalb des Dichtebereichs der HDL. Bei den in Iodixanol ermittelten Dichtebereichen handelt es sich folglich um die tatsächlich im Blutplasma existenten Dichten der Lipoproteine, die gewöhnlich in fast allen Veröffentlichungen verwendeten Dichtebereiche sind dagegen Artefakte durch die traditionelle Lipoprotein-Fraktionierung in stark hyperosmotischen Salz-Gradienten.

### 3.4.2 Iodixanol-Gradienten: Spektroskopische Erfassung

Die Iodixanol-Blutplasma-Gradienten wurden mittels eines selbstkonstruierten Scanners spektroskopisch erfasst (Details siehe Kap. 2.5.2). Dieser schob die UZ-Röhrchen entlang ihrer Längsachse, beginnend mit ihrem oberen Ende, mit einem konstanten Vortrieb von ~20 mm/min an zwei feststehenden, zu einem DAD-Spektrophotometer führenden Lichtleitern vorbei, wodurch eine Erfassung des gesamten UZ-Röhrchens (Länge: ~50 mm) in nur ~2½ Minuten abgeschlossen war. Es wurde dabei eine Integrationszeit von einer Sekunde pro Spektrum verwendet, so dass insgesamt ~150 Spektren erstellt wurden. Dies bedeutet eine Auflösung von ~3 Spektren/mm.

Die Gradienten waren äußerst stabil, nach über 18 Stunden waren keine nachweisbaren Veränderungen der Bandenformen feststellbar (ohne Abb.) Gleiches wurde bereits für die Banden von LDL-Subfraktionen beobachtet (Davies *et al.*, 2003)

Von den dadurch entstandenen 3D-Densitogrammen konnte jedoch stets nur der mittlere Bereich, in dem die UZ-Röhrchen eine zylindrische Form aufweisen (Länge: 40 mm), verwendet werden (Abb. 3-12, oben). In den beiden halbkugelförmigen Bereichen am oberen und unteren Ende des Röhrchens dagegen kam es durch die zunehmende Streuung, bedingt durch die starke Krümmung der Röhrchenwand, sowie durch die zunehmende Verkürzung der Schichtdicke zu unauswertbaren Spektren. Daher konnte die VLDL-Fraktion, die sich vollständig im Bereich der oberen Halbkugel befand, mit dieser Methode nicht erfasst werden.

Die Berechnung der Pigmentverteilung erfolgte in allen Fällen mit der im Folgenden näher beschriebenen Methode. In einem ersten Schritt wurde die Lage des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums des zugesetzten Pigments bestimmt. Dann wurde dem 3D-Densitogramm der Absorptionsverlauf bei dieser Wellenlänge entnommen.

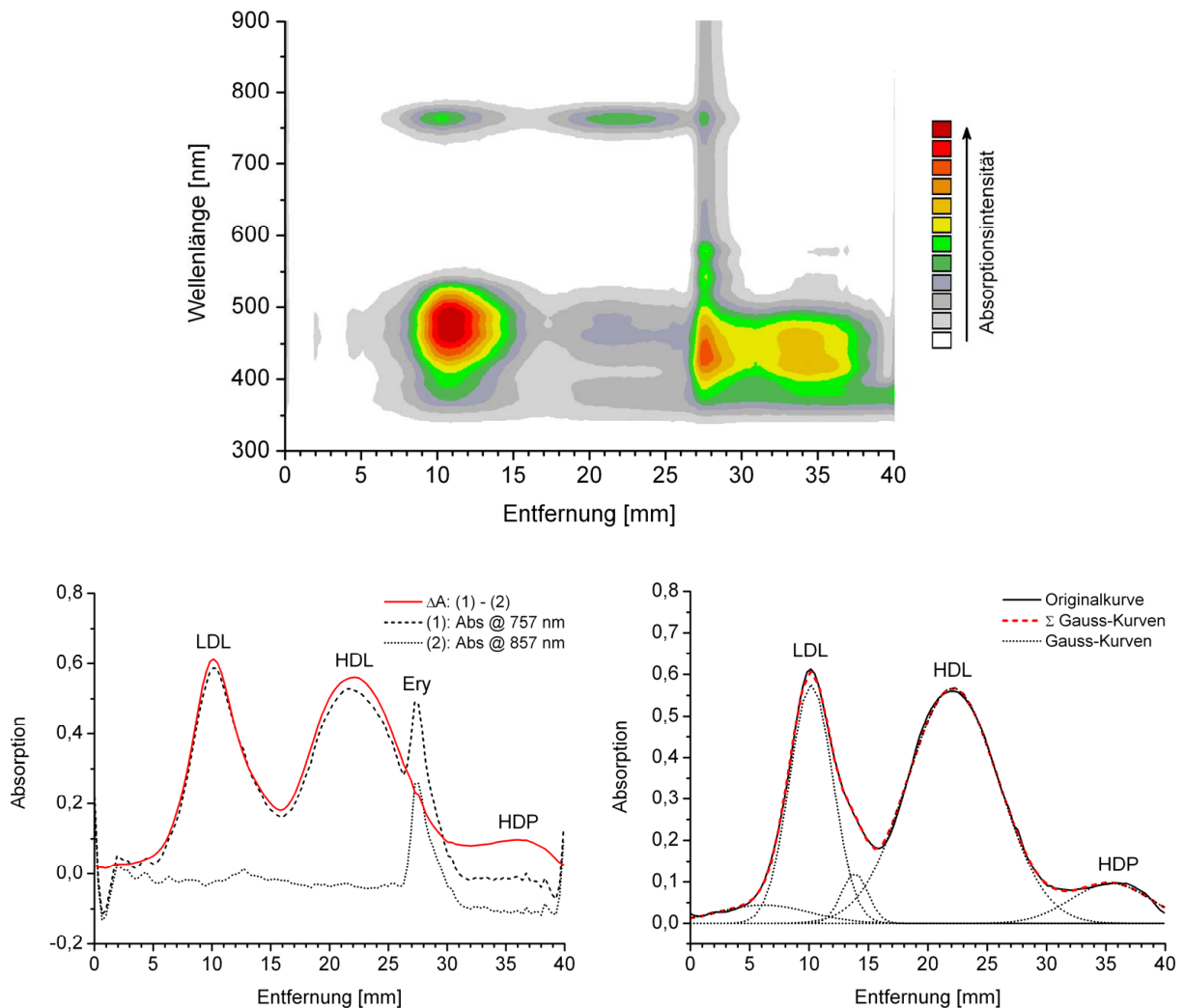


Abb. 3-12: Farbcodiertes 3D-Densitogramm der absorptionspektroskopischen Erfassung eines Iodixanol-Blutplasma-Gradienten mit  $2,0 \text{ OD} \cdot \text{ml}_{\text{Ether}}$  Pd-BPheid a (oben) und Berechnung der Pigmentverteilung auf den Blutplasma-Fractionen (unten). Erläuterungen zur Berechnung der Pigmentverteilung durch Erstellung eines basislinienkorrigierten 2D-Densitogramms (unten links), sowie durch dessen Zerlegung in Gauss-Kurven (unten rechts) siehe Text. Ery: Erythrozyten.

Da es jedoch stets durch leichte Vibrationen des Scanner-Systems zu geringfügigen Veränderungen der Basislinie über die gesamte Dauer des Scans kam, wurde von diesem Absorptionsverlauf der 100 nm bathochrom verschobene Absorptionsverlauf subtrahiert (Abb. 3-12, unten links). Dadurch konnten alle auftretenden Veränderungen der Basislinie erfolgreich korrigiert werden. Das dadurch erhaltene basislinienkorrigierte 2D-Densitogramm wurde anschließend mittels eines computergenerierten Fits in mehrere Gauss-Kurven zerlegt (Abb. 3-12, unten rechts). Nach einer Zuordnung der einzelnen Gauss-Kurven zu den verschiedenen Blutplasma-Fractionen wurde die Pigmentverteilung berechnet, indem die Flächeninhalte der Gauss-Kurven miteinander in Relation gesetzt wurden.

Die aus den 3D-Densitogrammen erhaltenen Absorptionsspektren waren in allen Fällen nahezu identisch mit den Spektren der entsprechenden Fraktionen, die durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnen wurden (Abb. 3-13; vgl. Abb. 1-6, oben). Lediglich im kurzwelligen Spektralbereich war eine Absorptionserhöhung feststellbar, da die Absorptionsspektren aller Lipoprotein-haltigen Proben normalerweise mit einem mit einer Ulbricht-Kugel ausgestatteten Spektrophotometer gemessen wurden. Im Vergleich zu ohne Ulbricht-Kugel gemessenen Absorptionsspektren war dagegen kein Unterschied erkennbar. Besonders stark ausgeprägt ist diese Absorptionserhöhung bei sehr großen Partikeln, wie z. B. den Erythrozyten; diese ist hier selbst im langwelligen Bereich des Spektrums deutlich sichtbar ( $OD_{900}$ :  $\sim 0,25$ ).

Bei allen derart gewonnenen Absorptionsspektren ist zu beachten, dass die verwendeten UZ-Röhrchen einen Innendurchmesser von 12 mm aufweisen. Da die UZ-Röhrchen bezogen auf die Lichtleiter exakt mittig im Scanner positioniert waren, lag die Absorption  $\sim 20\%$  über der als normal definierten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Da es sich dabei jedoch um eine über die Länge des UZ-Röhrchens konstante Abweichung handelte, wurden die basislinienkorrigierten 2D-Densitogramme nicht mit einem Korrekturfaktor modifiziert.

Die maximale Absorption in den basislinienkorrigierten Densitogrammen lag bei allen für die folgenden Auswertungen berücksichtigten Gradienten im linearen Bereich, d. h. sie blieb unter einem Wert von  $\sim 1,2$ .

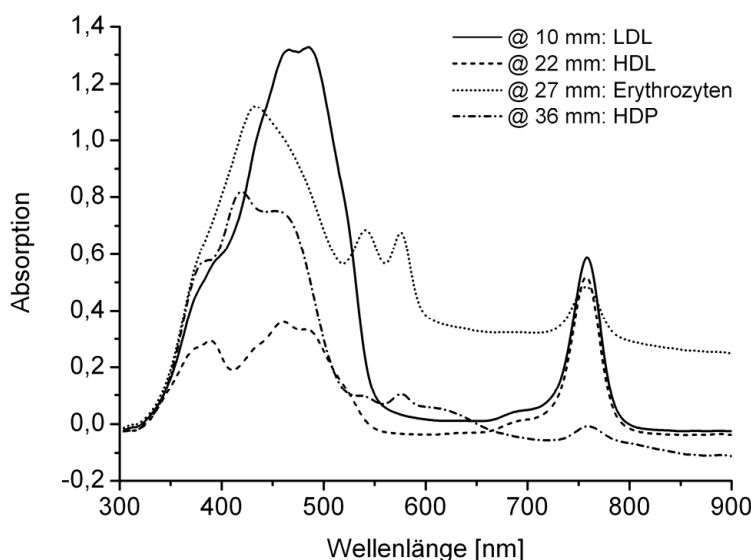


Abb. 3-13: Absorptionsspektren der wichtigsten Fraktionen eines Iodixanol-Blutplasma-Gradienten mit Pd-BPheid a. Die Spektren wurden direkt aus dem in Abb. 3-12 gezeigten 3D-Densitogramm entnommen ( $\Rightarrow$  Schichtdicke: 12 mm). Erythrozyten waren sehr häufig in geringen Konzentrationen als Verunreinigung in den Blutplasmen enthalten.



### Optimierung der zugesetzten Pigmentmenge

Um die zugesetzte Pigmentmenge zu optimieren, wurde in einem Vorversuch Blutplasma mit verschiedenen Konzentrationen an Pd-BPheid a (WST09) inkubiert. Es zeigte sich, dass die Flächeninhalte der gefitteten Gauss-Kurven (vgl. Abb. 3-12, unten rechts) linear mit der zugesetzten Pigmentmenge korreliert waren (Abb. 3-14).

Da einige Pigmente bereits bei einer zugesetzten Pigmentmenge von 4,0 OD·ml<sub>Ether</sub> in den Iodixanol-Blutplasma-Gradienten Absorptionen über 1,5 bei der originalen Schichtdicke von 12 mm aufwiesen, wurden in allen folgenden Experimenten 2,0 OD·ml<sub>Ether</sub> des jeweiligen Pigments verwendet.

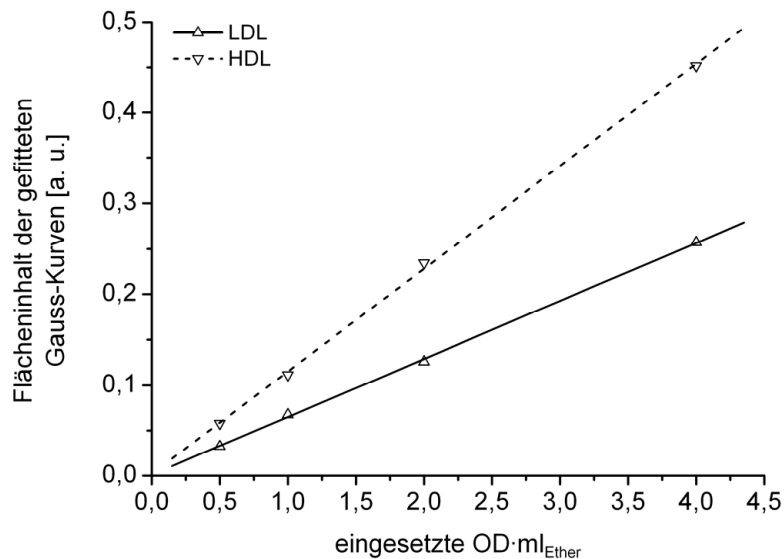


Abb. 3-14: Pigmentverteilung in Abhängigkeit von der zugesetzten Pigmentmenge. Es wurden jeweils 4 ml Blutplasma, die mit 0,5, 1, 2, oder 4 OD·ml<sub>Ether</sub> Pd-BPheid a inkubiert worden waren, in einem Iodixanol-Gradienten aufgetrennt. Aufgetragen sind die mittels eines computergenerierten Fits ermittelten Flächeninhalte (vgl. Abb. 3-12, unten rechts) der zu den LDL- und HDL-Fractionen gehörenden Gauss-Kurven.

#### **3.4.3 Pigmentverteilung auf die LDL-Subfraktionen**

Teilweise kam es zu einer bevorzugten Bindung von Pigmenten an eine LDL-Subfraktion mit geringer Dichte (Abb. 3-15, links). Dies äußerte sich in einer Verschiebung des Maximums der Pigment-Absorption um ~1 mm in Richtung des oberen Endes des UZ-Röhrchens. Auch in den zugehörigen Absorptionsspektren ist dies durch ein verändertes Verhältnis der Pigment- zur Carotinoid-Hauptbande erkennbar (Abb. 3-15, rechts).

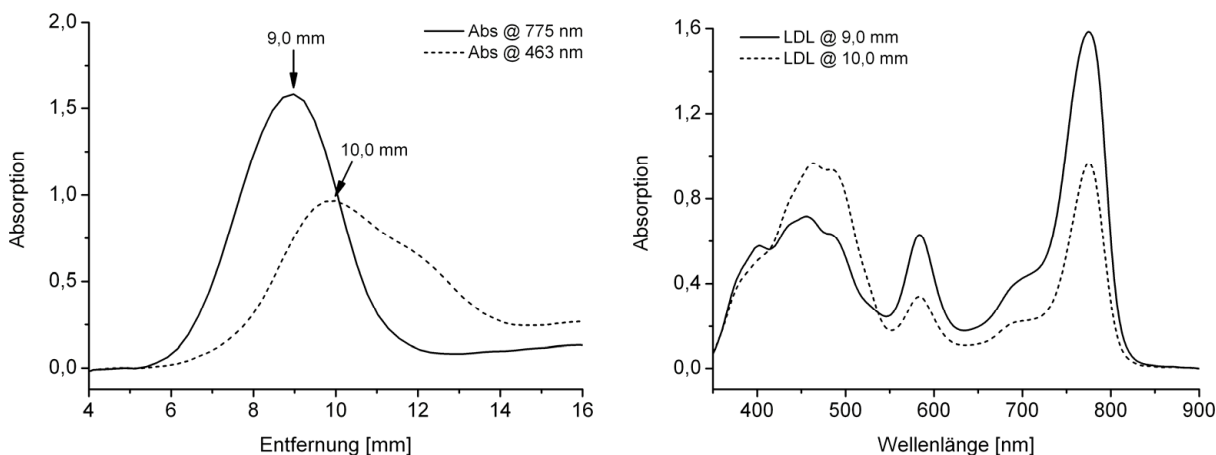


Abb. 3-15: Densitogramme bei 775 nm ( $Q_y$ -Abs.maximum des BChl *a*) und 463 nm (Carotinoid-Abs.maximum) in einem Iodixanol-Blutplasma-Gradienten mit BChl *a* entlang des UZ-Röhrchens (links), sowie Absorptionsspektren bei den jeweiligen Maxima der BChl *a*- (9,0 mm) bzw. Carotinoid-Absorption (10,0 mm) (rechts).

Die LDL-Subfraktion geringer Dichte enthält weniger Carotinoide, bindet dafür aber mehr zugesetzte Tetrapyrrole. Dieser Effekt war besonders deutlich bei all denjenigen Tetrapyrrolen zu beobachten, die überwiegend an LDL gebunden vorliegen (z. B. BChl *a*, siehe Kap. 3.4.5), und steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer beobachteten Fusion von niedrig konzentriertem Cremophor<sup>®</sup> EL (1–3 mg/ml) mit einer LDL-Subfraktion niedriger Dichte (Kongshaug *et al.*, 1991). Aus diesem Grund ist dieser geringfügige Unterschied in der exakten Position der Absorptionsmaxima in Abb. 3-12 (oben) nur sehr schwer zu erkennen, da nur relativ wenig Pd-BPheid *a* an LDL bindet.

### 3.4.4 Vergleich mit der SDZ-Fraktionierung

Im direkten Vergleich der Fraktionierungsmethoden war bei keinem der untersuchten Pigmente ein signifikanter Unterschied in dessen Verteilung auf die LDL- und HDL-Fractionen festzustellen (Abb. 3-16), d. h. der Zusatz von Iodixanol oder Salzen änderte nichts an der nach Inkubation vorliegenden Pigmentverteilung.

Dies ist der eindeutige Beweis dafür, dass die Pigmentverteilung durch physiko-chemische Eigenschaften der Pigmente hervorgerufen wurde, und nicht zumindest z. T. einen Artefakt der Fraktionierung darstellte. Alle im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte zur Pigmentverteilung von Tetrapyrrolen auf Lipoproteine sind folglich ausnahmslos miteinander vergleichbar, unabhängig von der verwendeten Fraktionierungsmethode.

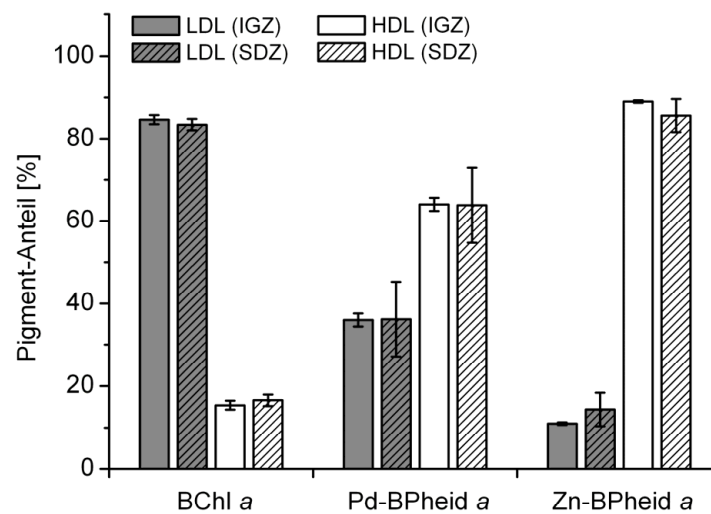


Abb. 3-16: Verteilung verschiedener Pigmente auf die LDL- und HDL-Fraktionen in Abhängigkeit von der verwendeten Fraktionierungsmethode. Es wurden hierfür exemplarisch die Ergebnisse für BChl a, Pd-BPheid a (WST09), und Zn-BPheid a ausgewählt. Die Pigmentverteilungen wurden in allen Fällen absorptionspektroskopisch ermittelt. IGZ, SDZ: IGZ- oder SDZ-Fraktionierung. n (IGZ; alle drei Pigmente): 2; n (SDZ; BChl a: 2); n (SDZ; Pd-BPheid a: 7); n (SDZ; Zn-BPheid a: 4).

### 3.4.5 Verteilung ausgewählter Tetrapyrrole auf die Lipoproteinfraktionen

Aufgrund der sehr großen Unterschiede in der Pigmentverteilung (z. B. LDL mit BChl a: ~85% Pigmentanteil; LDL mit Zn-BPheid a: ~15% Pigmentanteil) wurden 16 bezüglich ihrer chemischen Struktur nahe verwandte Tetrapyrrole ausgewählt, um einen genaueren Einblick in die Gesetzmäßigkeiten dieser Verteilung zu bekommen. Die chemischen Strukturen dieser Pigmente und die Lage ihrer Absorptionsbanden sind ausführlich in Kapitel 3.1 dargestellt, die Absorptionsspektren in Diethylether sind im Anhang D zu finden.

Die Verteilung dieser Pigmente auf die LDL- und HDL-Fraktionen lässt einige deutliche Regelmäßigkeiten erkennen (Abb. 3-17, oben; die genauen Prozentwerte und Standardabweichungen dieser und anderer Verteilungen sind im Anhang F aufgelistet).

Der Phytolrest bewirkte eine Anreicherung in den LDL-Fraktionen, die bei allen Bakteriochlorophyllen weitaus ausgeprägter war als bei ihren Chlorophyll-Analoga. Dagegen wiesen die Bakteriochlorophyllide eine nahezu identische Verteilung wie ihre Chlorophyllid-Analoga auf. Alle Zink-Komplexe reicherten sich im Vergleich zu ihren Mg- und Pd-Analoga, sowie den Zentralmetall-freien Pigmenten stark in den HDL-Fraktionen an.

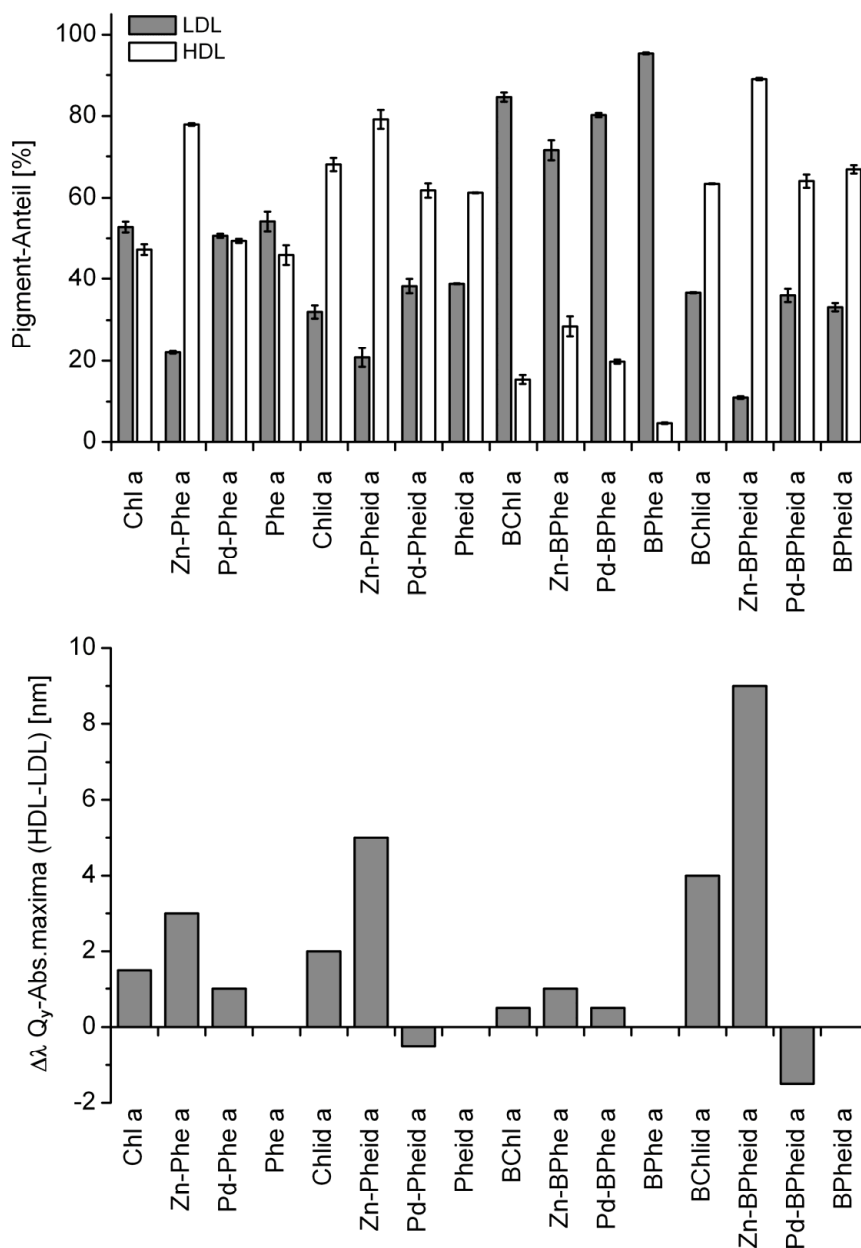


Abb. 3-17: Verteilung ausgewählter Tetrapyrrole auf die LDL- und HDL-Fractionen (oben), sowie Unterschiede in der Lage der Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima zwischen den LDL- und HDL-Fractionen (unten). Das Blutplasma, dem in allen Fällen 2,0 OD·ml<sub>Ether</sub> des jeweiligen Pigments zugesetzt worden war, wurde dazu mittels spektroskopisch erfassten Iodixanol-Gradienten hinsichtlich der Pigmentverteilung und den spektralen Eigenschaften seiner Fractionen analysiert. Chemische Strukturen der Pigmente siehe Kap. 3-1. n = 2–3.

Auch die Lage des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums der Pigmente in den LDL- und HDL-Fractionen folgte gewissen Regelmäßigkeiten (Abb. 3-17, unten). Diese Bande ist aufgrund ihrer Lage im „therapeutische Fenster“ von besonderer Bedeutung für die PDT. Bei drei der vier Zink-Derivate war das Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximum in der HDL-Fraktion stark bathochrom im direkten Vergleich zur Situation in der entsprechenden LDL-Fraktion verschoben.

Die einzige Ausnahme bildete Zn-BPhe *a*, bei welchem jedoch auch die Anreicherung in der HDL-Fraktion am wenigsten stark ausgeprägt war. Da auch beim BChl *a* die Verschiebung deutlich geringer als in allen drei anderen Mg-Derivaten ausfiel, scheint dieser Effekt in direktem Zusammenhang mit der Pigmentverteilung zu stehen. Nur bei den Pd-Derivaten ohne Phytolrest (Pd-Pheid *a* und Pd-BPheid *a*) war das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum in den HDL-Fractionen geringfügig hypsochrom verschoben. Bei allen vier zentralmetallfreien Pigmenten war keine Verschiebung feststellbar, d. h. es handelte sich offenbar bei allen beobachteten Unterschieden in der Lage des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums um Effekte, die direkt oder indirekt durch das Zentralmetall induziert wurden.

### 3.4.6 Verteilung von 3Ac-Chl *a* und 3Vi-BChl *a* auf die Lipoproteinfractionen

Besonders auffallend waren die großen Unterschiede zwischen Chl *a* und BChl *a* bezüglich ihrer Pigmentverteilung (siehe Abb. 3-17, oben). Da sich diese beiden Pigmente in zwei Details ihrer chemischen Struktur voneinander unterscheiden, war es interessant, mit welchem Anteil die beiden Strukturunterschiede zu diesem Ergebnis beitragen.

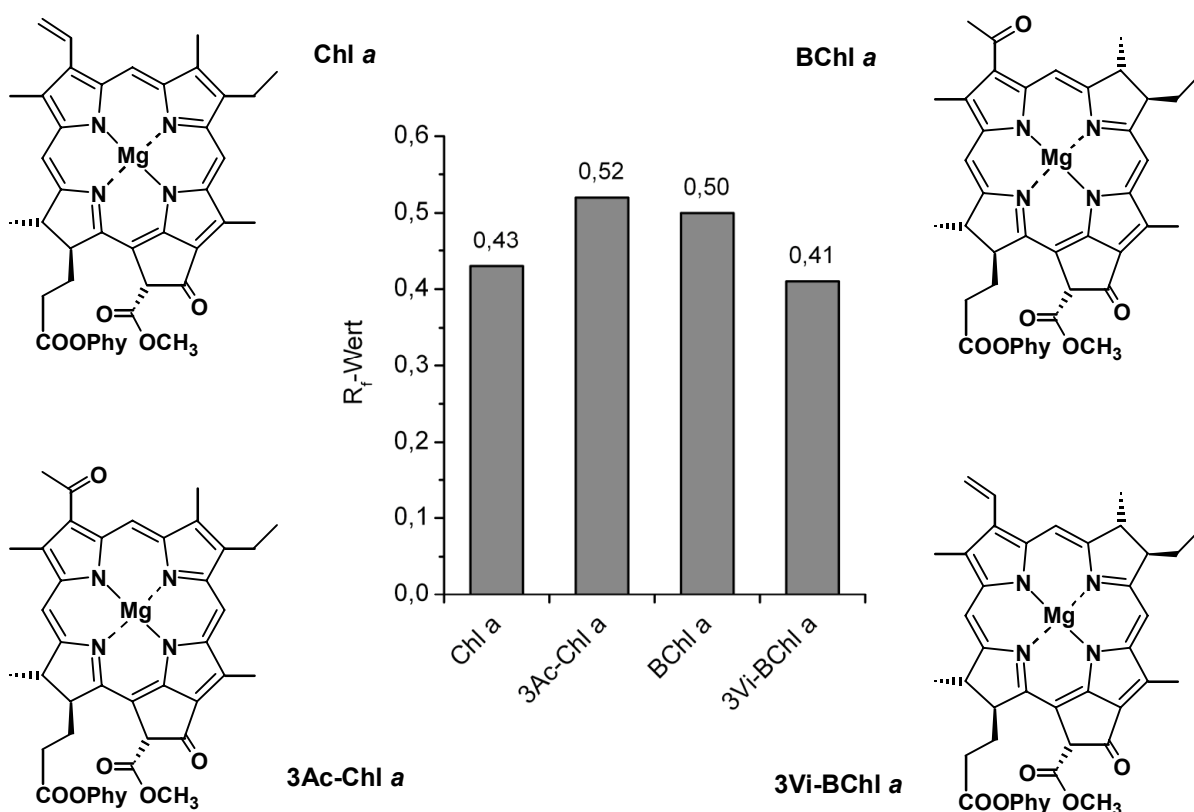


Abb. 3-18: Chemische Strukturen (außen) und  $R_f$ -Werte (Mitte) von Chl *a*, 3-Acetyl-3-devinyl-Chl *a* (3Ac-Chl *a*), BChl *a*, und 3-Vinyl-3-deacetyl-BChl *a* (3Vi-BChl *a*). Die  $R_f$ -Werte wurde mit dem auch zur Reinheitsüberprüfung von (B)Chl *d* *a* verwendeten HPTLC-System ermittelt (siehe Kap. 2.3.5).

Durch Verwendung von 3-Acetyl-3-devinyl-Chl *a* (3Ac-Chl *a*) und 3-Vinyl-3-deacetyl-BChl *a* (3Vi-BChl *a*), d. h. der beiden Pigmente, die sich nur noch in jeweils einem Strukturmerkmal sowohl von Chl *a*, wie auch von BChl *a* unterscheiden (Abb. 3-18, außen), konnte diese Frage beantwortet werden. Die Polarität innerhalb dieser vier Tetrapyrrole wird vor allem durch die C3-Seitenkette bestimmt, was durch eine HPTLC-Analyse verifiziert werden konnte (Abb. 3-18, Mitte). Eine 3-Acetyl-Gruppe führte unabhängig vom vorhandenen Tetrapyrrol-Grundsystem in beiden Fällen zu einer Erhöhung des  $R_f$ -Werts um 0,09 im Vergleich zu einer 3-Vinyl-Gruppe. Die Erhöhung des  $R_f$ -Werts durch ein Chlorin-Grundsystem betrug in beiden Fällen lediglich 0,02 im Vergleich zu einem Bakteriochlorin-Grundsystem.

Dagegen wurde die Pigmentverteilung überraschenderweise nur geringfügig von der C3-Seitenkette, sondern im Wesentlichen vom Tetrapyrrol-Grundsystem bestimmt (Abb. 3-19). Eine 3-Acetyl-Gruppe führte in beiden Fällen lediglich zu einer geringfügigen Erhöhung des Pigmentanteils in den HDL-Fractionen. Dagegen enthielten die beiden HDL-Fractionen mit Chlorin-Derivaten etwa 3½-mal mehr Pigment als die Fractionen der beiden entsprechenden Bakteriochlorin-Derivate. Dies veranschaulicht sehr deutlich, dass die Pigmentverteilung nicht durch die Polarität der Pigmente vorhergesagt werden kann. Die Kriterien für den Einbau eines Tetrapyrrols in ein Lipoprotein müssen folglich weitaus komplexer sein. So könnte z. B. die räumliche Verteilung der polaren Gruppen am Tetrapyrrol-Grundgerüst von Bedeutung sein, oder sterische Effekte der C7- und C8-Seitenketten, aber auch Elektronendichteeffekte im Zentrum des Tetrapyrrols.

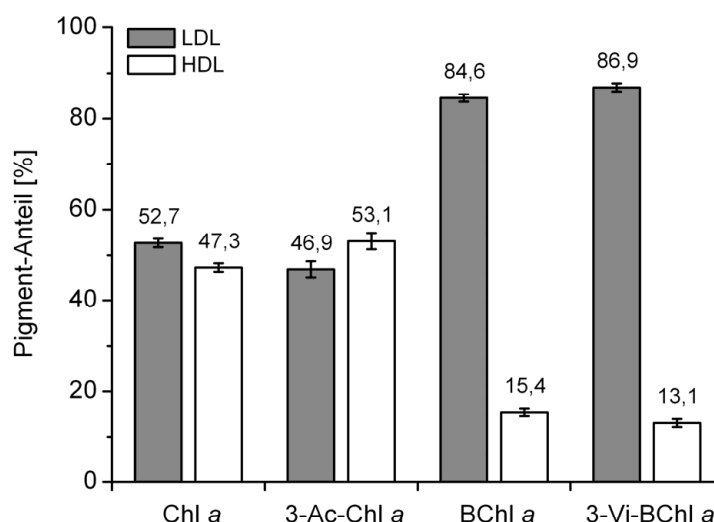


Abb. 3-19: Verteilung von Chl *a*, 3Ac-Chl *a*, BChl *a*, und 3Vi-BChl *a* auf die LDL- und HDL-Fractionen. Das Blutplasma, dem in allen Fällen 2,0 OD·ml<sub>Ether</sub> des jeweiligen Pigments zugesetzt worden war, wurde dazu mittels spektroskopisch erfassten Iodixanol-Gradienten hinsichtlich der Pigmentverteilung analysiert. Chemische Strukturen der Pigmente siehe Abb. 3-18. n = 3.

### 3.4.7 Verteilung polarer Tetrapyrrole auf die Lipoproteinfraktionen

Die bisher vorgestellten Tetrapyrrole, selbst diejenigen ohne Phytol-Rest, zeichnen sich durch eine relativ hohe Hydrophobizität aus. Daher wurden auch hydrophilere bzw. polare Pigmente, d. h. Pigmente mit (für die folgenden Experimente) ausreichender Löslichkeit in wässrigen Lösungen, auf ihre Pigmentverteilung getestet.

Bei den dabei verwendeten Pigmenten handelte es sich zum einen um WST11 (siehe Abb. 3-21) und dessen Pd-freies Derivat, zum anderen um *Photosan*<sup>®</sup>, ein Hämatoporphyrin-Derivat (HpD, siehe Kap. 1.2.1). WST11 ist speziell für die PDT neuer Blutgefäße des Augengewebes ausgelegt, und scheint die umliegenden Gewebe weniger zu schädigen als das am häufigsten verwendete Präparat Visudyne<sup>®</sup> (Berdugo *et al.*, 2008). Als Vergleichspigment in dieser Versuchsreihe diente das bereits vorgestellte Pd-BPheid *a* (WST09). Da sich bei den untersuchten polaren Pigmenten auch in den HDP-Fractionen nicht zu vernachlässigende Pigmentmengen fanden, wurden bei den folgenden Untersuchungen zur Pigmentverteilung auch die HDP-Fractionen neben den LDL- und HDL-Fractionen berücksichtigt.

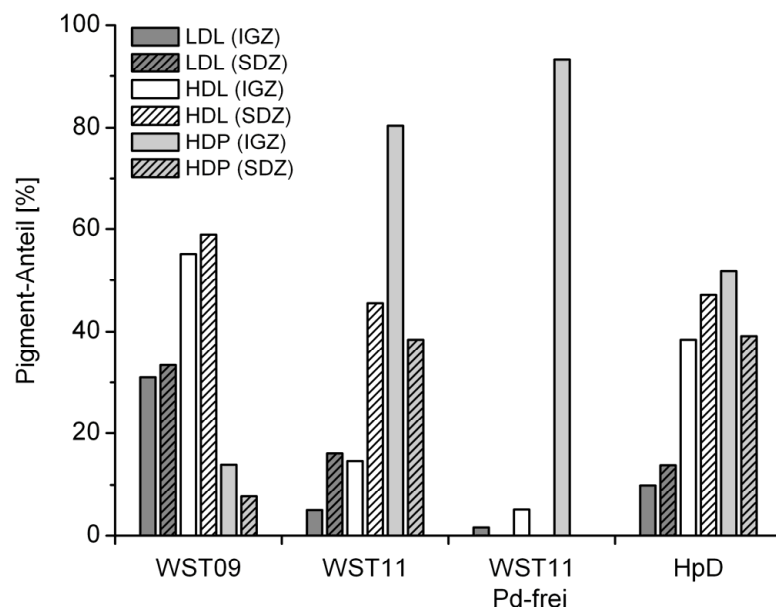


Abb. 3-20: Verteilung von Pd-BPheid *a* (WST09), WST11, Pd-freiem WST11, und HpD auf die LDL-, HDL-, und HDP-Fractionen in Abhängigkeit von der verwendeten Fraktionierungsmethode. Es wurden in allen Fällen 2,0 OD-ml des jeweiligen Pigments zugesetzt, gemessen in Diethylether (WST09) oder Methanol (WST11, HpD). Im Falle des HpD bezieht sich die Angabe auf das Soret-Maximum der Absorption. Die Pigmentverteilung wurde durch spektroskopische Erfassung der Fraktionen analysiert. Die Fraktionierung des Blutplasmas erfolgte durch Fraktionierung mittels Iodixanol-Gradienten (IGZ), oder durch Fraktionierung mittels sequentieller Dichtezentrifugationen (SDZ). Chemische Strukturen der Pigmente siehe Kap. 3.4.8 (WST11) und Kap. 1.2.1 (HpD).

Unabhängig vom zugesetzten Pigment war bei allen Fraktionierungen der Pigmentanteil in der HDP-Fraktion größer, wenn das Blutplasma mittels Iodixanol-Gradienten fraktioniert wurde (Abb. 3-20). Dieser Effekt war mit Pd-BPheid *a* nur gering ausgeprägt, deutlicher jedoch mit HpD, und besonders stark mit WST11. Mit dem Pd-freien WST11 kam es sogar zu einer weiteren Erhöhung des Pigmentanteils in der HDP-Fraktion (>90%).

Das Verhältnis der in den LDL- und HDL-Fractionen vorliegenden Pigmentmengen war dagegen in allen Fällen unabhängig von der verwendeten Fraktionierungsmethode, wodurch die bereits in Abb. 3-16 gezeigten Ergebnisse nochmals bestätigt werden.

### 3.4.8 Verteilung von 3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a* auf die Lipoproteinfraktionen

#### Synthese von 3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a*

Pd-BPheid *a* (WST09) ist sehr gut in organischen Lösungsmitteln (z. B. Diethylether) löslich, in Wasser dagegen praktisch unlöslich. Durch Erhöhung des pH-Wertes ist es zwar möglich, das Verteilungsgleichgewicht zwischen einer Diethylether- und einer wässrigen Phase in Richtung der wässrigen Phase zu verschieben, jedoch aggregiert hierbei ein Großteil des Pigments. Dies ist spektroskopisch durch eine ausgeprägte bathochrome Verschiebung des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums auf über 810 nm erkennbar. WST11 („tauriniertes“ Pd-BPheid *a*) dagegen löst sich sehr gut in Wasser, ist aber in den meisten organischen Lösungsmitteln nahezu unlöslich. Auf der Suche nach einem Pigment, das von seiner chemischen Struktur her WST09 ähnelt, aber besser wasserlöslich ist, wurde 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-Pd-BPheid *a* (3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a*) synthetisiert (Abb. 3-21).

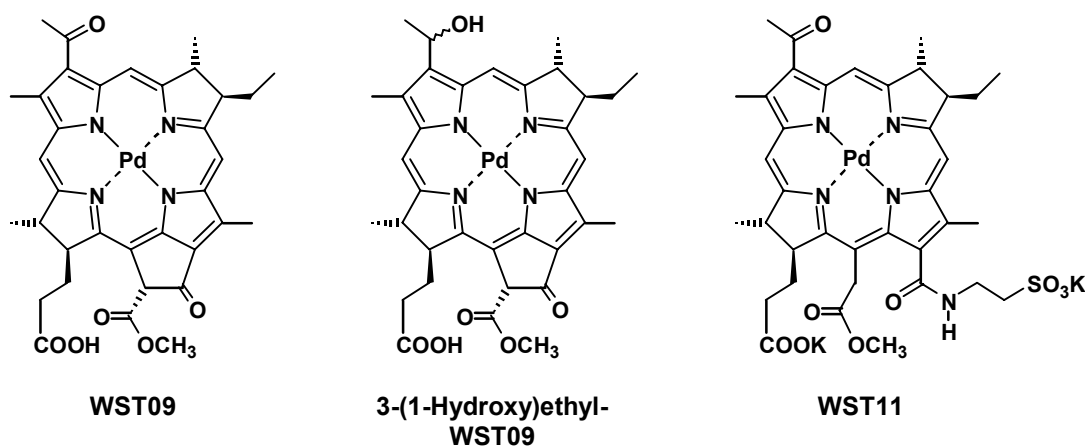


Abb. 3-21: Chemische Struktur von 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-Pd-BPheid *a* (3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a*), Pd-BPheid *a* (WST09), und WST11 (Dikalium-Salz des „taurinierten“ Pd-BPheid *a*).



Dieses Pigment ist durch Reduktion von Pd-BPheid *a* (WST09) mittels Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) zugänglich. An  $\text{C}3^1$  entsteht dabei eine Mischung der beiden Epimere.

Der zeitliche Fortschritt dieser Reaktion ist sehr gut spektroskopisch verfolgbar, da sich das  $\text{Q}_y$ -Absorptionsmaximum des Pigments um  $\sim 46$  nm hypsochrom ( $755 \rightarrow 709$  nm) verschiebt (Abb. 3-22). Die drei übrigen Absorptionsmaxima zeigen deutlich geringere Verschiebungen ( $\text{B}_y$ :  $329 \rightarrow 324$  nm;  $\text{B}_x$ :  $382 \rightarrow 375$  nm;  $\text{Q}_x$ :  $534 \rightarrow 520$  nm).

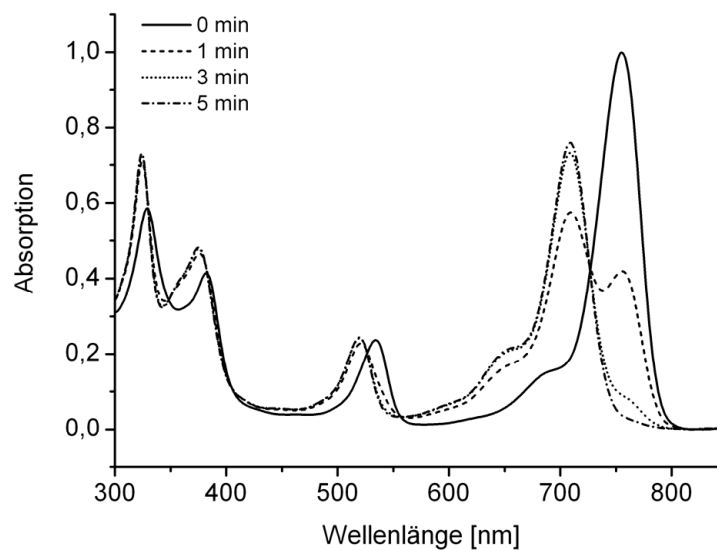


Abb. 3-22: Synthese von 3-(1-Hydroxy)ethyl-Pd-BPheid *a*. Absorptionsspektren vor Zugabe und 1, 3, 5 min nach Zugabe von Natriumborhydrid zu Pd-BPheid *a* in Methanol.

Auch bei der Reduktion von BChl *a* zu 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-BChl *a* ( $3^1\text{OH-BChl a}$ ) verschiebt sich das  $\text{Q}_y$ -Absorptionsmaximum um 43 nm hypsochrom ( $771 \rightarrow 728$  nm) (Struck *et al.*, 1992). Auch in diesem Fall sind bei den übrigen drei Absorptionsmaxima deutlich geringere Verschiebungen zu beobachten (z. B.  $\text{Q}_x$ :  $573 \rightarrow 555$  nm).

#### Löslichkeit von $3^1\text{OH-Pd-BPheid a}$

$3^1\text{OH-Pd-BPheid a}$  zeigt eine relativ ähnliche Verteilung zwischen einer Diethylether- und verschiedenen wässrigen Phasen wie dessen Vorstufe Pd-BPheid *a* (Abb. 3-23). In reinem Wasser ist das Pigment nahezu unlöslich. In TE-Puffer I (pH 7,2) ist die Löslichkeit nur geringfügig höher, dagegen ist in Barbitol-Puffer (pH 8,6) und bei Zusatz von verdünnter Natronlauge das Gleichgewicht sogar deutlich auf der Seite der wässrigen Phase.

Auf eine entsprechende Grafik zur Verteilung von WST09 wurde verzichtet, da in wässriger Umgebung selbst bei erhöhten pH-Werten ein Großteil des Pigments aggregiert vorliegt, und damit eine quantitative Auswertung nahezu unmöglich ist.

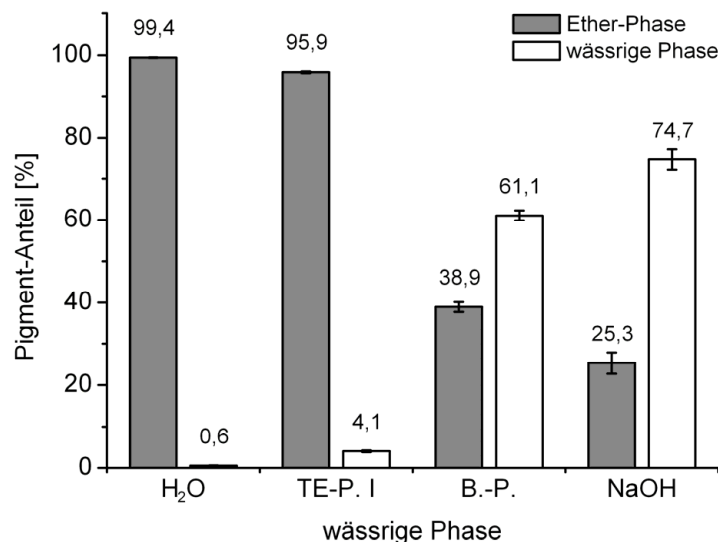


Abb. 3-23: Verteilung von 3<sup>1</sup>-OH-Pd-BPheid *a* zwischen Diethylether- und verschiedenen wässrigen Phasen. Die Verteilung wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt. Die Ansätze enthielten jeweils 1,0 ml Diethylether + 0,9 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> + 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, TE-Puffer I (pH 7,5), Barbitol-Puffer (pH 8,6), oder 0,1 M NaOH.

Im Gegensatz dazu liegt 3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a* in wässriger Lösung ab einem pH-Wert von ~8 fast vollständig in monomerer Form gelöst vor, und ist damit für die Verteilungsexperimente hervorragend geeignet.

### Massenspektren von 3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a*

Die Überprüfung der chemischen Struktur des neu synthetisierten Pigments war mittels einer massenspektroskopischen Untersuchung möglich.

Das Massenspektrum des Edukts Pd-BPheid *a* weist acht Hauptbanden auf (Abb. 3-24), die im Wesentlichen von den sechs Palladium-Isotopen herrühren, von denen fünf eine Häufigkeit >10% an der Gesamtmasse besitzen (<sup>102</sup>Pd: 1,02%; <sup>104</sup>Pd: 11,14%; <sup>105</sup>Pd: 22,33%; <sup>106</sup>Pd: 27,33%; <sup>108</sup>Pd: 26,46%; <sup>110</sup>Pd: 11,72%). Für die übrigen Banden und Intensitätsverschiebungen sind die <sup>13</sup>C-Isotope in den Pigmenten verantwortlich. Dagegen haben die Isotope der übrigen Elemente (H, N, O) nahezu keinen Einfluss auf die Isotopenverteilung.

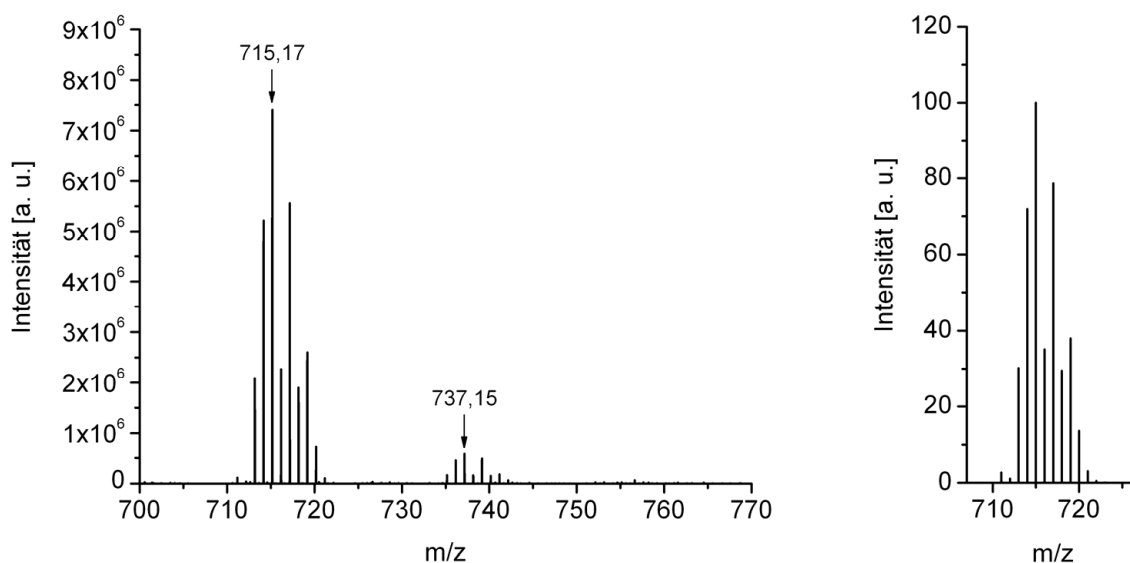


Abb. 3-24: Massenspektrum von Pd-BPheid a (links: gemessen; rechts: theoretisch).

Im Folgenden werden nur die monoisotopischen Massen der Pigmente genannt, d. h. die Massen von ausschließlich aus  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$ , und  $^{106}\text{Pd}$  bestehenden Molekülen. Anhand der Isotopenverteilung kann diese stets eindeutig bestimmt werden. Alle im Folgenden genannten Massen besaßen eine Abweichung  $<2$  mmu von der theoretischen Masse.

Pd-BPheid a ( $^{12}\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}_4^{106}\text{Pd}_1$ ) besitzt eine Masse von 715,17 Da. Des Weiteren ist eine Bande mit einer Masse von 737,15 Da erkennbar, wobei es sich um das Mononatrium-Salz des Pd-BPheid a ( $^{12}\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_4\text{Na}_1^{106}\text{Pd}_1$ ) handelt. Im Vergleich des gemessenen mit dem theoretischen Massenspektrum sind geringfügige Unterschiede in der Isotopenverteilung erkennbar. So besitzt die Bande mit einer Masse von 716,17 Da (im Wesentlichen Pigmente der Zusammensetzung  $^{12}\text{C}_{34}^{13}\text{C}_1\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}_4^{106}\text{Pd}_1$ )  $\sim 30,7\%$  der Intensität der monoisotopischen Bande (Masse: 715,17 Da). Theoretisch sollte dieser Wert aber bei  $\sim 35,1\%$  liegen. Der Grund hierfür ist das Enzym *Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase* (*RuBisCO*), welches  $^{12}\text{C}$  bevorzugt umsetzt ( $\Rightarrow$  *Isotopendiskriminierung*). Auch bei allen anderen Banden ist dieser Effekt nachweisbar (z. B.  $I_{717}/I_{718}$ ; gemessen: 34,2%, theoretisch: 37,5%).

Das Produkt der  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion von Pd-BPheid a ergibt ein Hauptprodukt mit einer Masse von 739,17 Da (Abb. 3-25). Bei diesem Produkt handelt es sich um das Mononatrium-Salz des 3-(1-Hydroxy)ethyl-Pd-BPheid a ( $^{12}\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_4\text{Na}_1^{106}\text{Pd}_1$ ). Das Produkt ohne Natrium ist nur als Nebenprodukt mit einer Masse von 717,19 Da vorhanden ( $^{12}\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_4^{106}\text{Pd}_1$ ). Als dritte Form des Produkts sind noch Spuren eines Dinatrium-Salzes ( $^{12}\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}_4\text{Na}_2^{106}\text{Pd}_1$ ) nachweisbar. Damit konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich bei dem synthetisierten Pigment um 3-(1-Hydroxy)ethyl-Pd-BPheid a handelt, welches auf Grund des verwendeten Natrium-Salzes des Borhydrids überwiegend als Mononatrium-Salz vorliegt.

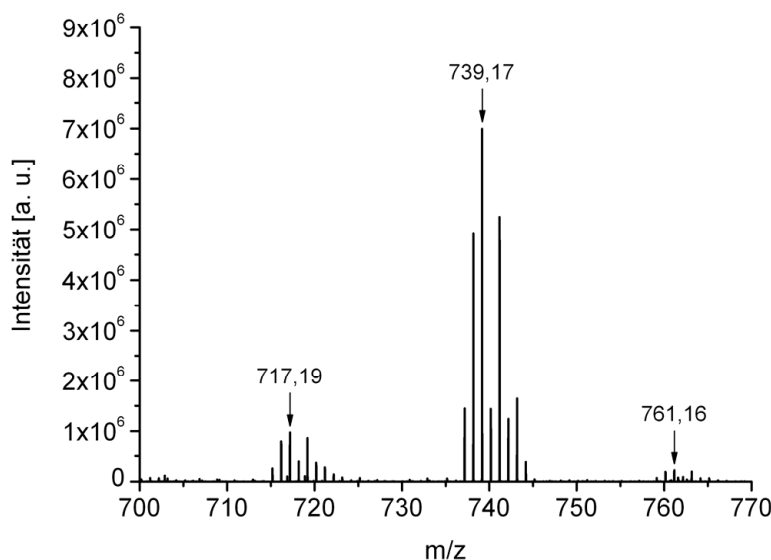


Abb. 3-25: Massenspektrum von 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-Pd-BPheid a ( $3^1\text{OH-Pd-BPheid a}$ ).

Natriumborhydrid ist folglich nicht in der Lage, auch die  $\text{C}13^1$ -Ketogruppe zu reduzieren. Dabei spielt u. a. der  $\text{C}3$ -Substituent eine wichtige Rolle. So wird nur bei Chl a, nicht jedoch bei BChl a, die  $\text{C}13^1$ -Ketogruppe durch Natriumborhydrid reduziert (Holt, 1959; Ditson *et al.*, 1984), obwohl die sterische Hinderung bei Chl a und BChl a identisch ist. Möglicherweise beruht dies auf einer Fernwirkung des  $\text{C}3$ -Substituenten, wie er in ähnlicher Form bereits für die  $\text{C}13^2$ -Hydroxylierung gefunden wurde (Struck *et al.*, 1992).

Freie Carbonsäuren sind dagegen ebenso wenig wie Carbonsäure-Ester durch Borhydride reduzierbar. Diese Reaktionen können nur mit weitaus stärkeren Reduktionsmitteln wie z. B. Lithiumaluminiumhydrid ( $\text{LiAlH}_4$ ) durchgeführt werden. Bei der Reaktion von Pd-BPheid a mit  $\text{LiAlH}_4$  in Diethylether fiel innerhalb der ersten Minute das gesamte Pigment des Ansatzes als rosa gefärbter Niederschlag aus, der jedoch in keinem der getesteten Lösungsmittel wieder aufzulösen war. Es wurden dabei sowohl organische (polare, unpolare), als auch wässrige (saure, neutrale, basische) Lösungsmittel getestet.

#### Pigmentverteilung von $3^1\text{OH-Pd-BPheid a}$

Die Pigmentverteilung des 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-Pd-BPheid a ( $3^1\text{OH-Pd-BPheid a}$ ), das extra für dieses Experiment synthetisiert wurde, stelle sich als höchst interessant heraus.  $3^1\text{OH-Pd-BPheid a}$  verteilte sich in Iodixanol-Gradienten von allen getesteten Pigmenten am gleichmäßigsten auf die drei wichtigsten Blutplasma-Fractionen (Abb. 3-26).

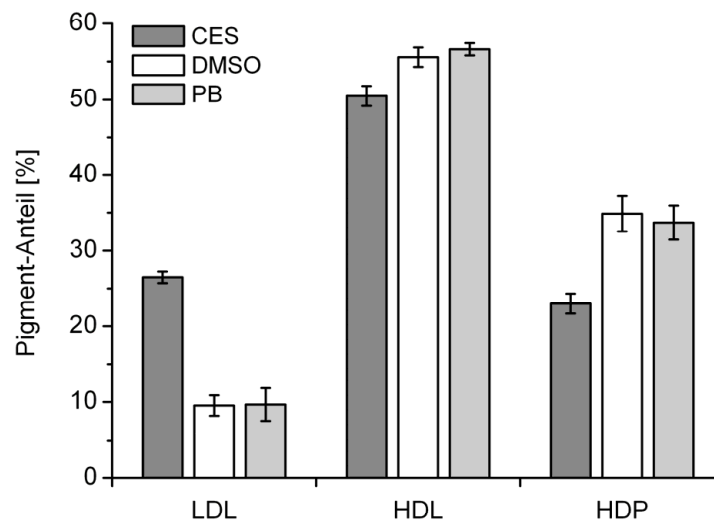


Abb. 3-26: Verteilung von 3-(1-Hydroxy)ethyl-3-deacetyl-Pd-BPheid *a* ( $3^1\text{OH-Pd-BPheid } a$ ) auf die LDL-, HDL-, und HDP-Fractionen in Abhängigkeit vom verwendeten Insertionssystem (CES, DMSO, PB). Das Blutplasma, dem in allen drei Fällen 2,0 OD·ml<sub>Ether</sub> des Pigments zugesetzt worden war, wurde dazu mittels spektroskopisch erfassten Iodixanol-Gradienten hinsichtlich der Pigmentverteilung analysiert. CES, DMSO: vgl. Abb. 3-8. PB: 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,2).

Bei Zugabe mittels des CES-Insertionssystems wurde etwa die Hälfte des Pigments in der HDL-Fraktion, und jeweils etwa ein Viertel in der LDL- und der HDP-Fraktion gefunden. Bei diesem Pigment nahm im Vergleich zu Pd-BPheid *a* der Pigmentanteil in der LDL-Fraktion deutlich stärker ab, wenn das Pigment in DMSO gelöst zugegeben wurde (vgl. Abb. 3-8). Dies ist wahrscheinlich auf die etwas höhere Polarität des  $3^1\text{OH-Pd-BPheid } a$  im Vergleich zu Pd-BPheid *a* zurückzuführen. Wurde das Pigment in Phosphat-Puffer gelöst zugegeben, wurde eine im Vergleich zur Zugabe in DMSO nahezu identische Pigmentverteilung erhalten.

### 3.4.9 Interlipoprotein-Transfer der Pigmente

Die Dynamik der Pigmentverteilung innerhalb der Lipoprotein-Fractionen konnte analysiert werden, indem mit zugesetzten Tetrapyrrolen beladene Lipoproteine mit Lipoproteinen einer anderen Klasse (siehe Tab. 1-2) ohne zugesetztes Pigment gemischt, und nach einer mehrstündigen Inkubation wieder in die ursprünglichen Fractionen getrennt wurden.

Es wurden hierfür durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnene Lipoprotein-Fractionen verwendet. Einige dieser z. T. dialysierten Lipoprotein-Fractionen (LDL, HDL) waren durch Zugabe von Pd- oder Zn-BPheid *a* vor der Fractionierung mit Pigment beladen worden.

Durch Mischung von jeweils 700 µl der drei Lipoprotein-Fraktionen (VLDL, LDL, HDL) mit 1525 µl TE-Puffer I wurden 3625 µl einer Lipoprotein-Mischung mit einer dem Blutplasma identischen Dichte ( $\rho$ : ~1,028 kg/l) erhalten. Lediglich eine der Lipoprotein-Fraktionen war hierbei mit einem zugesetzten Pigment beladen. Nach einer Inkubation über 3 oder 24 Stunden wurde diese Lipoprotein-Mischung mit 725 µl der OptiPrep™-Lösung versetzt, und wie bei der normalen IGZ-Fraktionierung erneut fraktioniert und analysiert (siehe Kap. 2.5).

Die Pigmentverteilung unter den LDL- und HDL-Fraktionen war in allen untersuchten Fällen nach einer 24-stündigen Inkubation identisch, unabhängig davon, ob das Pigment vor der Inkubation direkt dem Blutplasma zugesetzt worden war, oder nur ein Teil der Lipoproteine vor der Inkubation mit diesem Pigment beladen vorlag (Abb. 3-27).

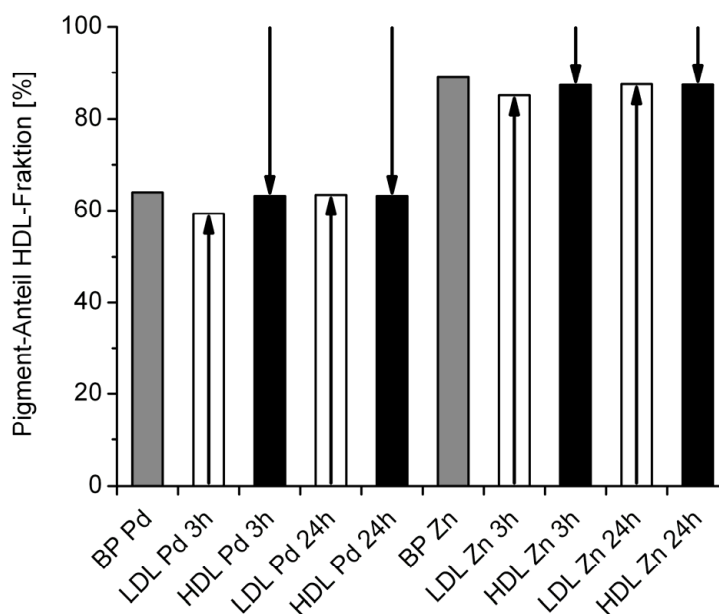


Abb. 3-27: Umverteilung von Pd- und Zn-BPheid a unter den LDL- und HDL-Fraktionen (Details siehe Text). Es sind nur die Pigmentanteile der HDL-Fraktionen angegeben, die Pigmentanteile der LDL-Fraktionen ergeben sich aus den zu 100 fehlenden Prozent. Die Beschriftung gibt jeweils die ursprünglich pigmentbeladene Lipoprotein-Fraktion an. BP: Blutplasma (Vergleichswerte derselben Blutplasma-Charge). Pd, Zn: mit Pd- oder Zn-BPheid a beladene Lipoprotein-Fraktion. Die Pfeile veranschaulichen die Zu- oder Abnahme des Pigmentanteils in Bezug auf den ursprünglichen Anteil in dieser Lipoprotein-Fraktion.

Es wurde hierbei sowohl der Pigmenttransfer von LDL nach HDL, als auch von HDL nach LDL analysiert. Bereits nach einer 3-stündigen Inkubationszeit war der Pigmenttransfer aus den LDL in die HDL im Falle des Pd-BPheid a zu ~94%, im Falle des Zn-BPheid a zu ~97% abgeschlossen.

Der umgekehrte Pigmenttransfer aus den HDL in die LDL war sogar noch schneller und nach dieser Inkubationszeit bereits zu 100% abgeschlossen. Daraus folgt, dass selbst das in der HDL-Fraktion stark angereicherte Zn-BPheid a, bei dem von einer spezifischen Bindung an HDL-Bestandteile ausgegangen werden muss, relativ schnell mit der Umgebung austauscht.

Zn(II)-Phthalocyanin (ZnPc) weist ebenfalls nach einem Interlipoprotein-Transfer zwischen ZnPc-beladenen LDL (oder HDL) und ZnPc-freien HDL (oder LDL) in Abhängigkeit vom LDL/HDL-Mengenverhältnis stets die gleiche LDL/HDL-Verteilung auf (Polo *et al.*, 1995). Auch mit SnET2 beladene LDL erzeugen bei Zugabe von frischem Blutplasma wieder die ursprüngliche SnET2-Verteilung auf die Blutplasma-Fraktionen (Kessel *et al.*, 1993).

## 3.5 Charakterisierung der Lipoproteinfraktionen

### 3.5.1 Chemische Zusammensetzung der Lipoproteinfraktionen

Eine der wichtigsten Charakterisierungen von Lipoproteinen ist die Quantifizierung ihrer chemischen Zusammensetzung (siehe Tab. 1-3). Ermöglicht wurde diese durch mehrere käuflich erwerbbar Testreagenzien, die durch eine absorptionsspektroskopisch messbare Farbstoffbildung die exakte Konzentrationsbestimmung der vier Wesentlichen Lipoprotein-Bestandteile ermöglichen (siehe Kap. 2.7). Cholesterin und die Cholesterinester wurden dabei nicht weiter unterschieden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse einer ausgewählten Blutplasma-Charge dargestellt, die sich durch Lipoprotein-Konzentrationen im physiologischen Normbereich auszeichnete. Es gab allerdings relativ große Konzentrationsunterschiede zwischen den Blutplasma-Chargen, alle im Folgenden angegebenen Werte sind deshalb statistisch nicht abgesichert.

Der prozentuale Proteingehalt bezogen auf die Lipoprotein-Gesamtmasse nimmt in den Blutplasma-Fraktionen in der Reihe VLDL → LDL → HDL → HDP kontinuierlich zu (Abb. 3-28), während der prozentuale Gehalt an Triacylglycerinen kontinuierlich abnimmt. Der Anteil an Phospholipiden an der Lipoprotein-Gesamtmasse ist in der VLDL-Fraktion etwa ein Drittel niedriger als in der LDL- und HDL-Fraktion. Der Anteil an Cholesterin(estern) an der Lipoprotein-Gesamtmasse ist in der LDL-Fraktion etwa 3-mal höher als in der VLDL- und HDL-Fraktion. Die genauen Prozentwerte der untersuchten Charge, sowie die zugehörigen Konzentrationen in mg/dl und mmol/l sind den Tabellen im Anhang G zu entnehmen.

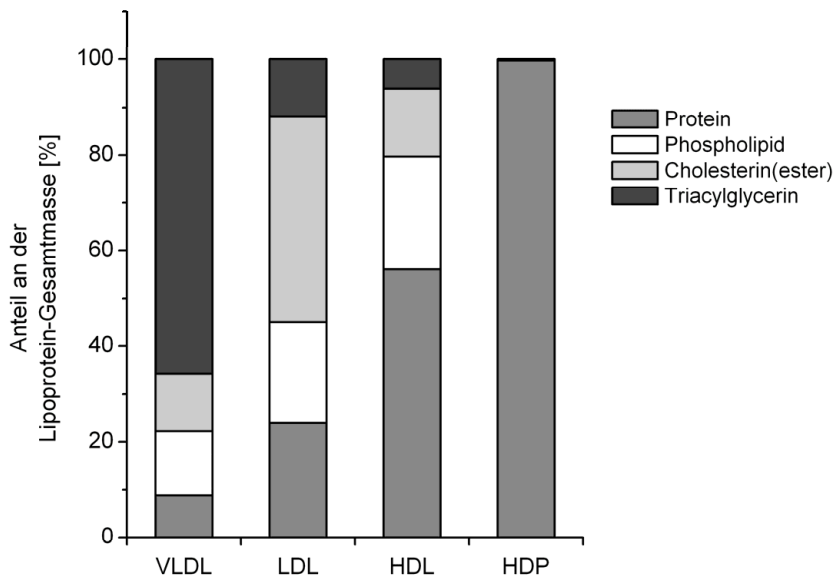


Abb. 3-28: Chemische Zusammensetzung der durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fractionen einer ausgewählten Blutplasma-Charge.

Die Proteinkonzentration in den Blutplasma-Fractionen veränderte sich nicht, wenn dem Blutplasma vor Fraktionierung ein in CES gelöstes Pigment zugesetzt wurde (Abb. 3-29). Die Proteinzusammensetzung ist zwar in den einzelnen Fractionen sehr verschieden (siehe Tab. 1-4), jedoch zeichnete sich die Farbeinwicklung des verwendeten Testreagens durch eine sehr geringe Variabilität bezüglich der Aminosäure-Zusammensetzung der Proteine aus.

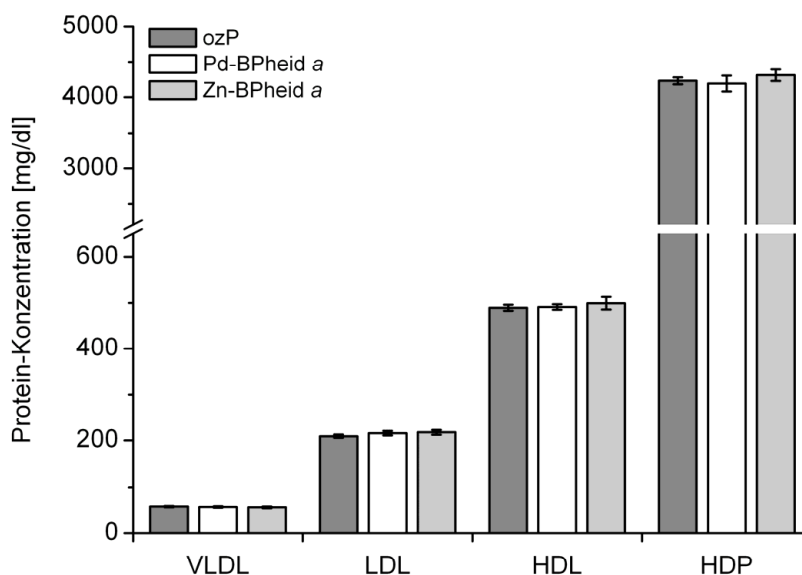


Abb. 3-29: Protein-Konzentration in Blutplasma-Fractionen. Untersucht wurden sowohl Fractionen ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie Fractionen mit vor der Fraktionierung zugesetzten Bakteriochlorinen (Pd- oder Zn-BPheid a). n = 3.



Die Phospholipid-Konzentration in den Blutplasma-Fractionen blieb ebenfalls konstant, wenn dem Blutplasma vor Fraktionierung ein in CES gelöstes Pigment zugesetzt wurde (Abb. 3-30). Phospholipide werden durch das Testreagenz in Phosphatidsäuren und freie Kopfgruppen gespalten. Quantifiziert wird im Anschluss Cholin, die Kopfgruppe der Phosphatidylcholine und Sphingomyeline, die zusammen einen Anteil von ~95% an der Phospholipid-Gesamtmenge in Serum stellen (Takayama *et al.*, 1977). In HDL ist Phosphatidylcholin mit ~81,21%, Lysophosphatidylcholin mit 0,14%, und Sphingomyelin mit ~13,55% bezogen auf die Phospholipid-Gesamtmenge vertreten (Zhang *et al.*, 1998). Neben diesen drei Cholin-haltigen Phospholipiden, kommen noch Phosphatidylethanolamin (2,3%) und Phosphatidyl-inositol (2,81%) vor.

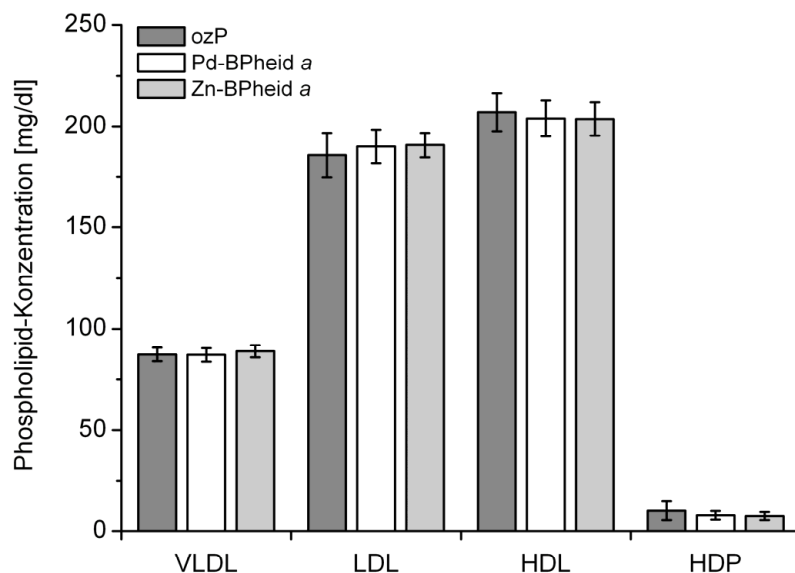


Abb. 3-30: Phospholipid-Konzentration in Blutplasma-Fractionen. Untersucht wurden sowohl Fraktionen ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie Fraktionen mit vor der Fraktionierung zugesetzten Bakteriochlorinen (Pd- oder Zn-BPheid a). n = 3.

Auch die Cholesterin(ester)-Konzentration in den Blutplasma-Fractionen blieb konstant, wenn dem Blutplasma vor Fraktionierung ein in CES gelöstes Pigment zugesetzt wurde (Abb. 3-31). Cholesterinester werden durch das Testreagenz in Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Quantifiziert wird im Anschluss Cholesterin, daher kann nicht zwischen dem ursprünglich vorhandenen (freien) Cholesterin und dem durch die Cholesterinester-Spaltung entstandenen Cholesterin unterschieden werden. Die hier gemessenen Verhältnisse der Cholesterin-Konzentrationen stimmen mit einer hohen Genauigkeit (Abweichung <4%) mit bereits veröffentlichten Werten (n = 44) überein (Bathen *et al.*, 2000).

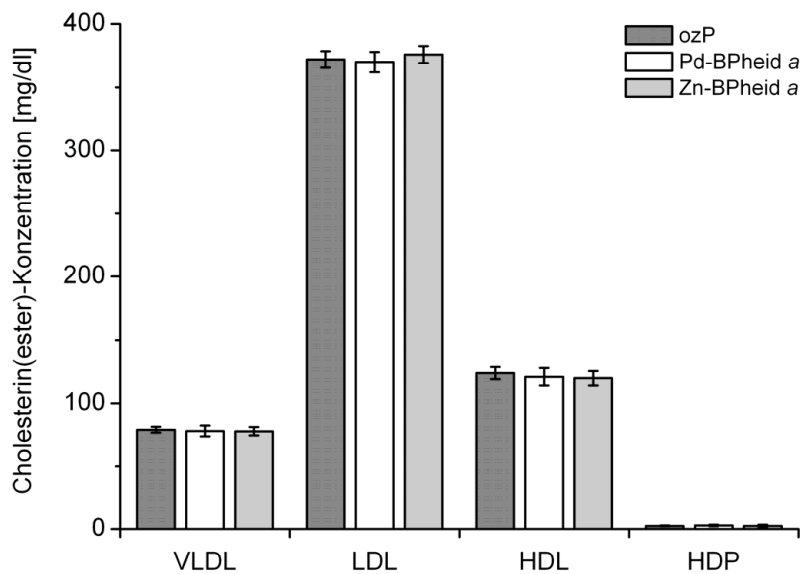


Abb. 3-31: Cholesterin(ester)-Konzentration in Blutplasma-Fractionen. Untersucht wurden sowohl Fraktionen ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie Fraktionen mit vor der Fraktionierung zugesetzten Bakteriochlorinen (Pd- oder Zn-BPheid a). n = 3.

Nicht selbstverständlich sind jedoch die identischen Werte der Triacylglycerin-Konzentration in den LDL- und HDL-Fractionen, wenn dem Blutplasma vor Fraktionierung ein in CES gelöstes Pigment zugesetzt wurde (Abb. 3-32).

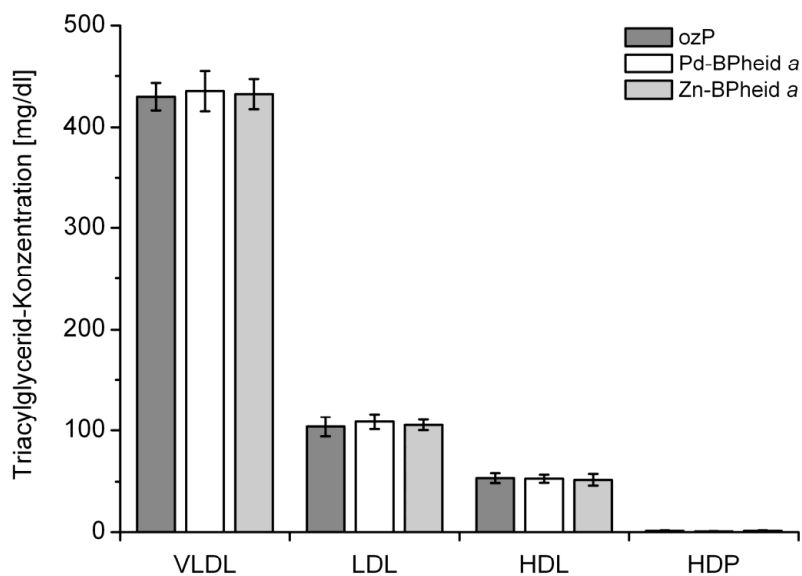


Abb. 3-32: Triacylglycerin-Konzentration in Blutplasma-Fractionen. Untersucht wurden sowohl Fraktionen ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie Fraktionen mit vor der Fraktionierung zugesetzten Bakteriochlorinen (Pd- oder Zn-BPheid a). n = 3.

Dazu muss zunächst erwähnt werden, dass in einem ersten Schritt die Triacylglycerine durch das Testreagens in Glycerin und freie Fettsäuren gespalten werden. Quantifiziert wird im Anschluss Glycerin, in das aber auch das ggf. zugesetzte Cremophor® EL, bei dem es sich um ein modifiziertes Triacylglycerin handelt, gespalten werden könnte. Durch weitere Tests konnte jedoch gezeigt werden, dass Cremophor® EL gegenüber dem Testreagenz stabil ist (ohne Abb.). Die hier gemessenen Verhältnisse der Triglycerid-Konzentrationen stimmen mit einer guten Genauigkeit (Abweichung <10%) mit bereits veröffentlichten Werten (n = 44) überein (Bathen *et al.*, 2000).

Durch diese Konzentrationsbestimmungen konnte das molare Verhältnis der gebundenen Pigmente pro Lipoprotein abgeschätzt werden (Tab. 3-5). Die statistische Unsicherheit dieser Werte ergibt sich dabei auf Grund der unbekanntenen Absorptionskoeffizienten der Pigmente in den Lipoproteinen. Da in organischen Lösungsmitteln jedoch die Absorptionskoeffizienten bekannt sind, konnten durch Lösen von definierten Pigmentmengen in CES entsprechende Absorptionskoeffizienten für eine Lipidumgebung abgeschätzt werden.

Tab. 3-5: Molares Verhältnis der gebundenen Pigmente pro Lipoprotein. Bei Pd- und Zn-BPheid *a* handelte es sich um exogene (zugesetzte) Pigmente, bei den nicht weiter strukturell unterschiedenen Carotinoiden um endogen (natürlich) vorhandene.

Pigment	$\epsilon_{\text{geschätzt}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) in Lipidumgebung	Pigment pro Lipoprotein [mol/mol]	
		LDL	HDL
Pd-BPheid <i>a</i>	56000	3,6	0,65
Zn-BPheid <i>a</i>	46000	3,4	1,8
Carotinoide	100000	2,3	0,09

Während die Anzahl an LDL gebundener Tetrapyrrole für Pd- und Zn-BPheid *a* annähernd konstant ist, bindet HDL fast 3-mal mehr Zn-BPheid *a* als Pd-BPheid *a*. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine spezifische Bindung des Zn-BPheid *a* durch Teile der HDL. Dadurch bedingt wird vom Blutplasma insgesamt mehr als doppelt so viel Zn-BPheid *a* wie Pd-BPheid *a* aufgenommen.

LDL bindet im vorliegen Fall ~26-mal mehr Carotinoide als HDL. Dies ist vergleichbar mit einem in der Literatur angegebenen Wert von ~40, der jedoch mit einer hohen Standardabweichung behaftet ist (Romanchik *et al.*, 1995).

### 3.5.2 EDX-Analysen von Lipoproteinfraktionen

#### Theorie der EDX-Analyse

Die *Energiedispersive Röntgenspektroskopie* oder *EDX-Analyse* (*Energy Dispersive X-ray Analysis*) ist eine Technik der Materialanalytik, um die Element-Zusammensetzung einer Probe im mikroskopischen Maßstab zu bestimmen. Der EDX-Detektor, der Anzahl und Energie der emittierten Röntgenquanten misst, ist in ein Raster-Elektronenmikroskop integriert, da der Elektronenstrahl des Mikroskops zur Erzeugung der Röntgen-Fluoreszenz verwendet werden kann.

Die Entstehung der Röntgenfluoreszenz lässt sich in zwei Abschnitte einteilen (Abb. 3-33, links und Mitte). Jedes Elektron des Strahls ist auf Grund seiner hohen kinetischen Energie in der Lage, bei einer Kollision mit einem Elektron der Probe dieses aus seiner zugehörigen Atomhülle zu schlagen ( $\Rightarrow$  Elektronenverlust). Da eine Atomhülle mit einem fehlenden Elektron in einer der inneren Schalen instabil ist, füllt ein Elektron von einer der äußeren Schalen diese Elektronenlücke auf ( $\Rightarrow$  Elektronen-Rearrangement). Da die äußeren Schalen energiereicher als die inneren sind, wird Energie frei, die als Röntgenquant emittiert wird. Die Energie dieses Quants ist charakteristisch für die Art des Atoms und den am Übergang beteiligten Schalen. Die Übergänge werden bezeichnet mit dem Buchstaben der Schale, in dem sich die Elektronenlücke befindet, und einem griechischen Buchstaben, der die Entfernung der Schale angibt, zu der das auffüllende Elektron gehörte (Abb. 3-33, rechts).

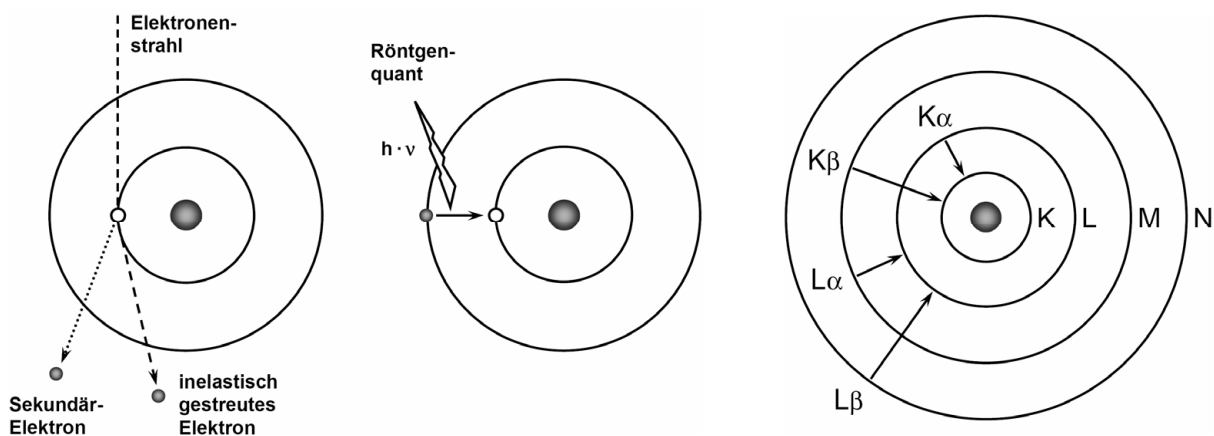


Abb. 3-33: Schematische Darstellung der Röntgen-Fluoreszenz-Entstehung durch Elektronenverlust (links) und Elektronen-Rearrangement (Mitte), sowie Nomenklatur der wichtigsten Übergänge (rechts). K, L, M, N: Bezeichnung der Atomshalen gemäß Standardnomenklatur;  $\alpha$ ,  $\beta$ : Entfernung der Schale, zu der das auffüllende Elektron gehörte ( $\alpha$ : eine Schale Entfernung;  $\beta$ : zwei Schalen Entfernung).

Mittels EDX-Analysen könnte ein direkter Nachweis dafür erbracht werden, dass Pigmentmoleküle in die Lipoproteine aufgenommen bzw. zumindest an ihrer Oberfläche gebunden wurden. Es wurde daher versucht, die Zentralmetalle der Pigmente zu detektieren, da zum einen die Röntgenfluoreszenz mit zunehmender Ordnungszahl des Elements stark zunimmt, zum anderen die Lipoproteine selbst diese Metalle nicht enthalten. Durch einen Vergleich der Zentralmetall-Verteilung mit dem normalen Bild des Elektronenmikroskops wäre somit eine räumliche Zuordnung der Pigmente zu Strukturen der Lipoproteine möglich.

Es ergab sich dabei jedoch das Problem, dass die in den Proben vorhandenen Salze die Lipoproteine völlig überdeckten. So liegt die durchschnittliche Lipoprotein-Konzentration in den LDL- und HDL-Fraktionen bei etwa 7–8 g/l, die NaCl-Konzentration in den dialysierten Proben dagegen bei fast 100 g/l. Eine *Sephadex G25*-Säule konnte die Salz-Konzentration bei einmaliger Verwendung nicht ausreichend reduzieren. Bei weiterer Entsalzung kam es jedoch zum Zerfall der Lipoproteine.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der relativ großen Eindringtiefe des energiereichen Elektronenstrahls in die Materie, so dass lediglich eine Ortsauflösung im Mikrometer-Bereich erzielt werden kann. Da war daher nicht möglich, EDX-Spektren einzelner Lipoproteine aufzunehmen, da sich stets viele von ihnen im Detektionsfeld befanden. Bei einer weiteren Verdünnung der Probe wäre die Signal-Intensität jedoch nicht mehr ausreichend gewesen. Es wurde daher versucht, zumindest EDX-Spektren von Lipoprotein-Clustern zu messen.

Eine Messung der Proben mit Pd-BPheid *a* war nicht möglich, da die zur Identifikation des Elements entscheidenden K-Linien des Palladiums Energien von 21,177 und 23,820 keV besitzen (Tab. 3-6). Als Faustformel gilt: Um eine Linie ausreichend anzuregen, so dass sie im Spektrum deutlich erkennbar ist, muss das anregende Elektron im Vergleich zum zu emittierenden Röntgenquant mindestens die doppelte Energie besitzen. Palladium muss daher mit über 40 keV angeregt werden, um diese hochenergetische Fluoreszenz zu initiieren. Das verwendete Raster-Elektronenmikroskop ermöglichte jedoch nur eine Anregung mit maximal 30 keV. Die L-Linien des Palladiums liegen bei geringeren Energien, ein eindeutiger Nachweis des Elements war aber hier unmöglich, da sich die L-Linien des Pd mit den K-Linien des Chlors überschneiden.

Die EDX-Analysen mussten sich folglich auf die Proben mit Zn-BPheid *a* beschränkt werden. Die K-Linien des Zinks sind mit Energien von 8,639 und 9,572 keV problemlos zugänglich. Als Anregungsenergie in allen folgenden Experimenten wurde daher unter Berücksichtigung der oben erwähnten Faustformel 20 keV gewählt.

Tab. 3-6: Übersicht über die wichtigsten Röntgenfluoreszenz-Energien der für die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Elemente. Alle Energien wurden der kostenlosen Software *MA-Table 1.42* von *MicroAnalyst* entnommen. OZ: Ordnungszahl.

Element (OZ)	K $\alpha$ 1		K $\beta$ 1		L $\alpha$ 1		L $\beta$ 1	
	E [keV]	$\lambda$ [nm]	E [keV]	$\lambda$ [nm]	E [keV]	$\lambda$ [nm]	E [keV]	$\lambda$ [nm]
C (6)	0,277	4,4760	-	-	-	-	-	-
N (7)	0,392	3,1629	-	-	-	-	-	-
O (8)	0,525	2,3616	-	-	-	-	-	-
Na (11)	1,041	1,1910	1,067	1,1620	-	-	-	-
P (15)	2,014	0,6156	2,139	0,5796	-	-	-	-
S (16)	2,308	0,5372	2,464	0,5032	-	-	-	-
Cl (17)	2,622	0,4729	2,816	0,4403	-	-	-	-
K (19)	3,314	0,3741	3,590	0,3454	-	-	-	-
Fe (26)	6,404	0,1936	7,057	0,1757	0,705	1,7586	0,719	1,7244
Zn (30)	8,639	0,1435	9,572	0,1295	1,012	1,2251	1,035	1,1979
Br (35)	11,924	0,1040	13,289	0,0933	1,480	0,8377	1,526	0,8125
Pd (46)	21,177	0,0585	23,820	0,0521	2,839	0,4367	2,990	0,4147

### EDX-Analyse von reinem Zn-BPheid a

Durch ein EDX-Spektrum von reinem Zn-BPheid a (Abb. 3-34) konnte gezeigt werden, dass die Anregungsenergie von 20 keV ausreicht, um die K-Linien des Zentralmetalls Zink ausreichend anzuregen. Neben den K $\alpha$ - und K $\beta$ -Linien (8,639 und 9,572 keV) sind auch die L $\alpha$ - und L $\beta$ -Linien (1,012 und 1,035 keV) zuordenbar, die jedoch nicht einzeln aufgelöst sind.

Die Linie mit einer Energie von ~6,4 keV ist zweifelsfrei die K $\alpha$ -Linie des Eisens (6,404 keV). Dabei handelt es sich entweder um eine Verunreinigung der Probe durch Eisenabrieb einer Spritzenkanüle o. ä., oder um Streustrahlung innerhalb der Probenkammer.

Neben der K $\alpha$ -Linie des Sauerstoffs ist noch die K $\alpha$ -Linie des Kohlenstoffs sichtbar, welche jedoch zum Großteil durch den Glaskohlenstoff des Probenträgers verursacht wird. Nicht erkennbar ist dagegen die K $\alpha$ -Linie des Stickstoffs. Das breite Kontinuum wird durch die stets auftretende Röntgenbremsstrahlung verursacht.

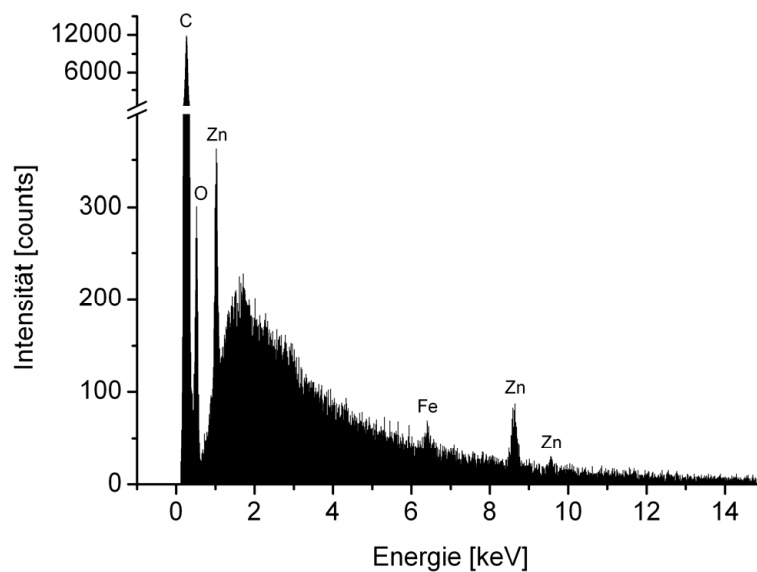


Abb. 3-34: EDX-Spektrum von reinem Zn-BPheid *a* (in DE gelöst aufgetragen auf Glaskohlenstoff). Anregungsenergie: 20 keV; Abnahmewinkel: 30°; Messzeit: 80 s.

#### EDX-Analyse von Lipoproteinen mit inkorporiertem Zn-BPheid *a*

In den Lipoprotein-Proben mit Zn-BPheid *a* wurde zunächst in zwei Stufen der prozentuale Anteil der Salze an der Gesamtmasse gesenkt. Im ersten Schritt wurde die Probe durch eine *Sephadex*<sup>TM</sup> G25-Säule (Laufmittel: TE-Puffer I) teilweise entsalzt, im zweiten Schritt wurden die Eluate durch Verwendung von *Centricon*<sup>®</sup>-Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert. In keiner der EDX-Analysen war jedoch Zink nachweisbar (Abb. 3-35), da dessen Konzentration auch in den salzreduzierten Proben unter der Nachweisgrenze für schwerere Elemente von etwa 1‰ Massenanteil an der Gesamtmasse lag (LDL:  $\leq 0,2\%$ ; HDL:  $\leq 0,5\%$ ).

Neben den typischen Elementen der Lipoprotein-Bestandteile (C, O, P, S; N nicht sichtbar), fällt der noch immer relativ hohe Salz-Anteil auf. So ist in beiden Proben sehr viel Natrium und Chlor durch das in allen TE-Puffern der Fraktionierung und Dialyse verwendete NaCl feststellbar. Doch nicht nur in den HDL ist das für den letzten Schritt der Fraktionierung benötigte KBr vorhanden, auch in den LDL sind geringe Mengen an Kalium und Brom enthalten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass beide Proben gemeinsam in einem Pufferreservoir dialysiert wurden, und somit ein Teil des KBr aus den HDL- in die LDL-Proben gelangte.

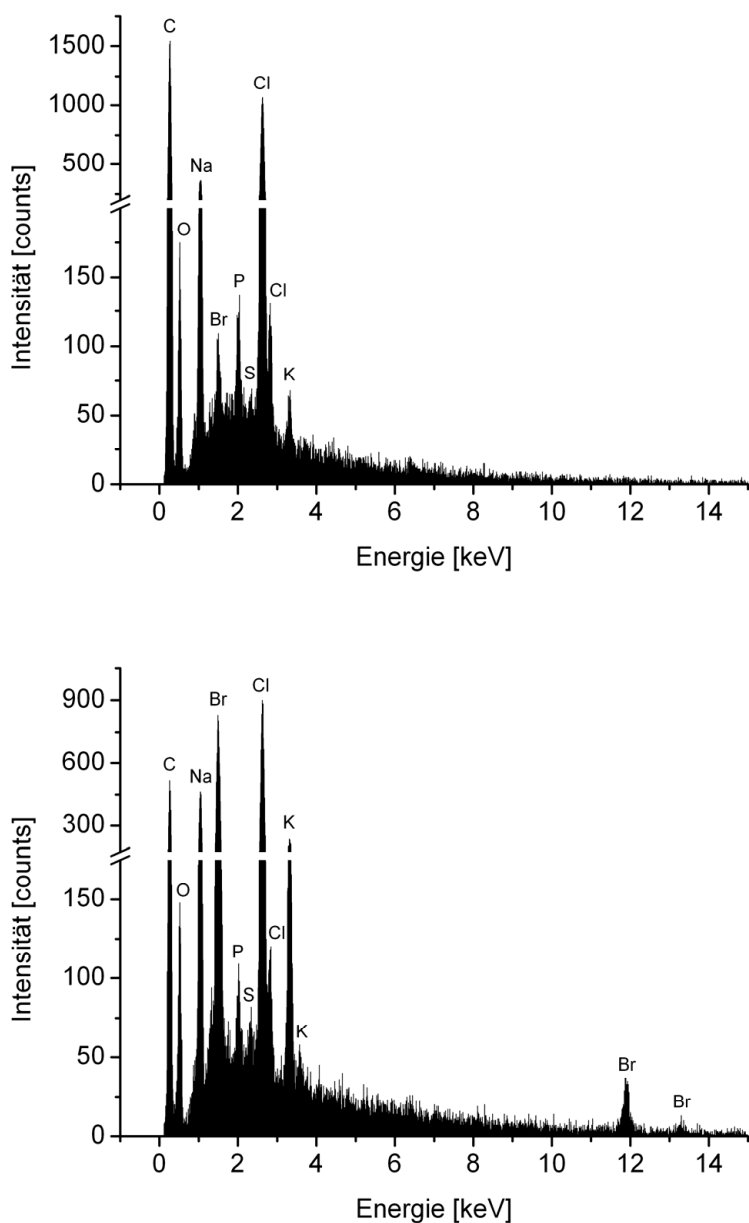


Abb. 3-35: EDX-Spektren von Lipoproteinen mit Zn-BPheid a. Dialysierte und aufkonzentrierte Aliquots LDL (oben) und HDL (unten) auf Glaskohlenstoff. Anregungsenergien: 20 keV; Abnahme-winkel: 30°; Messzeiten: 164 s (LDL) bzw. 189 s (HDL).

### 3.5.3 Stabilität der Pigmentbindung an Lipoproteine

Die Stabilität der Pigmentbindung wurde mittels einer *Sephadex*<sup>TM</sup> G25-Säule untersucht. Dieses Säulenmaterial dient gewöhnlich zur Entsalzung von Flüssigkeiten, und wurde hierfür u. a. auch im Rahmen der Probenvorbereitung für die EDX-Analysen (siehe Kap. 3.5.2) verwendet.



Größere Partikel passieren die Säule dabei mit der Laufmittelfront, kleinere Moleküle werden vom feinporigen Säulenmaterial stark zurückgehalten. So betrug bei der verwendeten Säule die Retentionszeit von *Blue Dextran* (MW: ~2000 kDa) nur ~3,2 min, die Retentionszeit von Bromphenolblau (MW: ~0,67 kDa) dagegen fast exakt eine Stunde.

Es zeigte sich, dass der Pigmentverlust aller gemessenen Lipoprotein-Fractionen bei der Gelfiltration mit zunehmendem Alter der Proben deutlich zunahm (Abb. 3-36).

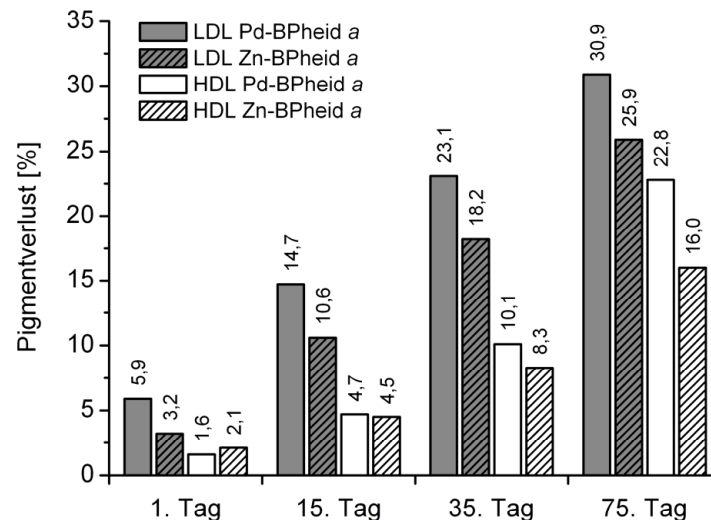


Abb. 3-36: Prozentualer Pigmentverlust verschiedener Lipoprotein-Fractionen bei Gelfiltration mittels einer *Sephadex™ G25*-Säule. Der Pigmentverlust wurde anhand der Pigmentmenge im Durchfluss der Säule in Relation zur aufgetragenen Pigmentmenge berechnet. Als Laufmittel wurde TE-Puffer III verwendet. Die Flussrate lag bei ~0,5 ml/min. Weitere Details siehe Kap. 2.6.3.

Bei frisch dialysierten Proben (1. Tag) lag der Pigmentverlust bei maximal ~6%, und steigerte sich nach längerer Lagerung dieser Proben auf maximal ~31% (75. Tag). Der Pigmentverlust war bei den LDL-Fractionen stets größer als bei den HDL-Fractionen, was auf eine etwas schwächere Bindung der Pigmente an die LDL im Vergleich zu den HDL hindeutet.

Es könnten jedoch möglicherweise auch einige LDL aus unbekanntem Gründen auf der Säule verbleiben, da als Vergleichswert weder die Carotinoid-, noch die Protein-Menge im Durchfluss genau genug bestimmt werden konnte.

Der Pigmentverlust war bei Lipoproteinen mit inkorporiertem Zn-BPheid a stets geringer als bei den entsprechenden Lipoproteinen mit Pd-BPheid a. Dies weist auf eine etwas stabilere Bindung des Zn-BPheid a im Vergleich zu Pd-BPheid a hin, die wohl auf der Fähigkeit des Zink-Zentralmetalls zur Koordination eines fünften Liganden beruht.

### 3.5.4 Absorptionsrückgang mit zunehmendem Probenalter

Für eine Reihe von Experimenten wurde die Absorption der Lipoprotein-Fractionen durch Verdünnung oder Aufkonzentrierung auf einen bestimmten Wert (z. B. OD = 0,5) eingestellt. Immer wieder wurde dabei festgestellt, dass die Absorption mit zunehmendem Alter der Proben mehr und mehr von den ursprünglich eingestellten Werten abwich. Daher wurde die Absorption ( $Q_y$ -Bande) einiger unterschiedlicher Lipoprotein-Fractionen auf einen gemeinsamen Anfangswert eingestellt, und über einen Zeitraum von einem halben Jahr verfolgt.

Die Absorption aller Proben nahm mit der Zeit kontinuierlich ab (Abb. 3-37), obwohl diese lichtgeschützt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurden. Der Absorptionsrückgang in den LDL-Fractionen war durchgehend linear mit der Zeit korreliert. In den HDL-Fractionen dagegen fiel der Absorptionsrückgang etwas geringer aus, und verlangsamte weiter bis zum Messzeitpunkt nach 120 Tagen (siehe unten). Des Weiteren war der Absorptionsrückgang mit Zn-BPheid *a* in beiden Lipoprotein-Fractionen im Vergleich zu den entsprechenden Fractionen mit Pd-BPheid *a* etwas größer. Dies kann mit der im direkten Vergleich der beiden Pigmente deutlich geringeren chemischen Stabilität des Zink-Derivats erklärt werden. Beide LDL-Fractionen blieben während des gesamten Zeitraums klar, und es war keinerlei Präzipitat o. ä. erkennbar. Gleiches galt für beide HDL-Fractionen bis einschließlich des vorletzten Messzeitpunkts. Am letzten Messzeitpunkt war eine leichte Trübung feststellbar, die auf ein beginnendes Bakterienwachstum hindeutete. Dies erklärt wahrscheinlich die jeweils letzten Messwerte der beiden HDL-Fractionen, die deutlich vom vorherigen Verlauf der Kinetik abweichen.

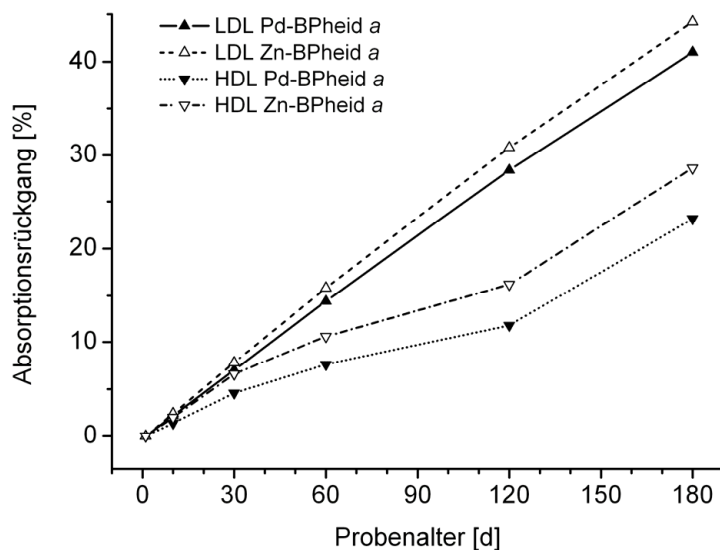


Abb. 3-37: Kinetik der Absorptionsabnahme von Pd- und Zn-BPheid *a* in LDL- und HDL-Fractionen. Die Proben wurden zwischen den Messungen lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt. OD<sub>Start</sub>: 0,5.

In absorptionspektroskopischen Untersuchungen der Proben konnten in keinem Fall Abbauprodukte der Pigmente (z. B. Chlorin- oder Porphyrin-Derivate) nachgewiesen werden.

### 3.5.5 Sensibilität der $Q_x$ -Absorptionsmaxima auf die Bindungssituation

#### BChl a

Die  $Q_x$ -Absorptionsbande von Bakteriochlorophyllen reagiert äußerst empfindlich auf eine Änderung der Koordination des Zentralmetalls. Das  $Q_x$ -Absorptionsmaximum von BChl a mit 5-fach koordiniertem Mg liegt unabhängig vom Aggregationszustand des Pigments bei ~580 nm, bei 6-fach koordiniertem Mg verschiebt es sich bathochrom nach ~610 nm (Evans und Katz, 1975). Bei Chl a ändert sich dagegen das Absorptionsspektrum nur geringfügig beim Übergang von 5- zu 6-fach koordiniertem Mg (Evans und Katz, 1975).

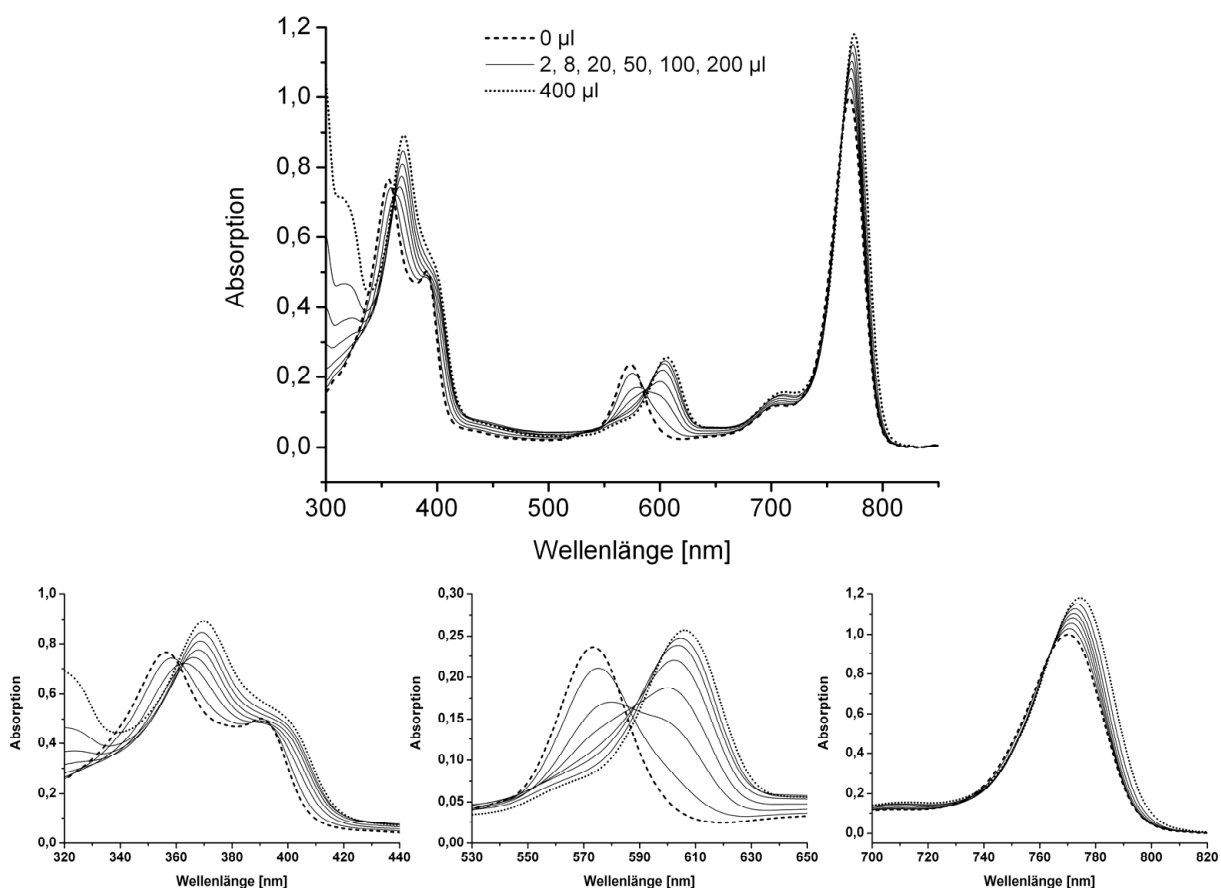


Abb. 3-38: Änderungen des Absorptionsspektrums von BChl a in Diethylether durch Zusatz von Pyridin. Einer Lösung von BChl a in Diethylether (1,0 ml;  $OD_{\text{Start}}: 1,0$ ) wurden sukzessive 0, 2, 8, 20, 50, 100, 200 bzw. 400 µl (Endmengen) Pyridin zugegeben. Alle Spektren sind für die jeweilige Verdünnung korrigiert.

BChl *a* liegt in Diethylether (DE) in einem 5-fach koordinierten Zustand vor, da das Mg-Atom zusätzlich zu den vier Stickstoffatomen der Pyrrolringe ein Molekül Sauerstoff bindet. Durch Zugabe von Pyridin, das als zusätzlicher Ligand fungiert, kann BChl *a* in einen 6-fach koordinierten Zustand überführt werden. Das  $Q_x$ -Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 573 nm in DE nach 607 nm in Pyridin (Abb. 3-38).

Die anderen Banden zeigen ebenfalls bathochrome Verschiebungen, die jedoch weitaus weniger ausgeprägt sind. Das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum verschiebt sich von 770 nm in DE nach 781 nm in Pyridin, das  $B_y$ -Absorptionsmaximum von 356 nm nach 372 nm. Beide Banden gewinnen dabei an Intensität. Die ursprünglich bei 390 nm positionierte  $B_x$ -Bande ist bereits ab einer Pyridin-Konzentration von 8‰ nur noch als Schulter vorhanden. Ein Teil dieser Verschiebung ist auf einen gewöhnlichen Lösungsmittelleffekt zurückzuführen, da im Bereich von 362 nm ( $B_y$ ) und 587 nm ( $Q_x$ ) keine isosbestischen Punkte, sondern lediglich isosbestische „Bereiche“ erkennbar sind.

Die Lage des  $Q_x$ -Absorptionsmaximums ist sowohl von der Koordinationszahl des Zentralmetalls, als auch von der Atomart des koordinierenden Liganden abhängig. Dabei führt eine 6-fache Koordination (O: 590–595; N: 605–612 nm) bei allen Atomarten zu bathochromen Verschiebungen im Vergleich zu einer 5-fachen Koordination (O: 570 nm; S: 575–580 nm; N: 582 nm) (Callahan und Cotton, 1987). Die Lage des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums ist dagegen unabhängig von der Koordinationszahl des Zentralmetalls, jedoch verschiebt es sich geringfügig in Abhängigkeit von der Atomart des koordinierenden Liganden (O: ~770 nm; N: ~775 nm) (Callahan und Cotton, 1987). Die  $Q_x$ - und  $Q_y$ -Absorptionsmaxima verschieben sich durch WBB weiter bathochrom ( $Q_x$ : 10–15 nm;  $Q_y$ : 5–20 nm) (Callahan und Cotton, 1987).

### Zn-BPhe *a*

Auch Zn-BPhe *a* zeigt bei Zusatz von Pyridin eine deutliche bathochrome Verschiebung des  $Q_x$ -Absorptionsmaximums von 557 nm in Diethylether nach 578 nm in Pyridin (Abb. 3-39). Durch Zusatz von nur 1‰ Pyridin verschiebt sich das  $O_x$ -Absorptionsmaximum bereits auf 569 nm. Dabei handelt es um den Übergang von 4-facher zu 5-facher Koordination, da das Zn-Atom in DE keinen Sauerstoff bindet. Die zusätzliche Verschiebung bei höheren Pyridin-Konzentrationen ist auch in diesem Fall auf einen Lösungsmittelleffekt zurückzuführen.

Das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum verschiebt sich von 762 nm in Diethylether nach 772 nm in Pyridin, das  $B_y$ -Absorptionsmaximum von 352 nm nach 363 nm. Die ursprünglich bei 387 nm positionierte  $B_x$ -Bande ist bereits ab einer Pyridin-Konzentration von 2‰ nur noch als Schulter vorhanden.

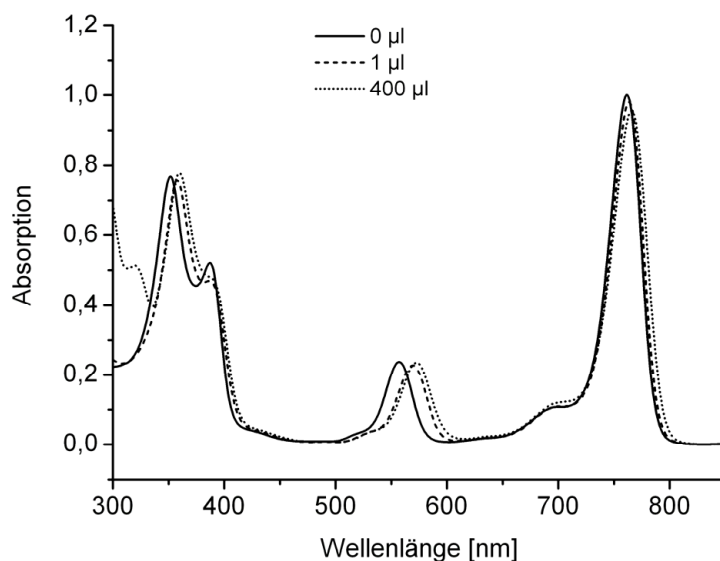


Abb. 3-39: Änderungen des Absorptionsspektrums von Zn-BPhe a in Diethylether durch Zusatz von Pyridin. Einer Lösung von Zn-BPhe a in Diethylether (1,0 ml;  $OD_{\text{Start}}$ : 1,0) wurden sukzessive 0, 1, bzw. 400 µl (Endmengen) Pyridin gegeben. Alle Spektren sind für die jeweilige Verdünnung korrigiert.

#### Pd-BPhe a

Dagegen zeigt Pd-BPhe a bei Zusatz von Pyridin nur eine sehr geringe bathochrome Verschiebung des  $Q_x$ -Absorptionsmaximums (Abb. 3-40). Diese ist jedoch keinem Koordinationswechsel zuzuschreiben, sondern ist auf einen Lösungsmittelleffekt zurückzuführen.

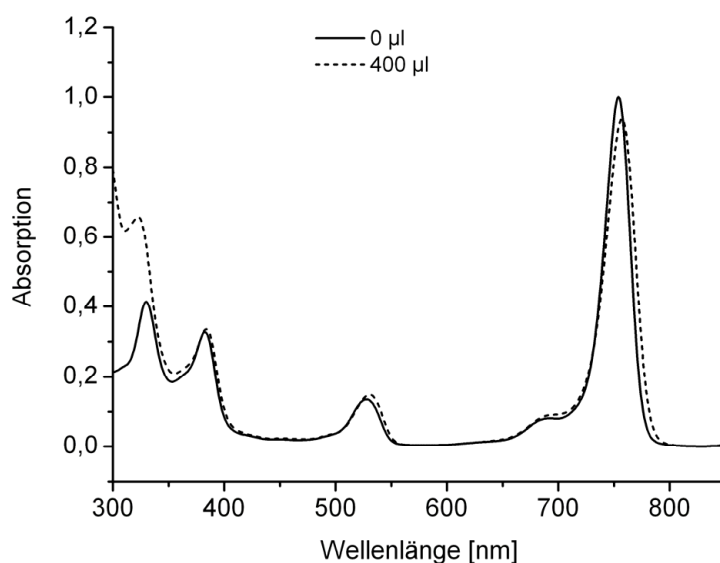


Abb. 3-40: Änderungen des Absorptionsspektrums von Pd-BPhe a in Diethylether durch Zusatz von Pyridin. Einer Lösung von Pd-BPhe a in Diethylether (1,0 ml;  $OD_{\text{Start}}$ : 1,0) wurden sukzessive 0 bzw. 400 µl (Endmengen) Pyridin gegeben. Alle Spektren sind für die jeweilige Verdünnung korrigiert.

Das Pigment liegt stets in 4-facher Koordination vor, da das Pd-Atom keinen weiteren Liganden binden kann. Das  $Q_x$ -Absorptionsmaximum verschiebt sich von 528 nm in Diethylether nach 534 nm in Pyridin, das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum von 754 nm nach 763 nm, die  $B_x$ - und  $B_y$ -Absorptionsmaxima verändern ihre Lage nur minimal ( $\Delta\lambda < 2$  nm). Nur unter sehr speziellen Bedingungen sind 5-fach koordinierte Pd-Komplexe erzeugbar. Dies gelingt z. B. durch Koordination mit einem Tripyrrin und zwei Trimethylphosphinen, d. h. das  $Pd^{2\oplus}$ -Ion wird durch 3 Stickstoff- und 2 Phosphoratome komplexiert (Bröring und Brandt, 2003).

Ähnlich wie Pd-BPhe *a* verhält sich BPhe *a*, das auf Grund seines fehlenden Zentralatoms ebenfalls keine weiteren Liganden binden kann. Das  $Q_x$ -Absorptionsmaximum des BPhe *a* verschiebt sich folglich ebenfalls durch einen reinen Lösungsmittelleffekt von 524 nm in Diethylether nach 531 nm in Pyridin, das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum von 749 nm nach 754 nm.

Alle Werte für die  $Q_x$ -Absorptionsmaxima der vier oben genannten Pigmente stimmen sehr genau ( $\Delta\lambda \leq 1$  nm) mit bereits veröffentlichten Werten überein (Hartwich *et al.*, 1998). Die einzige Ausnahme stellt BChl *a* in Pyridin dar, dessen  $Q_x$ -Absorptionsmaximum in der genannten Veröffentlichung mit 612 nm angegeben wird.

### Lage der $Q_x$ -Absorptionsmaxima in Lipoproteinen

Eine Verschiebung des  $Q_x$ -Absorptionsmaximums lässt folglich Rückschlüsse auf die Koordination des Zentralmetalls, sowie die allgemeine Bindungssituation des Pigments zu. Bei den beiden natürlichen Mg-Bakteriochlorinen waren die  $Q_x$ -Absorptionsmaxima in LDL und HDL im Vergleich zu der sehr starken Rotverschiebung in Pyridin nur relativ gering bathochrom verschoben (Abb. 3-41). Dies deutet darauf hin, dass es zu keiner 6-fachen Koordination des Mg kommt, die Verschiebung ist wohl durch einen reinen Lösungsmittelleffekt oder durch WBB bedingt. Diese Annahme einer unspezifischen Bindung wird durch das Ergebnis gestützt, dass die beiden Mg-Derivate eine nahezu identische Pigment-Verteilung wie die beiden entsprechenden Pd-Derivate aufwiesen (siehe Abb. 3-17, oben).

Dagegen konnte eine ausgeprägte bathochrome Verschiebung der  $Q_x$ -Absorptionsmaxima bei beiden Zn-Bakteriochlorinen im Vergleich zu der in Pyridin existierenden Rotverschiebung beobachtet werden. In den HDL-Fractionen waren die  $Q_x$ -Absorptionsmaxima selbst im Vergleich zur Situation in Pyridin noch weiter bathochrom verschoben (Zn-BPhe *a*: +7 nm; Zn-BPheid *a*: +11 nm).

Damit ist von einer 5-fachen Koordination des Zn in HDL, sowie einem zusätzlichen Einfluss von WBB auszugehen. Ein deutlicherer Unterschied zeigte sich bei den Zn-Derivaten in den entsprechenden LDL-Fraktionen. So war das  $Q_x$ -Absorptionsmaximum in LDL im Falle des Zn-BPheid *a* ebenfalls geringfügig bathochrom (+4 nm), im Falle des Zn-BPhe *a* dagegen etwas hypsochrom (–6 nm) verschoben.

Die  $Q_x$ -Absorptionsmaxima der Pd-Derivate, sowie der zentralmetallfreien Derivate, konnten nicht ausgewertet werden, da sie in den Absorptionsspektren aufgrund ihrer Lage (~535 nm) von den in den Lipoproteinen enthaltenen Carotinoiden größtenteils überdeckt wurden.

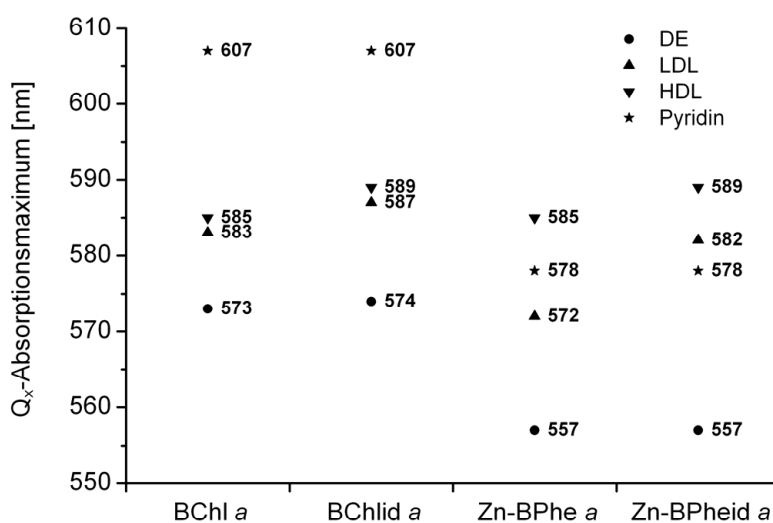


Abb. 3-41: Lage der  $Q_x$ -Absorptionsmaxima von Mg- und Zn-Bakteriochlorinen in Lipoproteinen. Zum Vergleich sind die Werte in Diethylether (DE) und Pyridin angegeben.

### 3.5.6 Krasnovskii-Photoreduktionsprodukte

Mg- und Zn-Chlorine bilden bei Belichtung in Anwesenheit eines Reduktionsmittels und eines Elektronendonors (einer Base) kräftig rot gefärbte Photoreduktionsprodukte. Erst 26 Jahre nach ihrer Entdeckung *in vitro* am Beispiel von Chl *a* (Krasnovskii, 1948) konnten diese als 10,20-Dihydro-Chlorin-Derivate identifiziert werden (Abb. 3-42; Scheer und Katz, 1974).

Diese spezielle Photoreduktion lässt folglich Schlussfolgerungen auf die Bindungssituation des Zentralatoms zu. Erfolgt die Krasnovskii-Photoreduktion auch bei alleiniger Zugabe eines Reduktionsmittels, so muss sich ein (natürlicher) Elektronendonator in unmittelbarer Nähe des Zentralatoms befinden.

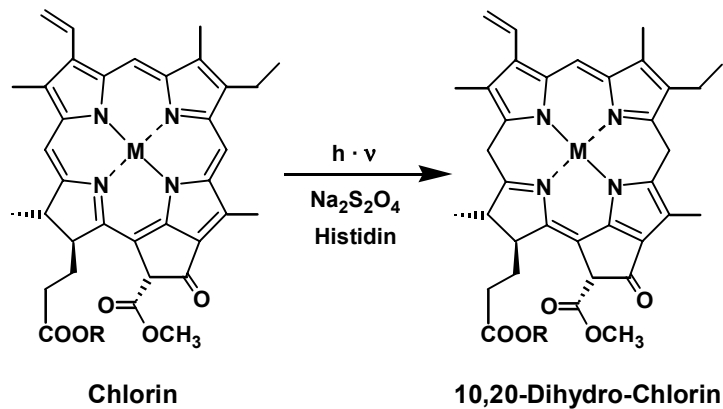


Abb. 3-42: Krasnovskii-Photoreduktion. Chemische Strukturen des Edukts (Chlorin) und Produkts (10,20-Dihydro-Chlorin). Außer Natriumdithionit und Histidin können auch andere Reduktionsmittel und Elektronendonoren (Basen) die Reaktion katalysieren. R: Phytol oder H; M: Mg oder Zn.

In einem vollständig artifiziiellen System mit Zn-Pheid *a*, Natriumdithionit und Histidin kann das Krasnovskii-Photoreduktionsprodukt erzeugt werden (Abb. 3-43).

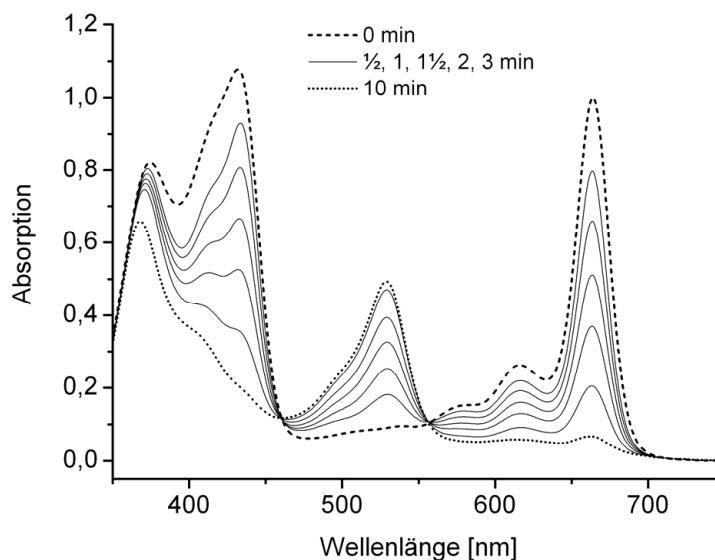


Abb. 3-43: Bildung des Krasnovskii-Photoreduktionsprodukts in einem artifiziiellen System. Absorptionsspektren bei Belichtung von Zn-Pheid *a* in CES mit 67 mM Na-Dithionit und 67 mM Histidin (NIR-Lichtintensität:  $\sim 320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630).

Die bei Belichtung ablaufende Reaktion ist auch ohne absorptionspektroskopische Messungen leicht durch den Farbumschlag der zunächst grün gefärbten Lösung nach einem intensiven Rot verfolgbar. Anhand der Absorptionsspektren ist die Absorptionsabnahme des Edukts Zn-Pheid *a* ( $Q_y$ :  $\sim 663 \text{ nm}$ ), sowie die Bildung des Produkts 10,20-Dihydro-Zn-Pheid *a* ( $Q_y$ :  $\sim 528 \text{ nm}$ ) gut zu beobachten. Die Existenz zweier isosbestischer Punkte bei  $\sim 459 \text{ nm}$  und  $\sim 557 \text{ nm}$  deutet auf die direkte Konversion des Edukts in das Produkt hin.



Auch in HDL mit Zn-Phe *a* bildet sich bei Belichtung und Zusatz von Natriumdithionit dieses Photoreduktionsprodukt (Abb. 3-44). Die Lage aller Absorptionsmaxima und der beiden isobestischen Punkte entspricht in etwa denen des oben beschriebenen artifiziellen Systems.

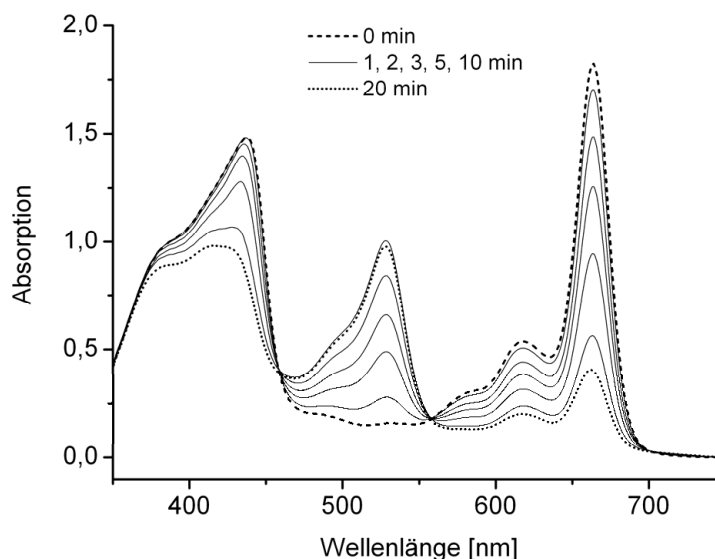


Abb. 3-44: Bildung des Krasnovskii-Photoreduktionsprodukts in pigmentbeladenen HDL. Absorptionsspektren bei Belichtung von aufkonzentrierten HDL mit Zn-Phe *a* (aus Iodixanol-Gradienten) mit 100 mM Na-Dithionit (NIR-Lichtintensität:  $\sim 320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630).

Ein Zusatz von Histidin ist dagegen in diesem System nicht nötig, d. h. Teile der HDL selbst fungieren hier als Elektronendonoren. Dafür kommen außer den Histidinen der HDL-Proteine auch alle anderen nukleophilen Aminosäuren bzw. chemische Gruppen in den Lipoproteinen in Frage. Da die Zahl der Nukleophile relativ gering ist, die Reaktion aber ähnlich schnell wie mit zugesetztem Histidin ist, muss das Pigment Zn-Phe *a* zumindest teilweise spezifisch von den Lipoproteinen gebunden werden.

Wird das Reduktionsmittel Natriumdithionit durch eine *Sephadex*<sup>TM</sup> G25-Säule entfernt, so wandelt sich das Photoreduktionsprodukt 10,20-Dihydro-Zn-Phe *a* wieder fast vollständig in das vor der Reduktion vorhandene Pigment Zn-Phe *a* um (Abb. 3-45). Auffallend ist hierbei das Auftreten einer in Vergleich zur  $Q_y$ -Absorptionsbande des Zn-Phe *a* langwelligeren Bande mit einem Maximum bei  $\sim 749$  nm. Diese Absorption ist typisch für ein Bakteriochlorin, bei dem es sich um 3-Vinyl-3-Deacetyl-Zn-BPhe *a* (3Vi-Zn-BPhe *a*) handeln könnte.

Da der Absorptionskoeffizient von 3Vi-Zn-BPhe *a* nicht bekannt ist, wurde als Vergleichspigment 3Vi-BChl *a* herangezogen. Dessen Absorptionskoeffizient in Diethylether liegt mit  $\sim 82500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Struck *et al.*, 1992) nur unwesentlich unter dem von Chl *a* im gleichen Lösungsmittel, der mit  $\sim 85300$  angegeben wird (PhotochemCAD).

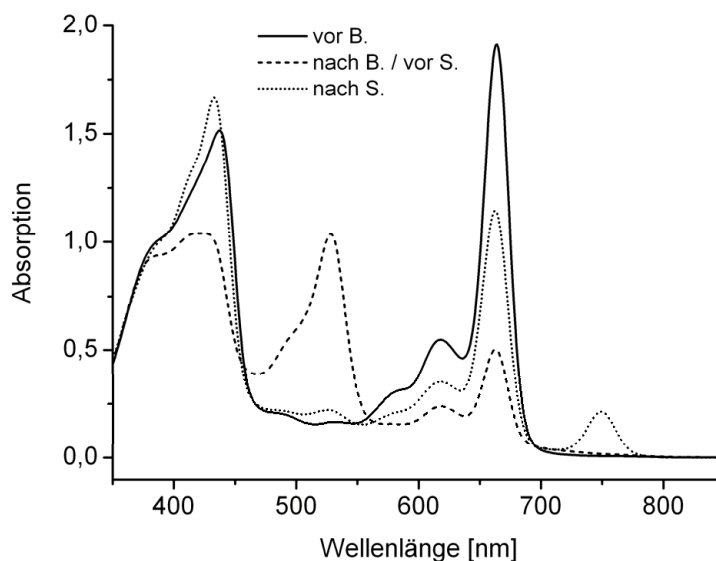


Abb. 3-45: Regeneration von Zn-Phe a aus 10,20-Dihydro-Zn-Phe a durch Entfernung des Reduktionsmittels. Absorptionsspektren von belichteten HDL mit Zn-Phe a und Na-Dithionit vor und nach Belichtung, sowie vor und nach Applikation auf eine Sephadex™ G25-Entsalsungssäule.

Unter der Annahme, dass das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten dieser beiden Pigmente in wässriger Umgebung identisch ist, wären ~76% des Photoreduktionsprodukts 10,20-Dihydro-Zn-Phe a zu Zn-Phe a regeneriert, und ~24% zu 3Vi-Zn-BPhe a reduziert worden. Insgesamt sind jedoch ~30% des Zn-Phe a während der Photoreaktion irreversibel gebleicht worden.

Alle getesteten Lösungen (Blutplasma, LDL und HDL) zeigten sowohl mit Zn-Phe a wie auch mit Zn-Pheid a eine Photoreduktion des Krasnovskii-Typs (Abb. 3-46). Die LDL-Fractionen enthielten jedoch so wenig Pigment, dass sie für die quantitative Auswertung nicht herangezogen wurden. In Blutplasma und HDL wird aus Zn-Phe a etwas mehr Photoreduktionsprodukt gebildet als aus Zn-Pheid a. Der Phytol-Rest scheint das Pigment etwas näher an einen Elektronendonator zu bringen bzw. die Zugänglichkeit von Natriumdithionit geringfügig zu erleichtern. In HDL ist dieser Effekt etwas ausgeprägter als in Blutplasma. Die auch bei den Experimenten ohne Dithionit zu beobachtende Absorptionzunahme bei 529 nm wird durch Oxidationsprodukte hervorgerufen, die in diesem Bereich des Spektrums ebenfalls eine geringe Absorption aufweisen (ohne Abb.).

Es stellt sich jedoch die Frage, ob die beobachtete Photoreduktion nicht durch die für die Fraktionierung verwendete Iodixanol-Lösung (Optiprep®) verursacht wurde, da Iodixanol (chemische Struktur siehe Abb. 3-10) mehrere Stickstoff-Atome mit freien Elektronenpaaren besitzt, welche möglicherweise als Elektronendonator fungieren könnten. Dies könnte alle obigen Ergebnisse in Frage stellen.

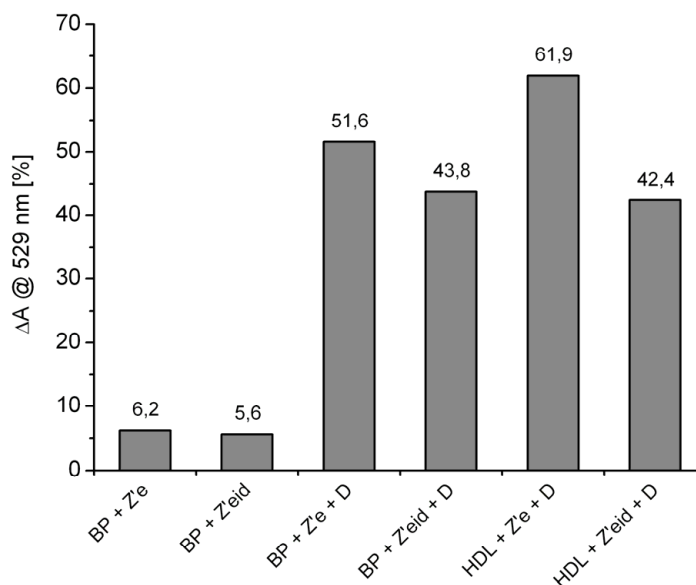


Abb. 3-46: Quantifizierung des gebildeten Krasnovskii-Photoreduktionsprodukts. Die Absorptionzunahme des Photoreduktionsprodukts wurde auf Grund unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen auf den Absorptionrückgang des eingesetzten Pigments normiert, der somit jeweils als 100%  $\Delta A$  festgesetzt wurde. BP: Blutplasma; Z'e: Zn-Phe a; Z'eid: Zn-Pheid a; D: mit 100 mM Na-Dithionit.

Aus diesem Grund wurden einige Kontroll-Experimente durchgeführt, bei denen der Einfluss von Iodixanol auf die Krasnovskii-Photoreduktion näher untersucht wurde. Es tritt wie zu erwarten bei Belichtung einer Lösung mit Zn-Pheid a, Histidin und Dithionit ein Krasnovskii-Photoreduktionsprodukt auf (Abb. 3-47; vgl. Abb. 3-44).

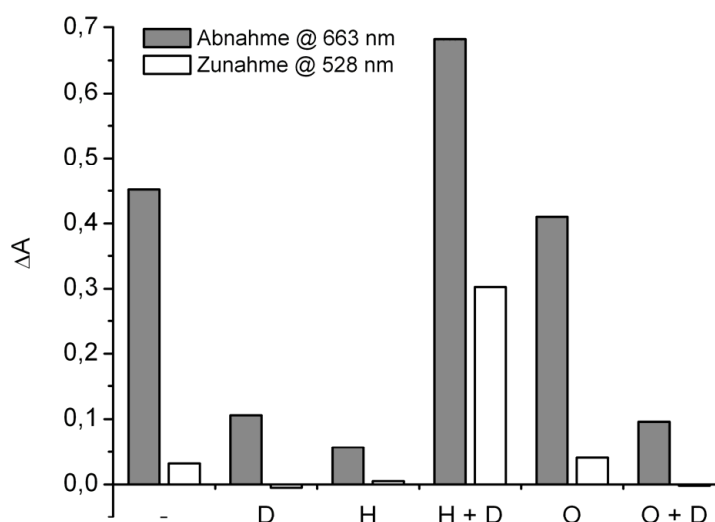


Abb. 3-47: Kontroll-Experimente zu den Krasnovskii-Photoreduktions-Experimenten. Zn-Pheid a in CES mit 67 mM Na-Dithionit (D), 67 mM Histidin (H), oder 13% Optiprep® (O), sowie relevante Kombinationen dieser drei Zusätze. Absorptionsänderungen nach 3 min Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630).

Dagegen verhält sich das Pigment im Ansatz mit Optiprep<sup>®</sup> und Dithionit wie im Ansatz mit Dithionit allein; es wird kein Photoreduktionsprodukt gebildet, und das Pigment durch die Abwesenheit von Sauerstoff deutlich stabilisiert. Dies beweist, dass sich die Iodixanol-Stickstoffe nicht als Elektronendonoren an der Photoreduktion beteiligen können, und bestätigt daher alle bisher getätigten Schlussfolgerungen. Auch mit Histidin allein wird kein Photoreduktionsprodukt gebildet, das Zn-Pheid *a* wird sogar besonders stabilisiert.

Die geringfügige Zunahme bei Zusatz von Optiprep<sup>®</sup> und ganz ohne Zusätze ist wie bei Abb. 3-46 auf Oxidationsprodukte zurückzuführen, die bei 528 nm absorbieren.

## 3.6 Aggregationszustände von Pigmenten

### 3.6.1 Detergens-induzierte Pigment-Deaggregation

Viele Tetrapyrrole neigen sowohl in stark hydrophoben, wie auch in wässrigen Lösungen zur Aggregation. Da die Aggregate meist eine deutlich geänderte Photophysik besitzen, wurden speziell die Aggregate von Pd-BPheid *a* näher untersucht.

Von Pd-BPheid *a* traten in allen wässrigen Systemen Aggregationsformen des Pigments auf. Diese konnten auch in einem künstlichen System in Abhängigkeit von der vorhandenen Detergens-Konzentration erzeugt werden (Abb. 3-48).

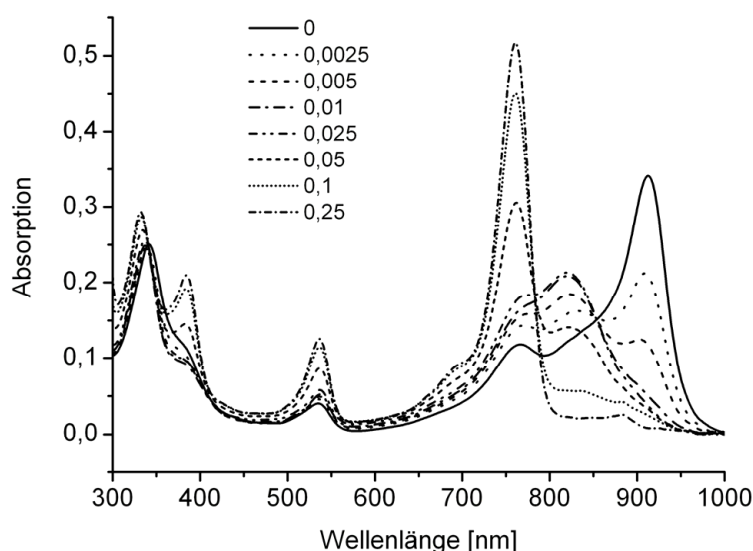


Abb. 3-48: Deaggregation von Pd-BPheid *a* (WST09) durch Zusatz von Detergens. Absorptionsspektren einer Lösung des in DMSO angelösten Pigments in 2 ml 50%-igem (v/v) wässrigem Glycerin ohne und nach Zusatz von 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, und 50  $\mu$ l einer 10%-igen (v/v) wässrigen Lösung des Detergens Triton X-100. Gerundete Endkonzentrationen an Triton X-100 siehe Legende der Abbildung (alle Angaben in Volumen-%).

Wurde das in DMSO angelöste Pd-BPheid *a* in eine 1:1-Mischung aus Glycerin und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gegeben, so lag der Großteil des Pigments in einer polymeren Form vor (Q<sub>y</sub>: 913 nm). Das Glycerin wurde zur Erhöhung der Viskosität der Lösung verwendet. Dadurch schwebten die darin enthaltenen größeren Pigment-Partikel so langsam nach unten, dass sie absorptionspektroskopisch erfasst werden konnten.

Wurde diese Lösung mit dem Detergens Triton X-100 versetzt, kam es zu einer vollständigen Deaggregation der Pigment-Polymere in Pigment-Oligomere (Q<sub>y</sub>: 820 nm) und -Monomere (Q<sub>y</sub>: 761 nm). Erst nach vollständiger Dissoziation der Pigment-Polymere wurden bei weiterer Zugabe von Detergens auch die Pigment-Oligomere vollständig in Pigment-Monomere umgewandelt. Auch BChl *a* existiert in Lösungen mit Triton X-100 in drei spektralen Formen, die bei 770, 860, und 835/930 nm absorbieren (Gottstein und Scheer, 1983).

Es wurden bereits (wahrscheinlich identische) Aggregate von Pd-BPheid *a* in wässrigen Lösungen beschrieben, mit Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima bei ~820 und ~900 nm (Vakrat-Haglili *et al.*, 2005). „*In vivo*“ (im Blut) besitzt das Monomer ein Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximum bei ~760 nm, die Aggregate bei ~830 nm (Weersink *et al.*, 2005).

Das Q<sub>x</sub>-Absorptionsmaximum verränderte seine Lage nur geringfügig (535 → 537 nm), gewann jedoch mit zunehmender Detergens-Konzentration deutlich an Intensität. Gleiches galt für das B<sub>x</sub>-Absorptionsmaximum (384 nm), das ohne Detergens nur als Schulter an der langwelligen Flanke des B<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums erkennbar war. Das B<sub>y</sub>-Absorptionsmaximum zeigte eine hypsochrome Verschiebung von ~10 nm (342 → 332 nm). Dieser Effekt der Intensitätsabnahme der Q<sub>x</sub>-Bande bei Aggregaten in Detergentien wird oft auch als Hyperchromie der Q<sub>y</sub>-Bande bezeichnet.

Eine Auswertung dieses Experiment ergab, dass der Zerfall der Pigment-Oligomere exakt bei Erreichen der *kritischen mizellären Konzentration* (CMC) einsetzte (Abb. 3-49). Diese gibt diejenige Detergens-Konzentration an, oberhalb derer sich Mizellen bilden. Die CMC von Triton X-100, die allerdings von einer Reihe äußerer Faktoren abhängig ist, beträgt ~0,02% (w/v) bzw. ~0,0186% (v/v) (Rehm, 2000).

Unterhalb der CMC werden die Pigment-Polymere in Mono- und zunächst v. a. Oligomere umgewandelt. Die Pigment-Oligomere sind bis zur CMC stabil, oberhalb der CMC dagegen werden diese allmählich in Pigment-Monomere umgewandelt.

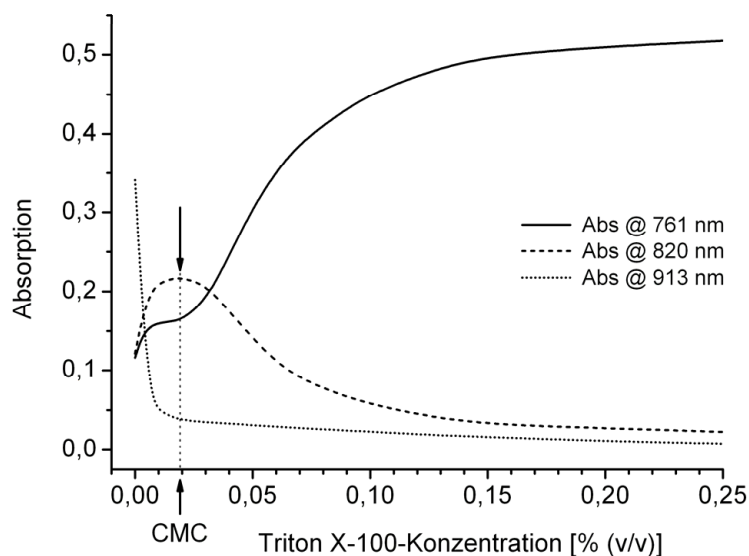


Abb. 3-49: Deaggregation von Pd-BPheid *a* (WST09) durch Zusatz von Detergens. Die Absorptionsverläufe bei 761, 820, und 913 nm des Experiments in Abb. 3-48 wurden in Abhängigkeit von der Endkonzentration des Detergens Triton X-100 aufgetragen; in Abb. 3-48 wurden nicht alle gemessenen Spektren dargestellt. CMC: kritische Mizelläre Konzentration.

### 3.6.2 Pigment-Aggregate in Blutplasma

Wurde Blutplasma mittels des CES-Insertionssystems mit Pigment versetzt, so lag nahezu das gesamte Pigment (>95%) in monomerer Form vor (ohne Abb.). Dagegen kam es bei Zusatz der Pigmente in DMSO stets zur Bildung von Aggregaten.

Im Falle des Pd-BPheid *a* (WST09) waren im Absorptionsspektrum drei Formen des Pigments unterscheidbar, deren langwelligste Absorptionsmaxima bei 765, 838, bzw. 914 nm lagen (Abb. 3-50). In Analogie zu BChl *a*, dessen Aggregation in wässriger Umgebung gut untersucht ist, wurden diese Monomeren, Oligomeren (wahrscheinlich Dimere), bzw. Polymeren zugeordnet. Durch eine längere Inkubation wurde die Konzentration der monomeren Form stark, die der polymeren Form geringfügig erhöht. Dagegen nahm die Konzentration der oligomeren Form deutlich ab. Die Lage der langwelligsten Absorptionsmaxima blieb bei allen drei Formen annähernd konstant ( $Q_y$ : 764, 832, 916 nm).

Blutplasma scheint folglich die offenbar intrinsische Fähigkeit zu besitzen, das Gleichgewicht zwischen diesen Formen zu verschieben und dabei vor allem kleinere Pigment-Aggregate in monomere Pigmentmoleküle zu spalten.

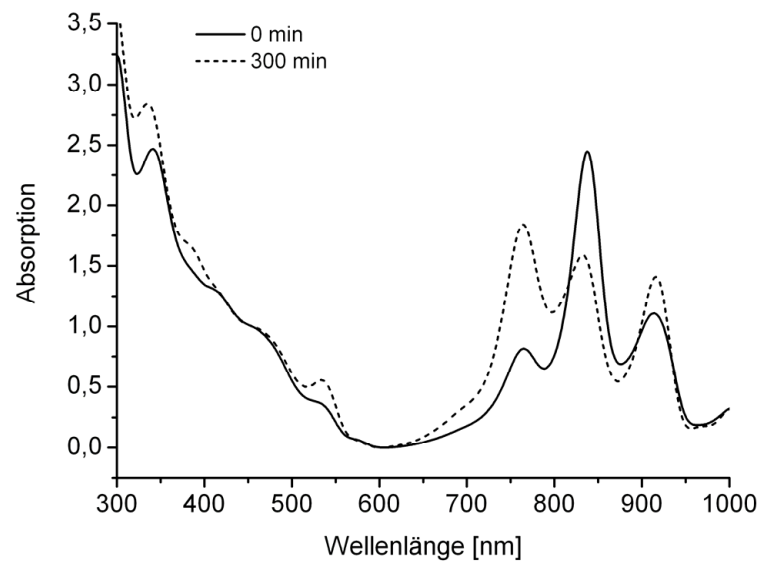


Abb. 3-50: Absorptionsspektren von Blutplasma mit in DMSO gelöstem Pd-BPheid a (WST09) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Spektren wurden unmittelbar nach Pigment-Zugabe (0 min) und nach einer 5-stündigen Inkubation (300 min) gemessen.

Ein derartiger Effekt ist bereits bei Pd-BPheid a beobachtet worden. Nicht nur durch Aufnahme der Pigment-Aggregate in Mizellen oder Liposomen, sondern auch bei Zugabe von Serumproteinen kommt es zu einer teilweisen Deaggregation des Pigments, die zu photodynamisch aktiven Monomeren ( $Q_y$ : ~760 nm) führt (Vakrat-Haglili *et al.*, 2005).

Der oben beschriebene Effekt in Blutplasma wird folglich wahrscheinlich durch die die sehr hohen Konzentrationen an Lipiden und Proteinen im Blutplasma induziert. Auch aggregiertes mTHPBC in PBS wird durch eine 2-stündige Inkubation mit HSA langsam monomerisiert (Lassalle *et al.*, 2004).

Wurde ein derartiges Blutplasma belichtet, so zeigten die drei oben beschriebenen Aggregationsformen des Pigments deutlich unterschiedliche Photostabilitäten (Abb. 3-51). Die monomere Form wurde innerhalb der ersten Minuten sehr stark gebleicht, danach war die Geschwindigkeit der Bleichung fast identisch mit der der polymeren Form. Die oligomere (dimere) Form bleichte nicht nur schneller als die beiden anderen Formen aus, sie war am Ende der Reaktion sogar praktisch vollständig verschwunden. Dagegen verblieb sowohl bei der monomeren, wie auch bei der polymeren Form ein Rest, der nahezu inert gegenüber weiterer Photobleichung war.

Die Lage des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums blieb bei der monomeren Form konstant, während es sowohl bei der oligomeren, wie auch bei der polymeren Form zu starken hypsochromen Verschiebungen dieses Maximums kam (~28,5 bzw. ~23 nm).

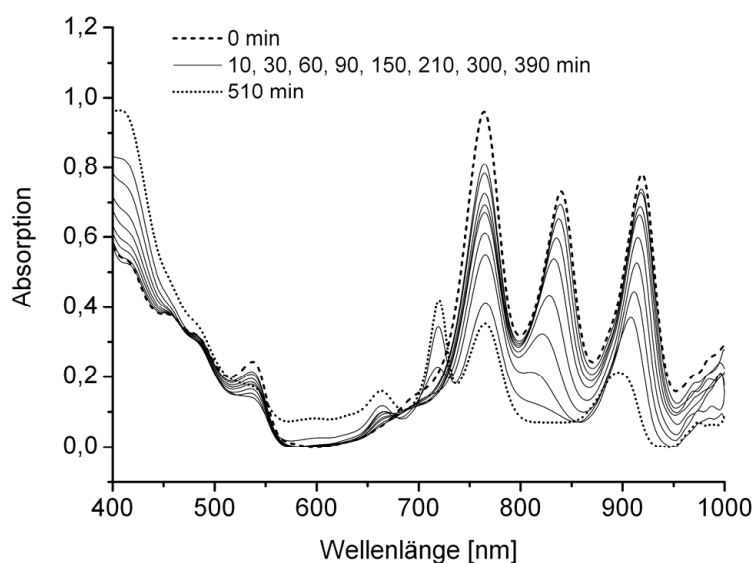


Abb. 3-51: Photoreaktion von Pd-BPheid a (WST09) in Blutplasma. Das Pigment wurde in DMSO zugegeben. Absorptionsspektren vor und nach 10, 30, 60, 90, 150, 210, 300, 390, und 510 min Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630).

### 3.6.3 Pigment-Aggregate in HDL

Wenn das Pd-BPheid a in DMSO gelöst zugegeben worden war, konnten in einigen Fällen auch bei den Absorptionsspektren der HDP-Fractionen drei Aggregationsformen ( $Q_y$ : 753, 832, 917 nm) unterschieden werden (Abb. 3-52). Das langwelligste Absorptionsmaximum der monomeren Form war jedoch  $\sim 11$  nm hypsochrom verschoben im Vergleich zum Zustand in Blutplasma vor Fraktionierung. Bei Belichtung erfolgte ausschließlich eine Photo-bleichung der monomeren Form, die mit einer bathochromen Verschiebung ( $\sim 12$  nm) deren langwelligsten Absorptionsmaximums einherging. Ein Teil der monomeren Form war (ähnlich dem Zustand in Blutplasma) inert gegenüber Photobleichung, was auf zwei verschiedene Bindungsarten des monomeren Pigments mit unterschiedlicher Photostabilität hindeutet. Nach Belichtung waren die Wellenlängen der langwelligsten Absorptionsmaxima der drei Aggregationsformen ( $Q_y$ : 765, 830, 916 nm) nahezu identisch mit denen in unbelichtetem Blutplasma ( $Q_y$ : 764, 832, 916 nm).

Wurde das Pd-BPheid a mittels des CES-Insertionssystems zugesetzt, so lag bei fast allen Fraktionierungen das gesamte Pigment in der HDP-Fraktion in monomerer Form vor. Nur bei wenigen Fraktionierungen waren Spuren der oligomeren (dimeren) Form des Pigments in den erhaltenen HDP-Fractionen feststellbar. Die drei Lipoprotein-Fractionen (VLDL, LDL, HDL) enthielten in keinem einzigen Fall Spuren von Pigment-Aggregaten.



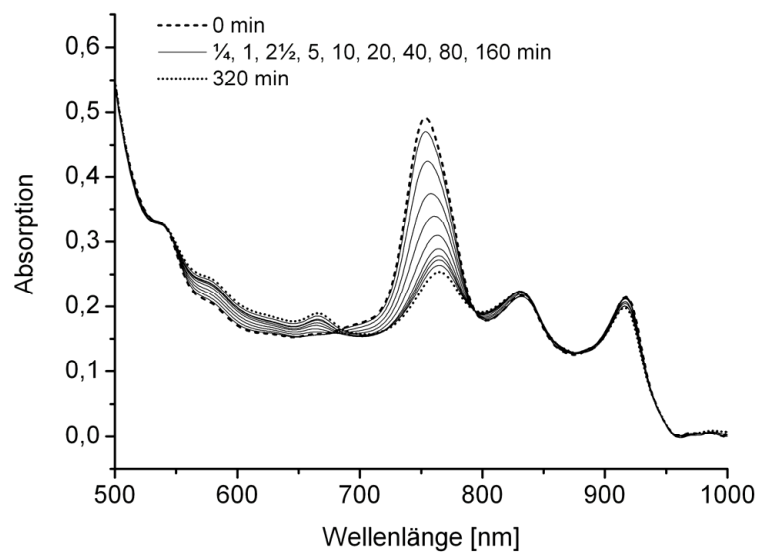


Abb. 3-52: Photoreaktion von Pd-BPheid a (WST09) in einer HDP-Fraktion. Das Pigment wurde dem Blutplasma in DMSO zugegeben. Absorptionsspektren vor und nach 0,25, 1, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, und 320 min Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630).

Da die gebildeten ROS zumeist bevorzugt das Pigment oxidieren, das sie erzeugt hat, kann davon ausgegangen werden, dass bei dieser Reaktion nahezu ausschließlich ein Teil der Pigment-Monomere ROS generiert. Ähnliches wurde auch für andere Tetrapyrrole festgestellt. So erzeugen bei den allen Bakteriochlorophyllen mit Chlorin-Grundgerüst (Typ *c*, *d*, *e*) nur deren Monomere Singulett-Sauerstoff, nicht jedoch deren größere Aggregate (Krasnovsky *et al.*, 1993; Krasnovsky *et al.*, 1994; Arellano *et al.*, 2000; Arellano *et al.*, 2002).

### 3.6.4 Pigment-Aggregate in FSM – Teil I: Pd-BPheid a (WST09)

Bei *FSM* bzw. *FSM-Materialien* (*folded-sheet mesoporous materials*) handelt es sich um mesoporöse Silica mit einer hexagonalen Grundstruktur (Inagaki *et al.*, 1993; Inagaki *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1998). Jedes Hexagon besitzt in seinem Inneren einen runden Hohlraum, wodurch lang gestreckte Kanäle ausgebildet werden, welche das Silica von einer zur anderen Seite durchziehen. In der Materialkunde bedeutet mesoporös eine Porengröße von 2–50 nm (20–500 Å) (Sing *et al.*, 1985; Rouquerol *et al.*, 1994.), die FSM besitzen meist einen Kanaldurchmesser von 20–100 Å. Die FSM weisen eine sehr große Oberfläche in Relation zu ihrer Masse ( $\sim 1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ), und eine einheitliche Porengröße auf, die durch die Ausgangsmaterialien und die Synthesebedingungen exakt bestimmt werden kann. In allen Experimenten wurden drei FSM mit Porendurchmessern von 20, 45, und 83 Å verwendet, bei denen es sich um ein Geschenk von *Toyota Central R & D Labs* handelte.

Für alle folgenden Experimente wurden in Vorversuchen geeignete Pigment- und FSM-Konzentrationen ermittelt. Zum einen wurde die zugesetzte Pigmentmenge aus Gründen der absorptionsspektroskopischen Messbarkeit begrenzt, zum anderen musste die Menge des verwendeten FSM minimiert werden, da nur wenig dieses wertvollen Materials zur Verfügung stand.

Für die Inkorporationsexperimente wurden 1,5 ml einer Lösung von Pd-BPheid *a* (WST09) in Toluol (OD:  $\sim 1,2$ ) mit jeweils 5 mg FSM versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die FSM abzentrifugiert. Der Überstand enthielt bereits zu diesem Zeitpunkt in den Ansätzen mit 20 Å- und des 45 Å-FSM kein Pigment mehr. Im Überstand des Ansatzes mit 83 Å-FSM konnte noch knapp 1% der ursprünglich vorhandenen Pigmentmenge nachgewiesen werden (ohne Abb.). Die durch die Pigmenteinlagerung deutlich sichtbar rosa gefärbten FSM im Niederschlag wurden mit Toluol gewaschen, und in einem Trockenfinger mittels  $\text{CaCl}_2$  bei 50 °C im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Als Lösungsmittel für die folgende absorptionsspektroskopische Untersuchung dieser getrockneten FSM wurde 50%-iges (v/v) wässriges Glycerin gewählt, da dessen Dichte von  $\sim 1,13$  g/ml ausreichend ist, um die FSM-Partikel für eine zur Messung ausreichende Zeit in Schwebe zu halten.

In der Toluol-Ausgangslösung weist Pd-BPheid *a* (WST09) vier scharfe Absorptionsbanden auf (Abb. 3-53): 330 nm ( $B_y$ ), 387 nm ( $B_x$ ), 534 nm ( $Q_x$ ), und 764 nm ( $Q_y$ ).

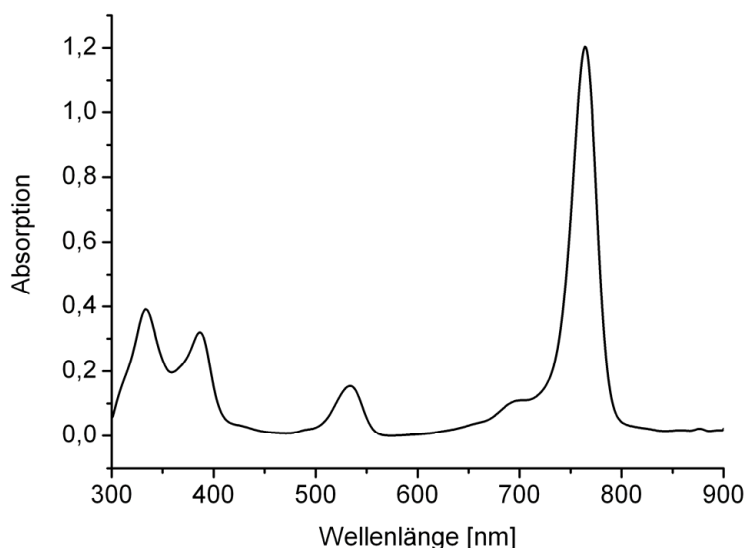


Abb. 3-53: Absorptionsspektrum von Pd-BPheid *a* (WST09) in Toluol.

Diese Positionen der WST09-Absorptionsbanden waren nach Inkorporation in 20 Å-FSM nur geringfügig verschoben (Abb. 3-54): 333 nm ( $B_y$ ), 379 nm ( $B_x$ ), 533 nm ( $Q_x$ ), und 761 nm ( $Q_y$ ). Die etwas stärkere hypsochrome Verschiebung der  $B_x$ -Bande ist lediglich durch deren Intensitätsverlust bedingt.

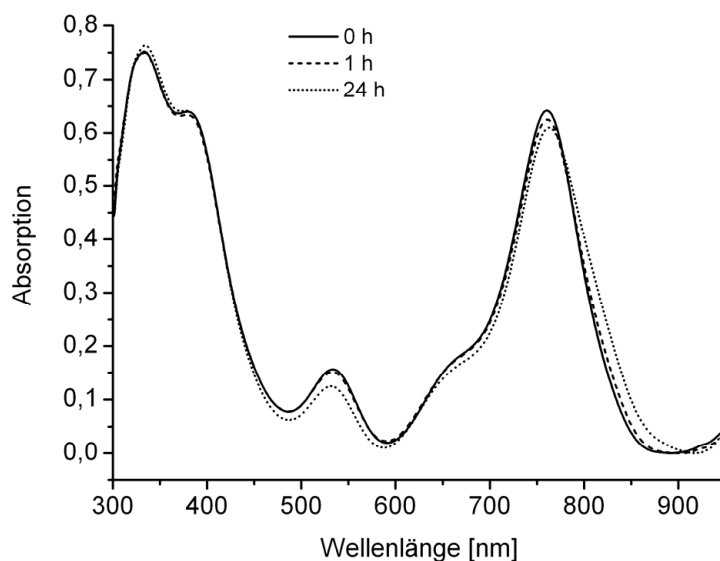


Abb. 3-54: Absorptionsspektren von 20 Å-FSM mit inkorporiertem Pd-BPheid a (WST09) nach 0, 1, und 24 h Inkubation in 50%-igem (v/v) wässrigem Glycerin.

Alle Absorptionsbanden waren im Vergleich zu den Verhältnissen in Toluol deutlich verbreitert. So hatte sich die Halbwertsbreite der  $Q_y$ -Bande von  $\sim 29$  nm in Toluol auf  $\sim 88$  nm mehr als verdreifacht. Innerhalb der nächsten 24 h wurde noch wenig eines langwelligeren Produkts gebildet, welches die Halbwertsbreite der  $Q_y$ -Bande auf  $\sim 98$  nm anwachsen lässt. Die Lage der Absorptionsmaxima blieb dagegen nahezu konstant: 334 nm ( $B_y$ ), 379 nm ( $B_x$ ), 531 nm ( $Q_x$ ), und 763 nm ( $Q_y$ ).

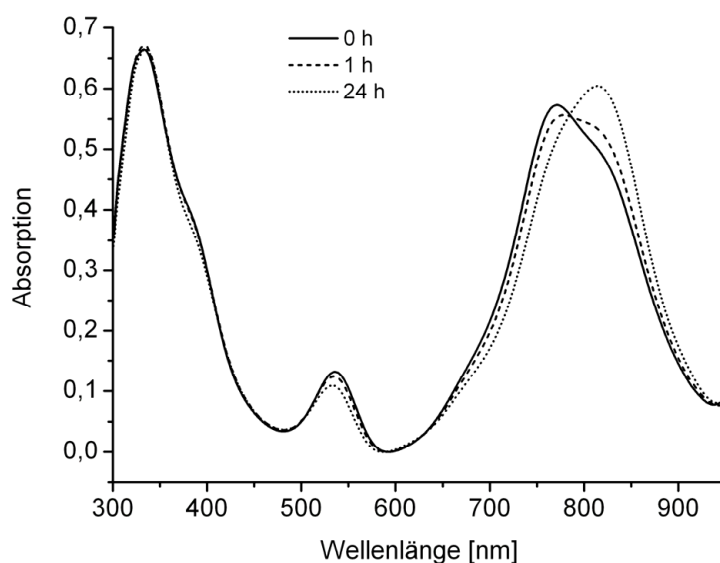


Abb. 3-55: Absorptionsspektren von 45 Å-FSM mit inkorporiertem Pd-BPheid a (WST09) nach 0, 1, und 24 h Inkubation in 50%-igem (v/v) wässrigem Glycerin.

Dagegen waren die Positionen der WST09-Absorptionsbanden nach Inkorporation in 45 Å-FSM in Vergleich zu ihren Positionen in Toluol stärker verschoben (Abb. 3-55): 333 nm ( $B_y$ ), 536 nm ( $Q_x$ ), und 771 nm ( $Q_y$ ). Der Intensitätsverlust der  $B_x$ -Bande war in 45 Å-FSM so stark, dass nur noch eine kleine Schulter in Bereich um 385 nm erkennbar ist. Auch hier waren alle Absorptionsbanden im Vergleich zu den Verhältnissen in Toluol deutlich verbreitert. Bereits nach 0 h war eine Schulter der  $Q_y$ -Bande bei etwa 815 nm festzustellen, welche innerhalb der nächsten 24 h zu einem (neuen) langwelligeren Maximum der  $Q_y$ -Bande bei 814 nm anwuchs. Die Existenz eines isosbestischen Punktes bei dieser Umwandlung lässt auf eine direkte Umwandlung der kurzwelligeren in die langwelligere Form schließen. Die Lage der übrigen Absorptionsmaxima blieb dagegen nahezu konstant: 335 nm ( $B_y$ ), und 533 nm ( $Q_x$ ).

Die Positionen der WST09-Absorptionsbanden nach Inkorporation in 83 Å-FSM entsprachen fast den Positionen in 45 Å-FSM nach 24 h (Abb. 3-56): 334 nm ( $B_y$ ), 534 nm ( $Q_x$ ), und 818 nm ( $Q_y$ ). Der Intensitätsverlust der  $B_x$ -Bande war in 83 Å-FSM vergleichbar mit dem in 45 Å-FSM, auch hier war nur noch eine kleine Schulter in Bereich um 385 nm erkennbar. Alle Absorptionsbanden wiesen nahezu identische Breiten wie diejenigen in 45 Å-FSM auf. Es war nur noch eine Schulter der  $Q_y$ -Bande bei ihrem ursprünglichen Maximum bei etwa 765 nm erkennbar. Bereits zu Beginn des Experiments lag fast das gesamte Pigment in der langwelligeren Form vor, deren Maximum sich innerhalb der nächsten 24 h noch etwas weiter zu 821 nm verschob. Die Lage der übrigen Absorptionsmaxima blieb dagegen nahezu konstant: 334 nm ( $B_y$ ), und 533 nm ( $Q_x$ ).

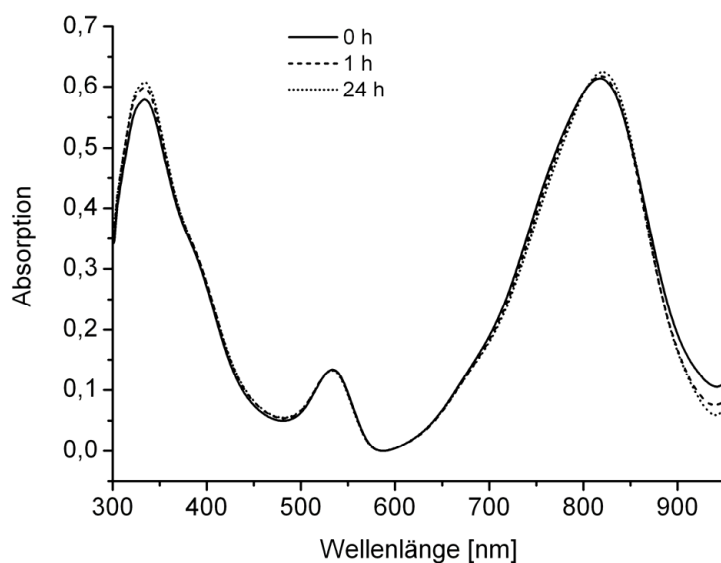


Abb. 3-56: Absorptionsspektren von 83 Å-FSM mit inkorporiertem Pd-BPheid a (WST09) nach 0, 1, und 24 h Inkubation in 50%-igem (v/v) wässrigem Glycerin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Pigment Pd-BPheid *a* (WST09) in FSM in Abhängigkeit vom Durchmesser der eingesetzten FSM in zwei verschiedenen Formen vorliegen kann, die sich in ihren spektralen Eigenschaften unterscheiden. In den 20 Å-FSM liegt es fast vollständig in einer Form mit einem  $Q_y$ -Absorptionsmaximum bei 763 nm vor, in 83 Å-FSM in einer Form mit einem  $Q_y$ -Absorptionsmaximum bei 821 nm. Die erste Absorptionswellenlänge ist typisch für ein monomeres Bakteriochlorophyll, die zweite für ein dimeres Bakteriochlorophyll mit versetzten, parallelen Tetrapyrrolringen. Eine Mischung dieser beiden Formen tritt bei 45 Å-FSM auf, wobei nach 0 h noch die monomere Form mit einem  $Q_y$ -Absorptionsmaximum bei 771 nm überwiegt, nach 24 h jedoch die dimere Form mit einem  $Q_y$ -Absorptionsmaximum bei 814 nm. Die Pigmentmoleküle sind offenbar trotz ihrer relativ festen Bindung an das FSM-Material in der Lage, ihre Position derart zu verändern, dass eine in dieser Umgebung energetisch begünstigte Interaktion mit einem zweiten Pigmentmolekül entstehen kann. Die spektralen Eigenschaften des Pd-BPheid *a* (WST09) in den FSM unterliegen folglich einer sterischen Kontrolle. In den Kanälen der FSM mit dem geringsten Durchmesser (20 Å) kann kein Pigmentmolekül mit einem zweiten interagieren. In den FSM mit dem größten Durchmesser (83 Å) liegen alle Pigmentmoleküle als Dimere vor, da diese Wechselwirkung offenbar relativ problemlos bewerkstelligt werden kann. Am interessantesten ist die Situation in den FSM mit mittlerem Durchmesser (45 Å), bei denen in einem organischem Lösungsmittel (Toluol) zunächst klar die monomere Form überwiegt. Wird dieses Lösungsmittel jedoch durch Trocknung entzogen, so richten sich die Pigmentmoleküle offenbar neu aus, so dass sie miteinander in Kontakt treten können.

### 3.6.5 Pigment-Aggregate in FSM – Teil II: WST11

Für die Inkorporationsexperimente wurden 1,5 ml einer WST11-Lösung in  $H_2O_{\text{dest.}}$  (OD: ~1,6) mit jeweils 3 mg FSM versetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die FSM abzentrifugiert. Die durch die Pigmenteinlagerung zartrosa gefärbten FSM im Niederschlag wurden mit  $H_2O_{\text{dest.}}$  gewaschen, und wie die FSM der oben beschriebenen Experimente mit WST09 in 50%-igem (v/v) wässrigem Glycerin aufgenommen.

In der verwendeten  $H_2O_{\text{dest.}}$ -Ausgangslösung weist WST11 vier Absorptionsbanden auf (Abb. 3-57): 330 nm ( $B_y$ ), 380 nm ( $B_x$ ), 521 nm ( $Q_x$ ), und 747 nm ( $Q_y$ ). Während der nächsten 24 h oxidierte ein Teil des Pigments, obwohl die Lösung durchgehend bei 4 °C gelagert wurde, zum entsprechenden WST11-Chlorinderivat mit zwei besonders im Differenzspektrum deutlich erkennbaren Absorptionsbanden bei 418 nm (Soret) und 641 nm ( $Q_y$ ).

Außer dieser neu hinzugekommenen Bande bei 643 nm änderte sich die Lage der WST11-Absorptionsmaxima auch nach 24 h nur kaum: 330 nm ( $B_y$ ), 381 nm ( $B_x$ ), 521 nm ( $Q_x$ ), und 748 nm ( $Q_y$ ).

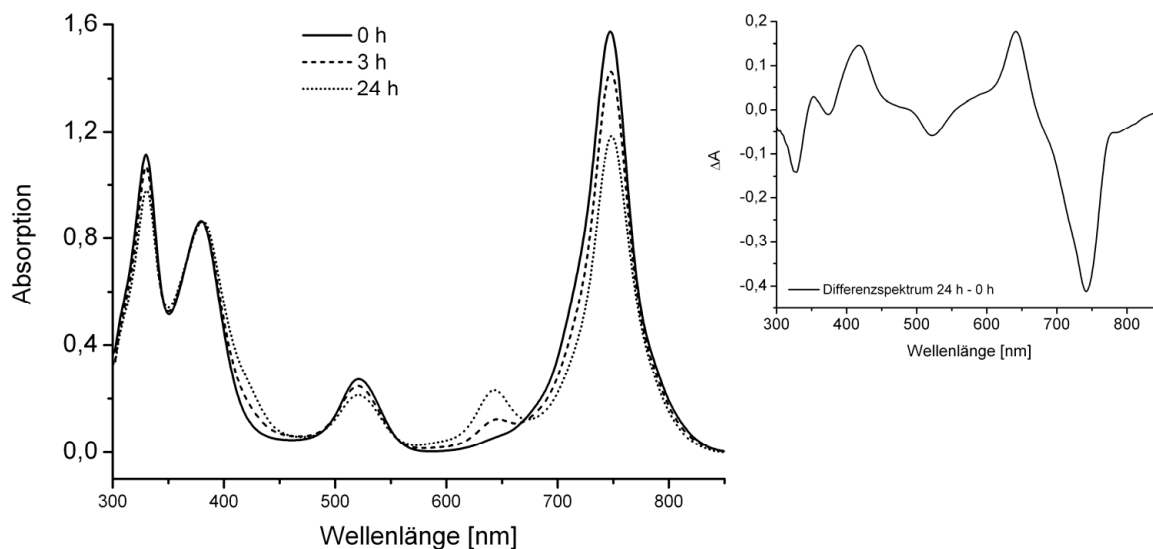


Abb. 3-57: Absorptionsspektren von WST11 in  $H_2O_{dest.}$  nach 0, 3, und 24 h Lagerung (links), und zugehöriges Differenzspektrum (24 h minus 0 h) (rechts).

Auch in den Ansätzen mit FSM war die oben beschriebene Oxidation zum entsprechenden WST11-Chlorinderivat zu beobachten (Abb. 3-58). Im Überstand der Ansätze waren die Wellenlängen der Absorptionsmaxima nahezu identisch mit denen in einer Lösung ohne FSM: 331 nm ( $B_y$  WST11), 382 nm ( $B_x$  WST11), 523 nm ( $Q_x$  WST11), 643 nm ( $Q_y$  WST11-Chlorinderivat) und 749 nm ( $Q_y$  WST11).

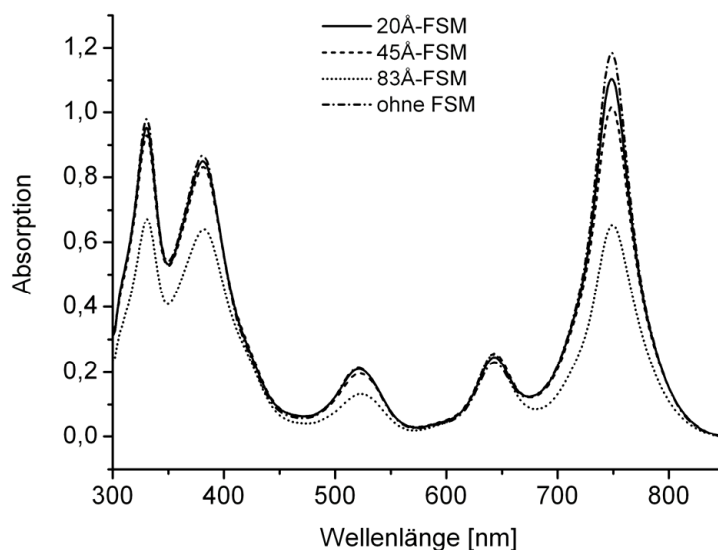


Abb. 3-58: Absorptionsspektren der Überstände der Ansätze mit FSM und WST11 (LM:  $H_2O_{dest.}$ ).

In den Ansätzen mit 20Å- und 45Å-FSM war nur ein geringfügiger (~7% bzw. ~14%), im Ansatz mit 83Å-FSM dagegen ein deutlich größerer Absorptionsrückgang festzustellen (~45%). Im Vergleich zu Pd-BPheid a (WST09) wurde insgesamt nur sehr wenig Pigment aufgenommen.

Die Absorptionsspektren der FSM bestätigen dieses Ergebnis (Abb. 3-59). Die 83Å-FSM hatten deutlich mehr WST11 inkorporiert als die 20Å- und 45Å-FSM, wodurch der Überstand des erstgenannten Ansatzes stärker an Pigment verarmt war als die beiden anderen Überstände. Das relative Mengenverhältnis an inkorporiertem WST11 in den drei FSM entsprach in etwa dem Absorptionsrückgang in den entsprechenden Überständen der Ansätze: 20Å-FSM/45Å-FSM/83Å-FSM  $\approx$  1:2:6,5. Die Absorptionsmaxima hatten sich teilweise im Vergleich zu den Überständen etwas verschoben: 330 nm ( $B_y$  WST11), 386 nm ( $B_x$  WST11), 516 nm ( $Q_x$  WST11), 637 nm ( $Q_y$  WST11-Chlorinderivat), und 753 nm ( $Q_y$  WST11).

Die hypsochrome Verschiebung des WST11- $Q_x$ -Absorptionsmaximums (+4 nm) und die bathochrome Verschiebung des WST11- $Q_y$ -Absorptionsmaximums (-7 nm) deuten auf eine stärkere Abschirmung des Pigments im Vergleich zum Zustand in  $H_2O_{dest.}$  hin, geben aber keine Hinweise auf Aggregation.

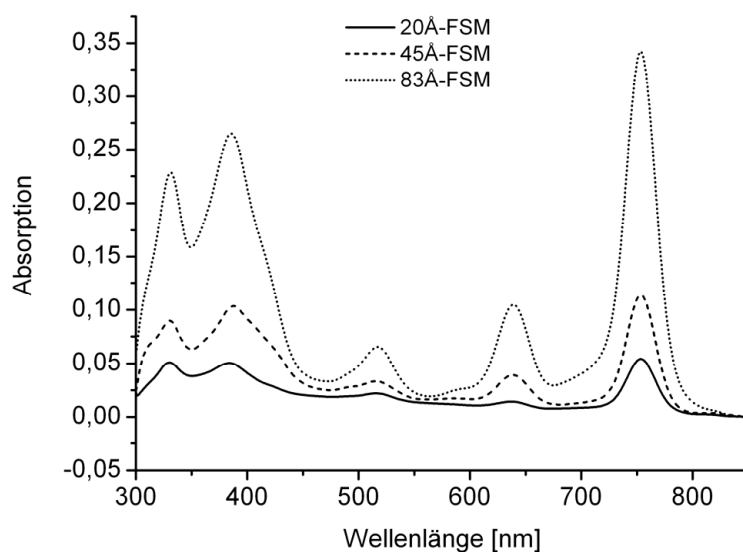


Abb. 3-59: Absorptionsspektren von FSM mit inkorporiertem WST11 in 50%-igem (v/v) wässrigem Glycerin. Die entsprechenden Überstände dieser Ansätze sind in Abb. 3-58 dargestellt.

Das innere der Röhrcchen ist anscheinend relativ unpolar, so dass das sehr polare WST11 deutlich schlechter als Pd-BPheid a (WST09) adsorbiert wird. Das Fehlen jeglicher WST11-Aggregate ist möglicherweise auch dadurch begründet, dass die Aggregation von Bakteriochlorophyllen normalerweise bevorzugt im Bereich des isocyclischen Ringes E einsetzt, der dem WST11 jedoch fehlt.

Durch Vergleich der Absorptionsabnahmen von WST11 im Überstand der FSM-Ansätze mit dem von WST11 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  ohne FSM konnte gezeigt werden, dass die Reaktion bereits nach 3 h abgeschlossen ist (Abb. 3-60). Die in allen Ansätzen in den weiteren 21 h beobachtete Absorptionsabnahme von  $\sim 12$  mOD/h ist auf die Oxidation des WST11 zum entsprechenden Chlorinderivat zurückzuführen.

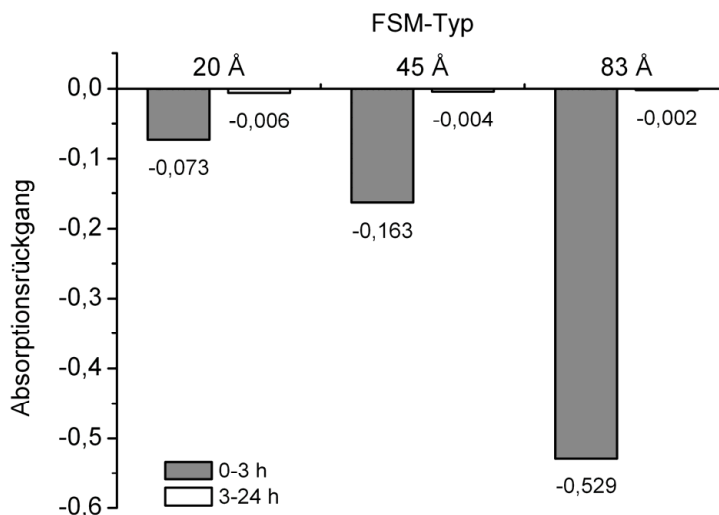


Abb. 3-60: Absorptionsabnahme von WST11 im Überstand der FSM-Ansätze in den Zeitintervallen von 0–3 h und 3–24 h relativ zu WST11 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  ohne FSM.

In einer methanolischen Lösung von WST11 war keine Bindung an FSM-Materialien feststellbar (ohne Abb.). Das zugesetzte Pigment befand sich auch nach 24 h noch vollständig im Überstand.

### 3.7 Photoinduzierte Modifikation der Lipoprotein-Oberflächenladung

Lipoproteine können in ihrem nativen Zustand in einem Agarose/Agar/Albumin-Gelsystem (AAAGE; siehe Kap. 2.6.1) aufgetrennt werden. Wie bei anderen nativen Gelsystemen erfolgte die Trennung dabei sowohl nach der Größe, wie auch der Oberflächenladung der im elektrischen Feld wandernden Partikel. Da auf Grund der enormen Größe der aufzutrennenden Lipoproteine (200–2500 kDa) mit einer sehr geringen Agarose-Konzentration gearbeitet werden musste, wurde dem Gel durch Zusatz von Agar mehr Festigkeit verliehen. Die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) verbreiterte zwar geringfügig die Banden, sorgte jedoch für ein homogeneres Laufverhalten der Lipoproteine, indem Irregularitäten der Bandenform eliminiert wurden (Noble, 1968). Die Wirkungsweise von Albumin beruht wahrscheinlich auf einer Absättigung geladener Gruppen in der Agarose/Agar-Matrix.



Es existieren mehrere Möglichkeiten zur Anfärbung bzw. Quantifizierung von Lipoproteinen nach erfolgter Elektrophorese (Greenspan *et al.*, 1995), jedoch erwies sich im verwendeten Gelsystem eine derartige Färbung als unnötig, da die Lipoprotein-Banden bereits nach dem Fixieren und Trocknen deutlich als weiße Banden im völlig klaren Gel erkennbar waren.

Mit Cremophor<sup>®</sup> EL, Triton X-100 oder Tween-80 inkubierte Lipoproteine weisen allerdings eine reduzierte elektrophoretische Mobilität auf, die abhängig ist von der zugesetzten Menge an Detergens (Woodburn und Kessel, 1994a; Woodburn *et al.*, 1994b). Dies konnte durch die Inkubation einer aufkonzentrierten HDL-Fraktion mit 1% (v/v) Cremophor<sup>®</sup> EL / Ethanol (1:1 v/v)) und anschließender elektrophoretischer Analyse bestätigt werden (Abb. 3-61).

Mit Cremophor<sup>®</sup> EL wurde die Wanderungsgeschwindigkeit der HDL enorm verlangsamt, unabhängig davon, ob die HDL mit Pigment beladen waren oder nicht. Diese Verlangsamung kann nicht durch den reinen HDL-Massenzuwachs erklärt werden, selbst wenn man eine vollständige Aufnahme des Cremophor<sup>®</sup> EL in die HDL annimmt. Dies wird durch die Feststellung bestätigt, dass die Dichte von HDL bei Zusatz von Cremophor<sup>®</sup> EL (1–4 mg/ml) lediglich geringfügig abnimmt (Kongshaug *et al.*, 1991). Wahrscheinlich wird nur ein Teil der Cremophor<sup>®</sup> EL-Moleküle in die HDL aufgenommen, der Rest der Moleküle wirkt wie ein Schleppanker und/oder schirmt negative Ladungen an der HDL-Oberfläche ab.

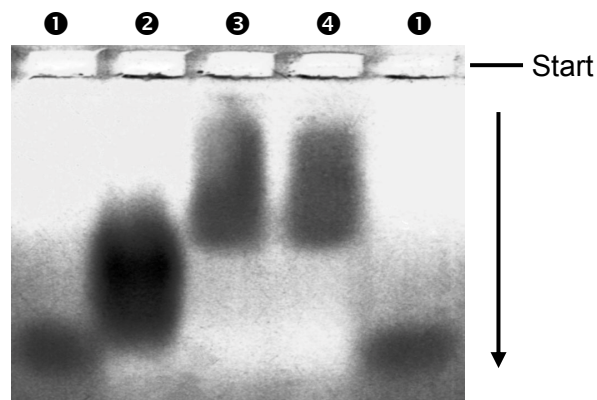


Abb. 3-61: Einfluss von Cremophor<sup>®</sup> EL auf die Wanderungsgeschwindigkeit von HDL in AAA-Gelen. ❶: Marker (Albumin); ❷: HDL ozP; ❸: HDL ozP + 1% (v/v) C; ❹: HDL ozP + 1% (v/v) C / Pd-BPheid a. C: Cremophor<sup>®</sup> EL / Ethanol (1:1 (v/v)). Die HDL waren etwa 5-fach aufkonzentriert und wurden nach Zusatz von 1% (v/v) C über Nacht inkubiert. Der Pfeil gibt die Laufrichtung des Gels an.

Das Massenverhältnis der Lipoproteine zu Cremophor<sup>®</sup> EL in diesem Experiment (~40 mg HDL und ~5 mg Cremophor<sup>®</sup> EL) war in etwa identisch mit dem bei normaler Anwendung des CES-Insertionssystems (~400 mg Lipoproteine und ~50 mg Cremophor<sup>®</sup> EL).

Der gleiche Effekt zeigte sich bei Lipoprotein-Fractionen, wenn das Blutplasma vor der Fraktionierung mit der Cremophor<sup>®</sup> EL-haltigen CES-Insertionslösung inkubiert wurde. So nahm auch die Wanderungsgeschwindigkeit von LDL deutlich ab, wenn sie in Kontakt mit Cremophor<sup>®</sup> EL kamen (Abb. 3-62). Dagegen war keine nennenswerte Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit festzustellen, wenn dem Blutplasma WST11 in Phosphatpuffer zugegeben wurde. Dies ist der eindeutige Beweis, dass dieser Effekt ausschließlich von Cremophor<sup>®</sup> EL herrührt.

Bei Belichtung nahm die Wanderungsgeschwindigkeit aller Pigment-beladenen Lipoproteine in Relation zu den entsprechenden Lipoproteinen ohne zugesetztes Pigment geringfügig zu, was jedoch in der Abbildung nur relativ schlecht erkennbar ist.

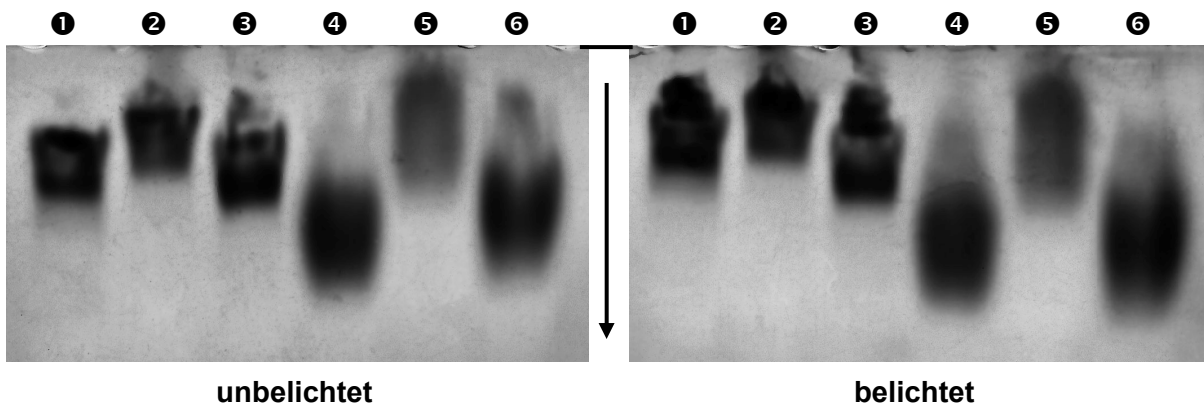


Abb. 3-62: AAAGE von unbelichteten (links) und belichteten (rechts) Lipoprotein-Fractionen. ❶: LDL ozP; ❷: LDL + Pd-BPheid a (WST09), enthält Cremophor<sup>®</sup> EL; ❸: LDL + WST11; ❹: HDL ozP; ❺: HDL + Pd-BPheid a (WST09), enthält Cremophor<sup>®</sup> EL; ❻: HDL + WST11. Identische Nummerierung bei beiden Gelen. Belichtungszeit: 60 min (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Der Querstrich markiert die Position der Geltaschen, der Pfeil gibt die Gel-Laufrichtung an.

Diese Unterschiede können durch eine graphische Darstellung weitaus übersichtlicher dargestellt werden (Abb. 3-63). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteine mit WST11 nahm etwa 2,5× stärker zu als die der Lipoproteine mit Pd-BPheid a (WST09). Dies ist möglicherweise mit einer stärkeren Exponierung des WST11 zur wässrigen Umgebung des Lipoproteins zu erklären, die auf Grund der deutlich höheren Polarität dieses Pigments im Vergleich zu Pd-BPheid a (WST09) anzunehmen ist.

Zum anderen fiel die Zunahme der LDL- im Vergleich zur HDL-Wanderungsgeschwindigkeit um etwa 30% größer aus. Jedoch besitzen die LDL eine relativ geringe Anzahl negativer Oberflächen-Ladungen, da selbst die viel größeren VLDL in Gelen schneller wandern (ohne Abb.). Folglich müssten sich bei den LDL Ladungsveränderungen deutlich stärker bemerkbar machen als bei den HDL.

Entweder nahm folglich photoinduziert die Masse der Lipoproteine ab, oder es befanden sich mehr negative bzw. weniger positive Ladungen in exponierten Positionen. Letzteres ist am wahrscheinlichsten, da die Lysin-Reste der Apolipoproteine mit reaktiven Aldehyden wie Malondialdehyd (MDA) oder (*E*)-4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) reagieren können, wodurch Schiff'sche Basen gebildet werden (Haberland *et al.*, 1984; Hoff und O'Neil, 1993). Auch durch Zusatz von Kupfersalzen oxidierte LDL weisen durch die Bildung freier Fettsäuren, sowie die Modifikation von Lysin-Resten der B100-Apolipoproteine, in nativen Gelen eine erhöhte relative elektrophoretische Mobilität auf, da beide Veränderungen zu einer insgesamt negativeren Oberflächenladung führen (Jayaraman *et al.*, 2007).

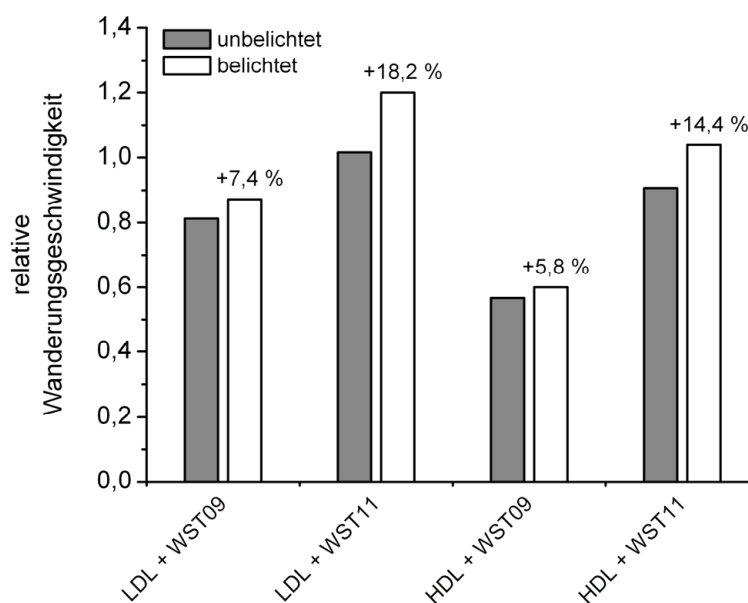


Abb. 3-63: Relative Wanderungsgeschwindigkeiten von unbelichteten und belichteten Lipoproteinen in AAA-Gelen. Alle angegebenen Geschwindigkeiten wurden auf die Wanderungsgeschwindigkeit der entsprechenden Lipoproteine ozP normiert. Die Werte wurden aus den beiden in Abb. 3-2 gezeigten AAA-Gelen ermittelt. Belichtungszeit: 60 min (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

### 3.8 Photoinduzierte Quervernetzung von Proteinen

Bei oxidierten LDL treten häufig bei PAGE-Analysen des Apolipoproteins höhermolekulare Banden auf, die auf eine Quervernetzung der B-100-Apolipoproteine hindeuten (Jayaraman *et al.*, 2007; Hoff *et al.*, 1992; Fong *et al.*, 1987). Die B-100-Apolipoproteine der oxidierten LDL werden zudem durch eine nicht-enzymatische Proteolyse stark fragmentiert, was sich in denaturierenden Gelen durch einen kontinuierlichen Schmier über alle Größenbereiche äußert (Jayaraman *et al.*, 2007; Hoff *et al.*, 1992; Fong *et al.*, 1987; Schuh *et al.*, 1978).

Aus diesem Grund wurde auch getestet, ob WST11 zu ähnlichen Modifikationen von Proteinen in der Lage ist. Dazu wurde eine Lösung von WST11 und Rinderserumalbumin (BSA) nach Belichtung mittels einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; siehe Kap. 2.6.2) auf evtl. entstandene Protein-Aggregate hin analysiert. Es konnten jedoch bei dieser Lösung (④) im Vergleich zu einer entsprechenden unbelichteten Lösung (③) weder neu hinzugekommene Banden, noch Veränderungen in der Konzentration bereits vorhandener Banden nachgewiesen werden (Abb. 3-64). Auch eine BSA-Lösung ohne WST11, die als Kontrolle diente, zeigte sowohl im belichteten (②), als auch im unbelichteten Zustand (①) ein mit den beiden pigmenthaltigen Proben identisches Bandenmuster.

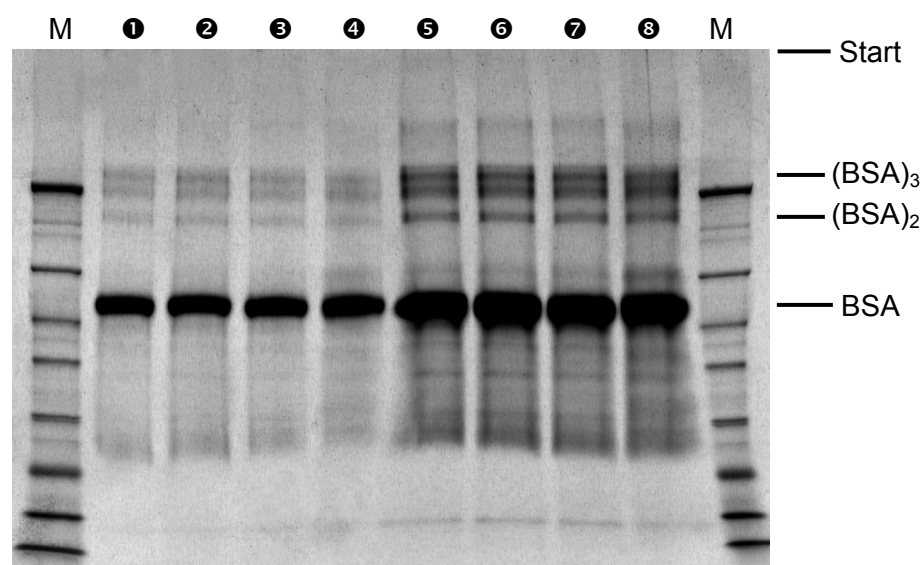


Abb. 3-64: SDS-PAGE zur möglichen Quervernetzung von BSA durch WST11. ①: BSA; ②: BSA belichtet; ③: BSA + WST11; ④: BSA + WST11 belichtet; ⑤–⑧: identisch mit ①–④, jedoch 5-fach aufkonzentriert; M: MW-Marker (175; 83; 62; 47,5; 32,5; 20,5; 16,5; 6,5 kDa). Albumin-Konzentration: ~6,6 mg/ml (~100  $\mu$ M); WST11-Konzentration: ~5 OD·ml/ml (~50  $\mu$ M); Alle Lösungen in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,2). Inkubationszeit: 60 min; Belichtungszeit: 60 min (NIR-Lichtintensität: ~530  $\mu$ E  $m^{-2} s^{-1}$ ; Filter: RG695).

Alle im Folgenden angegebenen Massen wurden anhand von Eichkurven berechnet, die mittels des verwendeten MW-Markers für jedes Gel individuell erstellt wurden (ohne Abb.).

Die Hauptmenge des BSA lag als Monomer vor (~66 kDa; theor.: 66,248 kDa). Daneben konnten auch BSA-Dimere (~131 kDa; theor.: 132,496 kDa), sowie BSA-Trimere (~204 kDa; theor.: 198,744 kDa) identifiziert werden. Des Weiteren waren zwei Banden unbekannter Proteine einer Masse von ~170 bzw. ~410 kDa (Schätzung) vorhanden. Bei letzteren könnte es sich möglicherweise um BSA-Hexamere handeln (theor.: 397,488 kDa).

In einem weiteren Experiment wurde anstelle des BSA eine HDP-Fraktion verwendet, der WST11 bereits vor der SDZ-Fraktionierung zugegeben worden war. Jedoch enthält HDP natürlich nicht BSA, sondern das humane Serumalbumin (HSA), das aber in vielen seiner biophysikalischen Eigenschaften auf Grund identischer physiologischer Aufgaben mit BSA identisch ist. Mit einem Massenanteil von etwa 55% an den gesamten Blutplasma-Proteinen stellt das Albumin erst recht in der HDP-Fraktion das Hauptprotein dar (Anderson *et al.*, 2002). Die Sequenzhomologie zwischen HSA und BSA liegt bei ~75,6% (Stehle *et al.*, 1999), trotzdem unterscheiden sich die beiden Albumine auch in einigen ihrer physiko-chemischen Eigenschaften deutlich voneinander (Steinhardt *et al.*, 1971). HSA ist ein Polypeptid aus 585 Aminosäuren (MW: 66290 Da), dessen durchschnittliche Blutplasma-Konzentration 40–50 g/l beträgt (Kongshaug, 1992). Es werden täglich ~12 g HSA in der Leber synthetisiert, welches mit einer Halbwertszeit von ~21 Tagen im Blutkreislauf zirkuliert (Anderson *et al.*, 2002).

Auch bei einer belichteten HDP-Fraktion mit WST11 (④) war keine signifikante Veränderung im PAGE-Bandenmuster im Vergleich zu der entsprechenden unbelichteten HDP-Fraktion (⑤), sowie den beiden Kontrollen ohne Pigment (① & ②) erkennbar (Abb. 3-65). Das HSA lag fast ausschließlich als Monomer vor (~69 kDa; theor.: 66,478 kDa). Bei den sehr schwachen Banden mit Proteinen von Massen >130 kDa könnte es sich möglicherweise um HSA-Aggregate vergleichbar den BSA-Oligomeren handeln.

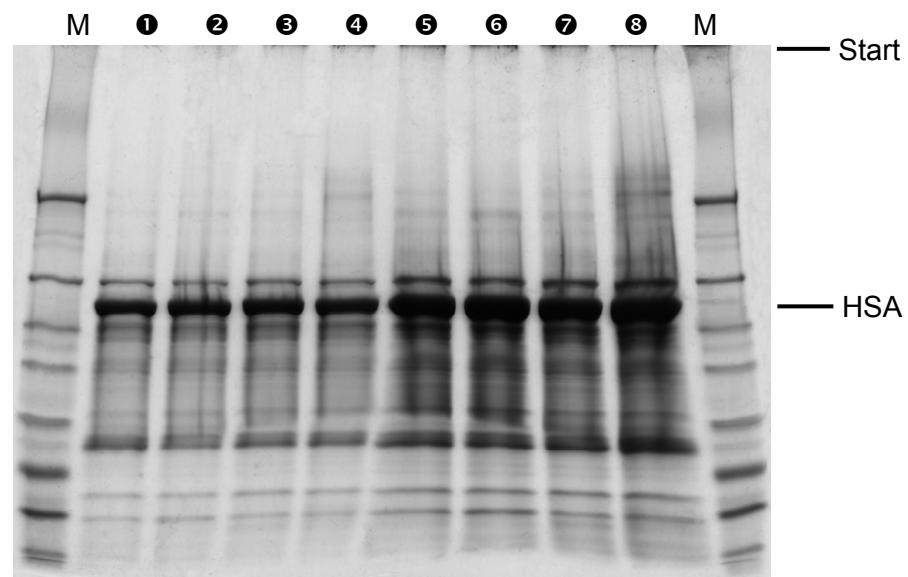


Abb. 3-65: SDS-PAGE zur möglichen Quervernetzung von HDP durch WST11. ①: HDP; ②: HDP belichtet; ③: HDP + WST11; ④: HDP + WST11 belichtet; ⑤–⑧: identisch mit ①–④, jedoch 5-fach aufkonzentriert; M: MW-Marker (175; 83; 62; 47,5; 32,5; 20,5; 16,5; 6,5 kDa). Protein-Konzentration: ~42 mg/ml; WST11-Konzentration: ~1,67 OD·ml/ml. Belichtung: 60 min (NIR-Lichtintensität: ~530  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

Für ein monomeres Protein besitzt HSA ganz außergewöhnliche Fähigkeiten bezüglich der Bindung endo- und exogener Liganden (Fasano *et al.*, 2005). Das Protein besitzt dazu mehrere Bindungsstellen; die beiden Hauptbindungsstellen liegen in hydrophoben Taschen der HSA-Subdomänen IIA und IIIA (He und Carter, 1992). Es handelt sich bei diesen beiden um Bindungsstellen, die bereits zuvor als *site I* und *site II* bezeichnet worden waren (Sudlow *et al.*, 1975; Sudlow *et al.*, 1976). Beide Bindungsstellen können Bakteriochlorin-Derivate aufnehmen, jedoch scheinen alle an *site II* gebundenen Pigmente eine höhere Phototoxizität *in vivo* zu bewirken (Pandey *et al.*, 1997). Die Bindungseigenschaften sind jedoch erheblich abhängig vom Redoxzustand des HSA (Oettl und Stauber, 2007).

Da jedoch im PAGE-Bandenmuster belichteter HDP-Fraktionen keine offensichtlichen Veränderungen erkennbar waren, bindet WST11 entweder Stellen des HSA, an der es keine nennenswerten Modifikationen induzieren kann, oder die erzeugten ROS werden äußerst effektiv durch andere Bestandteile der HDP-Fraktion chemisch oder physikalisch gequenchet.

Nachdem WST11 offenbar sowohl in BSA-, wie auch in HSA-Lösungen in zu keinen erkennbaren Modifikationen der Proteine in der Lage war, wurden die Experimente auch auf Lipoproteinlösungen ausgeweitet. Da die LDL mit dem B-100 nur ein einziges Apolipoprotein besitzen, welches aufgrund seiner Masse von ~550 kDa nur äußerst schwer mittels PAGE zu analysieren ist, wurden nur HDL-Fraktionen für die folgenden Experiment herangezogen.

Im Gegensatz zu den beiden Albumin-Lösungen kam es bei Belichtung einer HDL-Fraktion mit WST11 zu gravierenden Modifikationen der Apolipoproteine, die sich in sehr deutlichen Veränderungen des PAGE-Bandenmusters äußerten (Abb. 3-66). In der entsprechenden unbelichteten HDL-Fraktion mit WST11 dominierte wie in den beiden Kontrollen (belichtet ohne Pigment; unbelichtet mit Pigment) vor allem das Apolipoprotein A-I. Dessen Masse wurde anhand des MW-Markers zu ~23 kDa bestimmt, was deutlich unter der theoretischen Masse von ~28,5 kDa liegt. Jedoch werden die Molekulargewichte von Apolipoproteinen bei Verwendung der üblichen MW-Marker oft 2–3 kDa zu niedrig geschätzt (James *et al.*, 1988). Ebenfalls ist es möglich, dass es sich um ein bereits in der Literatur beschriebenes Bruchstück mit einer Masse von ~23 kDa handelt (Jauhainen *et al.*, 1999).

In der belichteten HDL-Fraktion mit WST11 war zum einen eine geringfügige Verschiebung der Bande des Apolipoproteins A-I zu einer größeren Masse zu beobachten (~26 kDa), zum anderen nahm die Intensität dieser Bande im Vergleich zu den entsprechenden Banden der drei anderen Proben etwas ab. Auch das in den drei anderen Proben vorhandene Bandenmuster zwischen 35 und 75 kDa war in der belichteten HDL-Fraktion mit WST11 nahezu vollständig verschwunden.

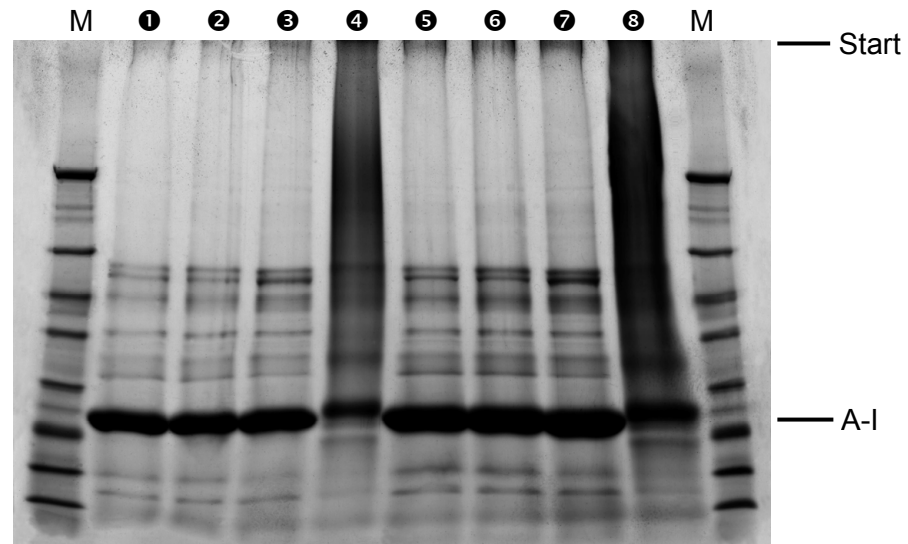


Abb. 3-66: SDS-PAGE-Gel zur Quervernetzung von HDL-Apolipoproteinen durch WST11. ①: HDL; ② HDL belichtet; ③: HDL + WST11; ④: HDL + WST11 belichtet; ⑤–⑧: identisch mit ①–④, jedoch 2-fach aufkonzentriert; M: MW-Marker (175; 83; 62; 47,5; 32,5; 20,5; 16,5; 6,5 kDa). Proteinkonzentration: ~4,9 mg/ml; WST11-Konzentration: ~5,9 OD·ml/ml. Belichtung: 60 min (NIR-Lichtintensität: ~530  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

An deren Stelle trat eine stark verschmierte Bande, die sich praktisch über die gesamte Laufstrecke der Proteine vom Start weg bis hin zu den modifizierten Bruchstücken des Apolipoproteins A-I hinzog. Das Maximum dieser lang gestreckten Bande war im Bereich zwischen 60 und 200 kDa zu finden. Die Ursache für diese Veränderung des Bandenmusters ist unklar. Das Fehlen von klar definierten Banden höheren Molekulargewichts spricht gegen eine einfache Di-/Oligomerisierung. Möglicherweise wurden jedoch die Proteine – sowohl die Monomere, wie auch die Aggregate – ROS-induziert zusätzlich durch kovalent gebundene Lipide weiter modifiziert, wodurch die beobachtete gleichmäßig verschmierte Bande entstand. Die Lipide dürften eher durch ihre chemischen Eigenschaften, als durch ihre Masse zu einer weiteren Erniedrigung der Protein-Wanderungsgeschwindigkeit im Gel beitragen. Möglicherweise handelte es sich hier um einen ähnlichen „Schleppanker“-Effekt, wie ihn Cremophor<sup>®</sup> EL auf die Lipoproteine bewirkt (Siehe Kap. 3.7). Ebenfalls denkbar ist eine nicht-enzymatische Proteolyse der photoinduzierten Aggregate.

Durch Modellsysteme wurde ermittelt, dass an der Quervernetzung von Proteinen vor allem Oxidationsprodukte des Histidins beteiligt sind, in deutlich geringerem Ausmaß die des Tryptophans und des Tyrosins, jedoch praktisch kaum die des Methionins und Cysteins (Dubbelman *et al.*, 1978). Die photoinduzierte Quervernetzung führt zu verschiedensten Aminosäure-Dimeren, deren chemische Struktur z. T. durch Versuchsreihen mit modifizierten natürlichen Aminosäuren aufgeklärt werden konnte (Shen *et al.*, 1996a; Shen *et al.*, 1996b; Spikes *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000a; Shen *et al.*, 2000b).

### 3.9 Photostabilität von Tetrapyrrolen in Lipoproteinen

#### Stabilität von Pd-BPheid a (WST09) in Lipoprotein-Fractionen

Die Stabilität von Pd-BPheid a bei Belichtung war in allen untersuchten Lipoproteinproben deutlich größer als in den Lösungen (DMSO, CES), die als Insertionssysteme Verwendung fanden (Abb. 3-67). Am schnellsten wurde das Pigment in CES gebleicht, in DMSO war die Bleichung langsamer. Zwischen LDL- und HDL-Proben nie war ein signifikanter Unterschied feststellbar.

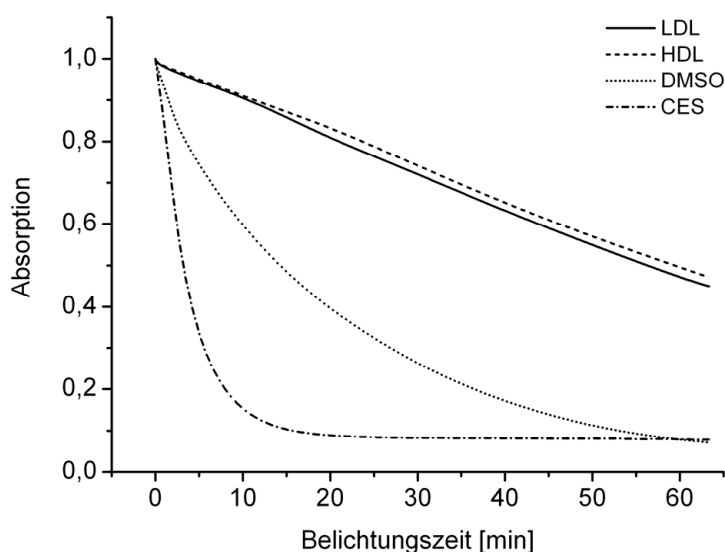


Abb. 3-67: Belichtungskinetiken von Pd-BPheid a (WST09) in einer LDL- und HDL-Fraktion, sowie in DMSO und CES. Dargestellt ist jeweils die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{start}} = 1,0$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

#### Photoinduzierte Bildung von Chlorin-Derivaten aus Bakteriochlorinen

In allen getesteten Lipoprotein-Fractionen entstand bei Belichtung aus Pd-BPheid a ( $Q_y$ : 762 nm) ausschließlich das Chlorin-Derivat 3Ac-Pd-Pheid a ( $Q_y$ : 659 nm), ein durch nochmalige Oxidation zu erwartendes Porphyrin-Derivat ( $Q_y$ :  $\sim 600$  nm) konnte nicht gefunden werden (Abb. 3-68). Dies konnte durch HPLC-Analysen der entstandenen Oxidationsprodukte verifiziert werden (siehe Kap. 3.12.1). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Belichtung von Pd-BPhe a mit NIR-Licht nur zu einer verhältnismäßig geringen Generierung von 3-Acetyl-3-devinyl-Pd-Phe a führt, die Belichtung mit UV-Licht dagegen die Bildung des Radikalkations (Pd-BPhe a) $^{\bullet\oplus}$  mit einem IR-Absorptionsmaximum bei 856 nm induziert (Stiel *et al.*, persönliche Mitteilung).



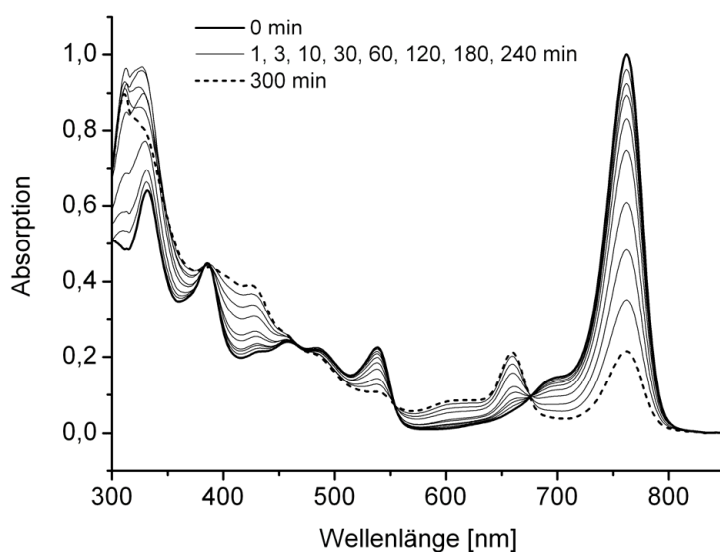


Abb. 3-68: Photoreaktion von Pd-BPheid *a* in einer LDL-Fraktion (dialysiert und aufkonzentriert ad  $A_{\text{start}} = 1,0$ ). Absorptionsspektren vor und nach ausgewählten Zeitpunkten der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

Die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums des Pd-BPheid *a* bei 762 nm nahm zwischen der 4. und 300. Minute der Belichtung nahezu konstant ab (Abb. 3-69). In den ersten drei Minuten war dagegen im Vergleich zu den unmittelbar folgenden ein deutlich größerer Rückgang der Absorption zu beobachten.

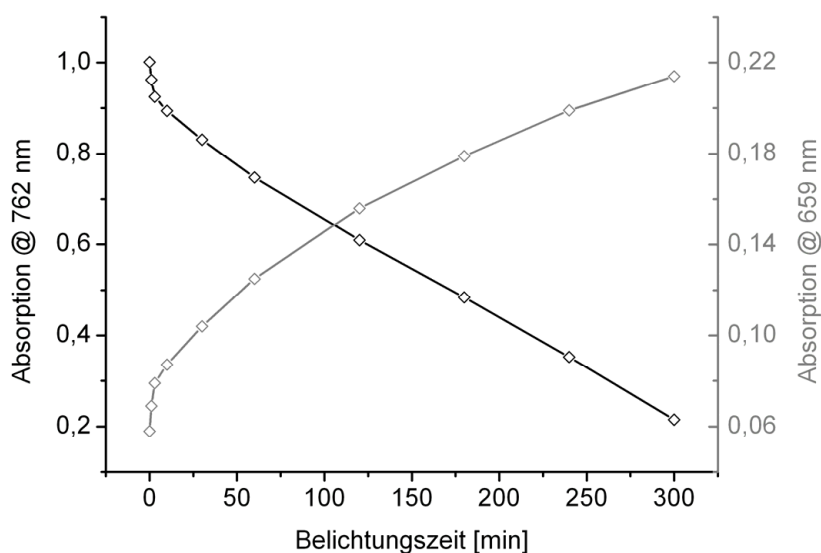


Abb. 3-69: Belichtungskinetik der in Abb. 3-68 dargestellten Photoreaktion. Dargestellt ist die Absorptionsabnahme des Edukts Pd-BPheid *a* bei 762 nm (schwarz) und die Absorptionszunahme des Produkts 3Ac-Pd-Pheid *a* bei 659 nm (grau). Messpunkte: 0, 1, 3, 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300 min.

Dies ist damit zu begründen, dass die Lösung zu Beginn der Belichtung schnell an Sauerstoff verarmt (siehe Kap. 3.9.4), der dann nur noch durch Diffusion nachgeliefert wird. Aufgrund der dadurch bedingten zunehmend verringerten ROS-Bildung wird weniger Pigment gebleicht. Der konstante Absorptionsrückgang zu späteren Zeitpunkten der Belichtung lässt darauf schließen, dass es keine nennenswerte Bleichung des Pigments ohne Sauerstoff gibt, da diese Kinetik eher einem exponentiellen Typ folgen sollte. Die Nachdiffusion von Sauerstoff ist dagegen nach der anfänglichen Sauerstoff-Verarmung konstant über die Zeit, und erklärt damit den linearen Typ der Kinetik.

Die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums des Oxidationsproduktes 3Ac-Pd-Pheid *a* nahm besonders in den ersten drei Minuten der Belichtung sehr stark zu, und verlangsamte sich im weiteren Verlauf der Belichtung zusehend, ein linearer Typ der Kinetik stellte sich jedoch nicht ein. Damit ist diese Kinetik hinsichtlich ihres Verlaufs fast ein Spiegelbild der oben beschriebenen Absorptionsabnahme des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums des Reaktionseduktes Pd-BPheid *a*. Durch eine weitere Auswertung der Kinetiken konnte dies noch besser veranschaulicht werden. Normiert man die Absorptionsabnahme pro Minute bei 762 nm und die Absorptionzunahme pro Minute bei 659 nm auf einen gemeinsamen Anfangswert (1,0) für die erste Minute, so ist klar ersichtlich, dass beide Kinetiken nahezu den gleichen Verlauf besitzen (Abb. 3-70).

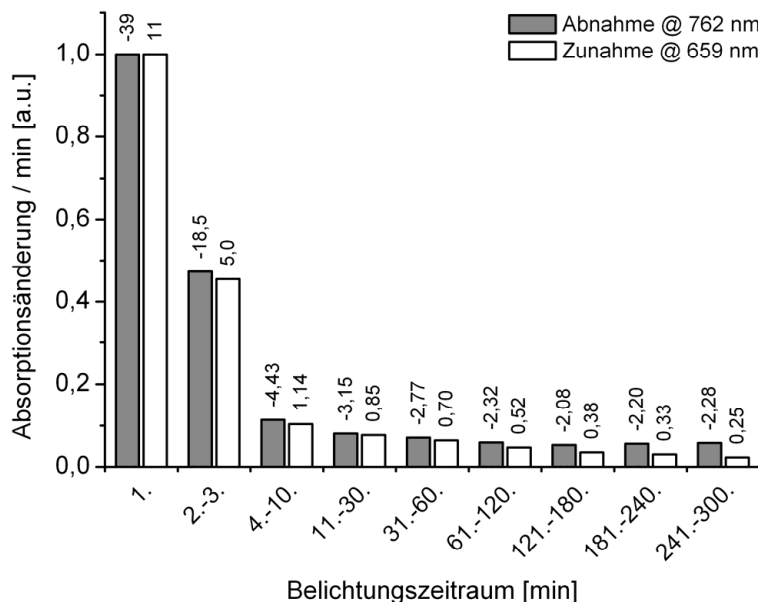


Abb. 3-70: Absorptionszunahmen bei 762 nm/min und Absorptionszunahmen bei 659 nm/min der in den Abb. 3-68 und 3-69 gezeigten Photoreaktion bzw. Belichtungskinetik. Die Werte für die erste Minute wurden in beiden Fällen auf 1,0 normiert. Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um die originalen, d. h. nicht-normierten Werte der Absorptionsänderung [mOD/min.].

Bei Betrachtung der nicht-normierten Werte der Absorptionsänderung ist festzustellen, dass die Absorptionsabnahme bei 762 nm durch Bleichung von Pd-BPheid *a* stets mindestens 3,5× größer ist als die Absorptionszunahme bei 659 nm durch Bildung von 3Ac-Pd-Pheid *a*. Da die Absorptionskoeffizienten beider Pigmente relativ ähnlich sind (Pd-BPheid *a*:  $\sim 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; 3Ac-Pd-Pheid *a*:  $7,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Vakrat-Haglili *et al.*, 2005), bedeutet dies, dass nur etwa ein Drittel des Pd-BPheid *a* bei Bleichung in 3Ac-Pd-Pheid *a* umgewandelt wird, die übrigen zwei Drittel dagegen in Abbauprodukte, die im sichtbaren Spektralbereich nur schwach absorbieren oder sogar farblos sind.

Die Absorptionszunahme des Oxidationsprodukts 3Ac-Pd-Pheid *a* nimmt in Relation zur Absorptionsabnahme des Edukts Pd-BPheid *a* mit zunehmender Belichtungszeit etwas ab. Dies kommt sehr wahrscheinlich dadurch zustande, dass auch das Chlorin-Derivat gebleicht wird, da es im Spektralbereich knapp unter 700 nm noch eine geringe Absorption aufweist. Obwohl das Pigment wie alle Chlorine bei Belichtung viel stabiler als das entsprechende Bakteriochlorin ist, macht sich über einen so langen Belichtungszeitraum eine langsame Bleichung messbar bemerkbar.

#### Stabilität von WST11 in Lipoprotein-Fraktionen

Auch WST11 ist in Lipoproteinproben um ein vielfaches stabiler gegenüber photoinduzierter Bleichung als in einem wässrigen System (Abb. 3-71).

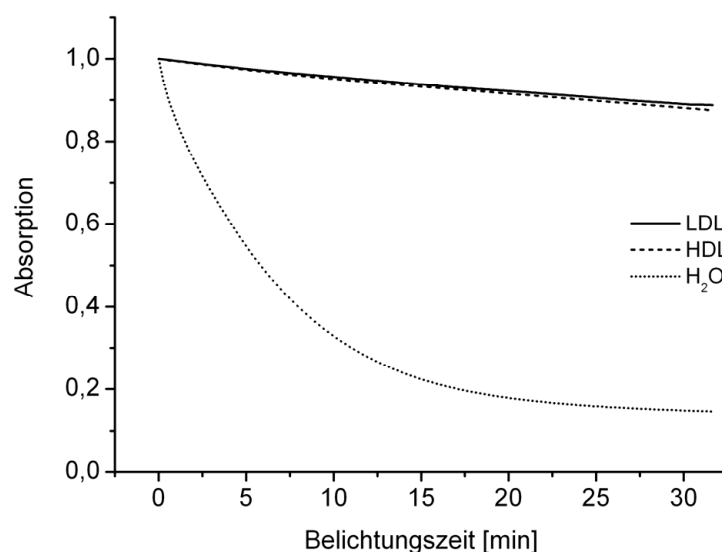


Abb. 3-71: Belichtungskinetiken von WST11 in einer LDL- und HDL-Fraktion, sowie in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ . Dargestellt ist jeweils die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 1,0$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 12 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

In diesem Fall konnte auf Grund der relativ großen Polarität des Pigments reines Wasser als Lösungsmittel verwendet werden. Wie bereits bei den mit Pd-BPheid a (WST09) inkubierten Proben (vgl. Abb. 3-67) ist zwischen LDL- und HDL-Proben kein signifikanter Unterschied feststellbar.

### 3.9.1 Einfluss der Dialyse auf die Photostabilität

Da unnatürlich hohe Salzkonzentrationen die Stabilität von Lipoproteinen herabsetzen können (Jayaraman *et al.*, 2006), wurden alle HDL-Fractionen ( $\rho$ : ~1,14 kg/l) gegen TE-Puffer III ( $\rho$ : 1,063 kg/l) dialysiert. Durch diese Erniedrigung der Salzkonzentration wird die Haltbarkeit der Proben verlängert. Alle LDL-Fractionen ( $\rho$ : ~1,06 kg/l) wurden ebenfalls einer identischen Dialyse unterworfen, um alle löslichen Komponenten in gleichem Maße zu reduzieren wie in den HDL-Fractionen. Auch alle HDP-Fractionen ( $\rho$ : ~1,185 kg/l) wurden stets dialysiert.

Die Absorptionsspektren der Fractionen vor und nach Dialyse unterschieden sich gewöhnlich nicht (ohne Abb.). Lediglich die Proben mit WST11 zeigten bei Dialyse gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  Spuren eines Oxidationsproduktes (Abb. 3-72). Dabei handelt es sich um das Chlorin-Derivat des WST11 mit einem  $Q_y$ -Absorptionsmaximum bei ~638 nm. Mehrmaliges dialysieren förderte die Bildung von Oxidationsprodukten, sowohl unmittelbar während der Dialyse, wie auch innerhalb der folgenden Wochen, wahrscheinlich durch eine zunehmende Konzentrations-Erniedrigung löslicher Antioxidantien.

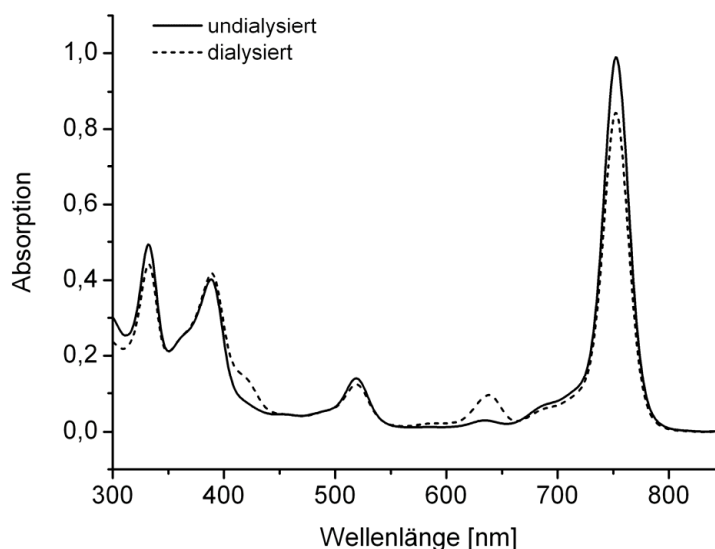


Abb. 3-72: Absorptionsspektren von HDL mit WST11 vor und nach Dialyse ü. N. gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

Die Dialyse setzte jedoch nicht nur die Stabilität der Pigmente in den Lipoproteinproben bei längerer Lagerung herab, sondern zeigte auch bei Belichtung einen z. T. deutlichen Einfluss auf die Stabilität der Pigmente. So kann es in allen dialysierten Proben zu einer etwas schnelleren Bleichung der Pigmente als in ihren undialysierten Vorläufer-Proben (Abb. 3-73).

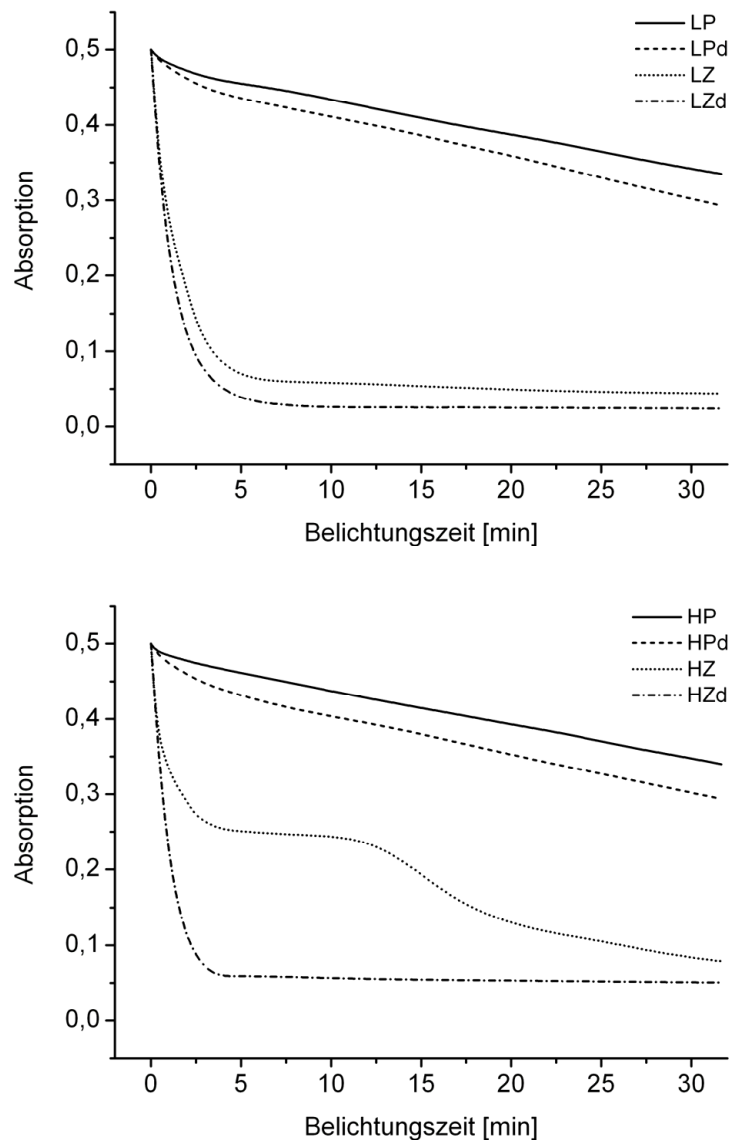


Abb. 3-73: Belichtungskinetiken Pigment-beladener LDL (L; oben) und HDL (H; unten) bei undialysierten oder gegen TE-Puffer III dialysierten Fraktionen. P, Z: Pd- bzw. Zn-BPheid a; d: dialysiert. Dargestellt ist jeweils die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 0,5$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

Ein ganz besonders auffälliger Unterscheid war bei den HDL-Fraktionen mit Zn-BPheid a erkennbar. In den undialysierten Fraktionen wurde nach einer anfänglichen Bleichung von  $\sim 50\%$  des Pigments das verbleibende Zn-BPheid a in den nächsten  $\sim 10$  Minuten sehr gut vor Bleichung geschützt.

Im weiteren Verlauf erfuhr auch dieser Anteil des Pigments eine relativ langsame, aber letzten Endes vollständige Bleichung. Es scheint folglich Schutzmechanismen vor Oxidation zu geben, welche sich zum einen mit der Zeit erschöpfen, zum anderen durch Dialyse entfernt werden. Dies bestätigt die bereits geäußerte Vermutung, dass es sich dabei um wasserlösliche Antioxidantien handelt, deren Konzentration durch die Dialyse so stark erniedrigt wurde, dass diese nur noch einen vernachlässigbaren Effekt auf die Pigmente ausüben können.

Dies gilt jedoch nicht für die hydrophoben Antioxidantien, wie z. B. die Carotinoide oder Tocopherole, deren Konzentration in LDL durch eine Dialyse nicht wesentlich verringert wird (Chopra *et al.*, 2001). Bezüglich des Carotinoid-Gehalts bestätigen die vor und nach Dialyse gemessenen Absorptionsspektren aller Lipoprotein-Fractionen deutlich diese Feststellung.

#### Stabilität von Zn-BPheid a in Lipoprotein-Fractionen

Die Stabilität von Zn-BPheid a bei Belichtung war in allen Proben stets deutlich geringer als die des Pd-BPheid a in entsprechenden Proben (vgl. 3-19). So besitzt Pd-BPheid a bei Belichtung in Lipoproteinen eine mehr als 40-mal größere Halbwertszeit als Zn-BPheid a in entsprechenden Proben. Es ist bekannt, dass die Pigment-Stabilität unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel und den Belichtungsparametern ist, und in der Reihe Cu-BPhe a > BPhe a ≈ Pd-BPhe a >> Zn-BPhe a > Mg-BPhe a abnimmt (Fiedor *et al.*, 2002).

### **3.9.2 Auswirkungen von D<sub>2</sub>O auf die Photostabilität**

Manche Autoren geben die gemessene O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)-Lebenszeit in H<sub>2</sub>O mit ~2 μs, und in D<sub>2</sub>O mit ~20 μs an (Merkel und Kearns, 1972), andere Autoren jedoch mit ~4,4 μs bzw. ~56 μs (Rodgers und Snowden, 1982). Unabhängig davon, welche dieser gemessenen Werte eher die tatsächlichen Lebenszeiten wiedergeben, das Verhältnis der D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O-Lebenszeiten ist jedoch in beiden Fällen vergleichbar.

In gegen H<sub>2</sub>O dialysierten HDL nahm die Photostabilität des inkorporierten Pd-BPheid a im Vergleich zur undialysierten Probe geringfügig ab (Abb. 3-74). Dies steht im Einklang mit den bereits in Kap. 3.9.1 beschriebenen Ergebnissen, und ist sehr wahrscheinlich auf die verringerte Konzentration an löslichen Antioxidantien zurückzuführen. Das Ausmaß dieses Effekts war sehr ähnlich, unabhängig davon, ob gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> oder TE-Puffer III dialysiert wurde. Der Salzgehalt der Probe scheint deshalb keinen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität des Pigments bei Belichtung zu haben.

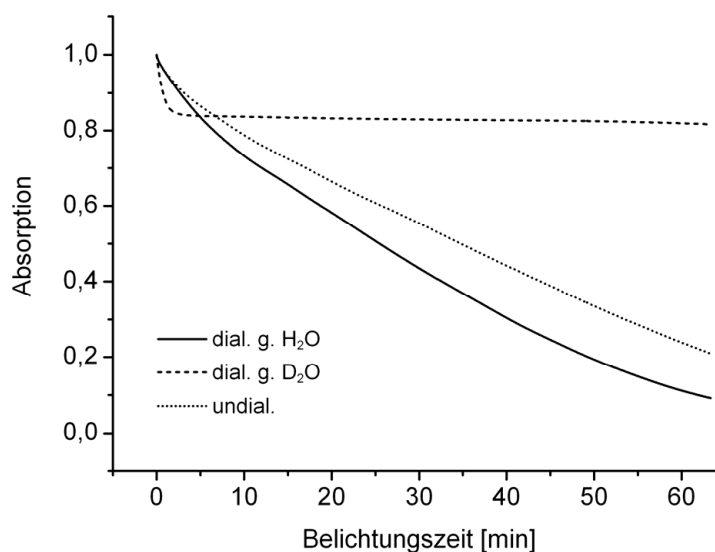


Abb. 3-74: Belichtungskinetiken von Pd-BPheid a (WST09) in HDL nach Dialyse gegen H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O. Dargestellt ist jeweils die Intensität des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 1,0$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Zum besseren Vergleich wurden auch undialysierte HDL mit Pd-BPheid a (WST09) belichtet.

Dagegen zeigte sich in gegen D<sub>2</sub>O dialysierten HDL eine völlig unerwartete Veränderung der Photostabilität des inkorporierten Pd-BPheid a. Während der ersten Minuten der Belichtung erfolgte im Vergleich zu den beiden H<sub>2</sub>O-Lösungen ein sehr viel schnellerer Intensitätsverlust des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums. Dies war zu erwarten gewesen, da Singulett-Sauerstoff in allen deuterierten Lösungsmitteln eine längere mittlere Lebensdauer besitzt (siehe oben und Kap. 1.2), und daher eher in der Lage ist, ein Pigmentmolekül zu bleichen. Nach etwa drei Minuten kam es jedoch zu nahezu keiner weiteren Bleichung des Pd-BPheid a mehr (Q<sub>y</sub>-Abs.: konst.  $\sim 0,83$ ), während sich in H<sub>2</sub>O die Bleichung fast unvermindert fortsetzte.

Dieses außergewöhnliche Ergebnis ist nicht erklärbar, da sich H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O bezüglich ihrer Sauerstofflöslichkeit und Viskosität nur geringfügig voneinander unterscheiden. Auch in D<sub>2</sub>O sollte daher eine weitere – eigentlich nach wie vor im Vergleich zu H<sub>2</sub>O schnellere – Bleichung des Pigments stattfinden.

Unklar war zunächst, ob dieses höchst bemerkenswerte Ergebnis auf einer sehr speziellen Eigenschaft der HDL, oder auf einer eher generellen Eigenschaft des Lösungsmittels D<sub>2</sub>O in einer Lipidumgebung beruht. Daher wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, in dem das Pd-BPheid a konzentriert (Q<sub>y</sub>-Abs.:  $\sim 40$ ) in Cremophor<sup>®</sup> EL / Ethanol 1:1 (v/v) gelöst, und diese Lösung nachfolgend 1:39 (v/v) mit H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O verdünnt wurde. Auch in diesem artifizialen System mit einer minimalen Anzahl von beteiligten Komponenten zeigten sich die beiden bereits in HDL beobachteten Phasen der Belichtung (Abb. 3-75).

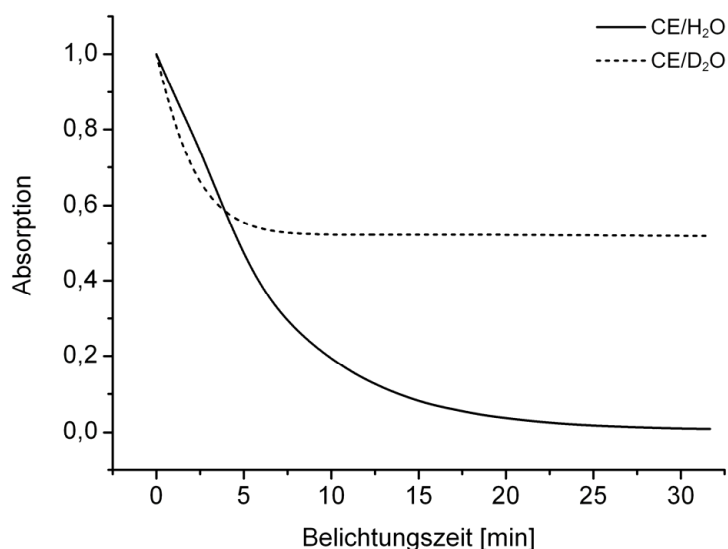


Abb. 3-75: Belichtungskinetiken von Pd-BPheid a (WST09) in wässriger Umgebung. Dargestellt ist jeweils die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 1,0$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Das Pigment wurde in Cremophor<sup>®</sup> EL / Ethanol 1:1 (v/v) angelöst und 1:39 (v/v) mit  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  verdünnt.

In den ersten Minuten bleicht das Pigment in der mit  $\text{D}_2\text{O}$  verdünnten Probe schneller als in der mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnten, aber danach verringert sich die Bleichung zunehmend, und kommt nach knapp 10 Minuten zum Stillstand ( $Q_y$ -Abs.: konst.  $\sim 0,52$ ). In der mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnten Probe war dagegen in Analogie zu den Ergebnissen mit HDL eine unvermindert fortgesetzte Bleichung des Pigments feststellbar. Das beobachtete Ergebnis scheint folglich eine allgemein gültige Eigenschaft des Lösungsmittels  $\text{D}_2\text{O}$  in einer Lipidumgebung zu sein, auch wenn das Ausmaß dieses Effekts in HDL deutlich größer als im getesteten artifiziellen System war. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte leider nicht gefunden werden.

Die Kinetik scheint im ersten Teil von der  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ -Halbwertszeit bestimmt zu werden, im zweiten Teil von der  $\text{O}_2$ -Konzentration, die nach einigen Minuten äußerst gering sein sollte, da Sauerstoff nur durch Diffusion nachgeliefert werden kann. Ein kinetischer Isotopeneffekt erscheint eher unwahrscheinlich, da es in diesem Fall in der zweiten Phase der Kinetik im  $\text{D}_2\text{O}$ -Ansatz zu einer langsamen, aber kontinuierlichen Bleichung hätte kommen müssen. Die wahrscheinlichste Erklärung für den beobachteten Isotopeneffekt ist wahrscheinlich eine veränderte Lipidstruktur in einer  $\text{D}_2\text{O}$ -Umgebung. Allerdings konnte gerade in Membranen, die ungesättigte Fettsäuren oder Cholesterin enthalten, kein Isotopeneffekt auf die molekulare Organisation der Lipidmembran nachgewiesen werden (Tokutake *et al.*, 2004).

In Analogie zu den bereits zuvor beschriebenen Ergebnissen mit Pd-BPheid a (WST09) nimmt auch in gegen  $\text{H}_2\text{O}$  dialysierten HDL mit inkorporiertem WST11 die Photostabilität des Pigments im Vergleich zur undialysierten Probe zunächst geringfügig ab (Abb. 3-76).



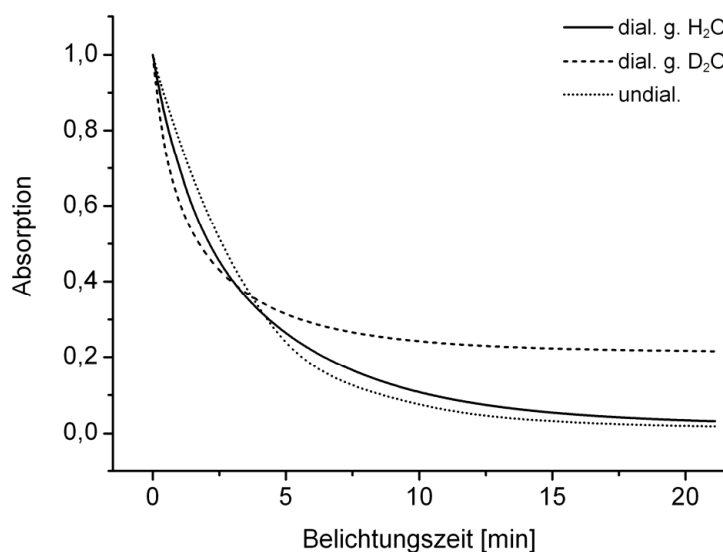


Abb. 3-76: Belichtungskinetiken von WST11 in HDL nach Dialyse gegen H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O. Dargestellt ist jeweils die Intensität des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 1,0$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 12 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Zum besseren Vergleich wurden auch undialysierte HDL mit WST11 belichtet.

Erst gegen Ende der Belichtung ist ein gegenteiliger Trend erkennbar, der dadurch bedingt wird, dass in der gegen H<sub>2</sub>O dialysierten Probe ein kleiner Teil des Pigments relativ stabil gegenüber photoinduzierter Bleichung war.

In gegen D<sub>2</sub>O dialysierten HDL ist ebenfalls in Analogie zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen in den ersten Minuten der Belichtung im Vergleich zu den beiden erstgenannten Proben ein stärkerer Rückgang der Absorption feststellbar. Nach diesen ersten Minuten verlangsamte sich jedoch die Bleichung des WST11, während sich in den beiden anderen Proben die Bleichung nahezu unvermindert fortsetzte. Die Absorption des WST11 nahm jedoch im Gegensatz zu den Experimenten mit Pd-BPheid *a* (WST09) in der gegen D<sub>2</sub>O dialysierten Probe beständig weiter ab, und näherte sich folglich keinem Endwert.

Im Gegensatz zu Pd-BPheid *a* (WST09) kann WST11 direkt in H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O gelöst werden. Bei Belichtung zeigte sich zunächst die in allen Proben beobachtete geringere Stabilität des Pigments in D<sub>2</sub>O, im weiteren Verlauf konnte jedoch keine Erhöhung der Stabilität im Vergleich zur anderen Probe festgestellt werden (Abb. 3-77). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Lipidumgebung für den in allen übrigen Proben beobachtenden teilweisen oder sogar vollständigen Schutz eines Teils des Pigments vor Bleichung verantwortlich ist. Der im Vergleich zu den Proben mit Pd-BPheid *a* (WST09) deutlich geringere Anteil an geschütztem WST11 in HDL ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass WST11 auf Grund seiner relativ guten Wasserlöslichkeit mehr mit dem Lösungsmittel in Kontakt tritt.

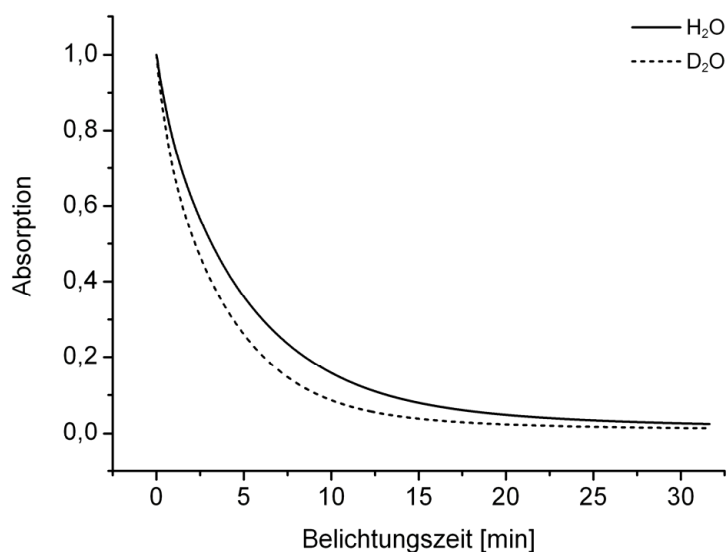


Abb. 3-77: Belichtungskinetiken von WST11 in reinem H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O. Dargestellt ist jeweils die Intensität des Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 1,0$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 12 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

### 3.9.3 Sauerstoffabhängigkeit der Photoreaktion

Der Einfluss der Sauerstoff-Sättigung einer Lösung auf die Photostabilität der in ihr gelösten Pigmente wurde zuerst in einem Vorversuch untersucht. Dazu wurden mit Pd-BPheid *a* beladene HDL verwendet, welche in zwei Aliquots aufgeteilt wurden. Beide Proben wurden gleichzeitig belichtet, jedoch wurde eine der beiden nach jeder Absorptionmessung so vorsichtig geschüttelt, dass es zu keiner Bildung von Luftblasen kam.

In anderen Vorversuchen zeigte sich, dass die Belichtungskinetiken sowohl mit, als auch ohne Rühren der Probe in der Küvette durch einen kleinen Rührfisch identisch waren (ohne Abb.). Aus diesem Grund wurde bei allen im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Versuchen auf ein Rühren der Probe verzichtet.

Während die Belichtungskinetik der geschüttelten Probe durchgehend einem eher exponentiellen Typ folgte, war in der nicht geschüttelten nach den ersten fünf Minuten eine konstante Bleichung des Pigments zu beobachten (Abb. 3-78). Dies deutet darauf hin, dass es keine Pigment-Bleichung ohne Sauerstoff-Beteiligung gibt, und dass die beobachtete konstante Bleichung ausschließlich auf nachdiffundierenden Sauerstoff zurückzuführen ist. Dagegen waren in den ersten fünf Minuten die Absorptionrückgänge in beiden Proben nahezu identisch, da in diesem Zeitraum auch die Sauerstoff-Konzentrationen in beiden Proben sehr ähnlich waren.

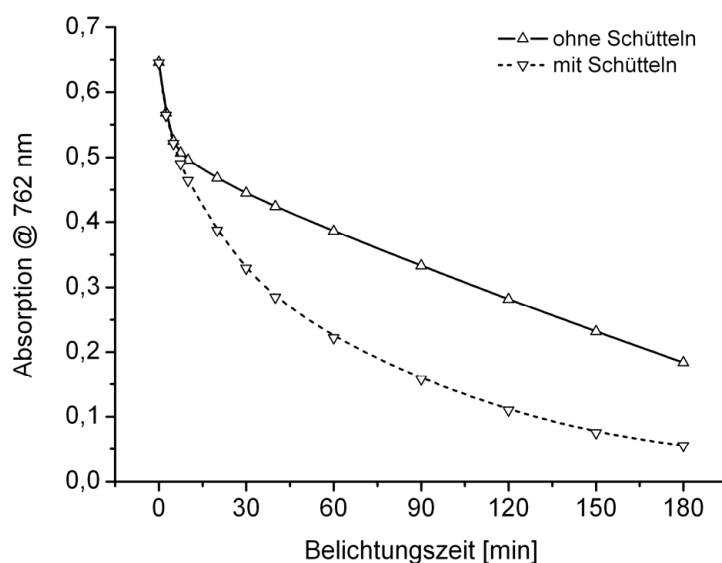


Abb. 3-78: Belichtungskinetiken von mit Pd-BPheid a beladenen HDL bei verschiedenen Sauerstoff-Sättigungen. Dargestellt ist jeweils  $A_{762}$  zu ausgewählten Zeitpunkten (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180 min) der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630). Eine der beiden ansonsten identischen Proben wurde nach jeder Absorptionsmessung vorsichtig geschüttelt.

Wurde der in Lipoprotein-Proben enthaltene Sauerstoff durch mehrfaches Entgasen und die Zugabe von Natriumdithionit vollständig entfernt, so nahm die Photostabilität der enthaltenen Pigmente erheblich zu (Abb. 3-79). In mit Pd-BPheid a beladenen Lipoproteinen wurde in den ersten Minuten ein Teil des Pigments gebleicht, bis der Sauerstoff in der Lösung verbraucht war. Danach war nur noch eine sehr langsame weitere Bleichung feststellbar. Dagegen kam es in der vollständig sauerstofffreien Lösung während der gesamten Dauer der Belichtung zu absolut keiner messbaren Bleichung des Pigments.

In mit Zn-BPheid a beladenen Lipoproteinen wurde in Gegenwart von Sauerstoff bereits innerhalb weniger Minuten das gesamte Pigment gebleicht. Dagegen kam es in einer vollständig sauerstofffreien Lösung während der gesamten Belichtung zu einer relativ langsamen, aber konstanten Bleichung des Pigments. Möglicherweise handelte es sich dabei um eine äußerst langsame Variante der Bleichung ohne Sauerstoff-Beteiligung, die bei den Messungen mit Pd-BPheid a auf Grund dessen um ein Vielfaches höherer genereller Photostabilität nicht erkennbar war.

Ebenfalls denkbar wäre auch eine Art Photoreduktion des Zn-BPheid a im Stile der z. B. bei Zn-Chlorinen beobachteten Krasnovskii-Reaktion (siehe Kap. 3.5.6), jedoch konnten weder in diesem Versuch, noch bei den speziellen Krasnovskii-Experimenten anhand der Absorptionsspektren derartige Photoreduktions-Produkte identifiziert werden.

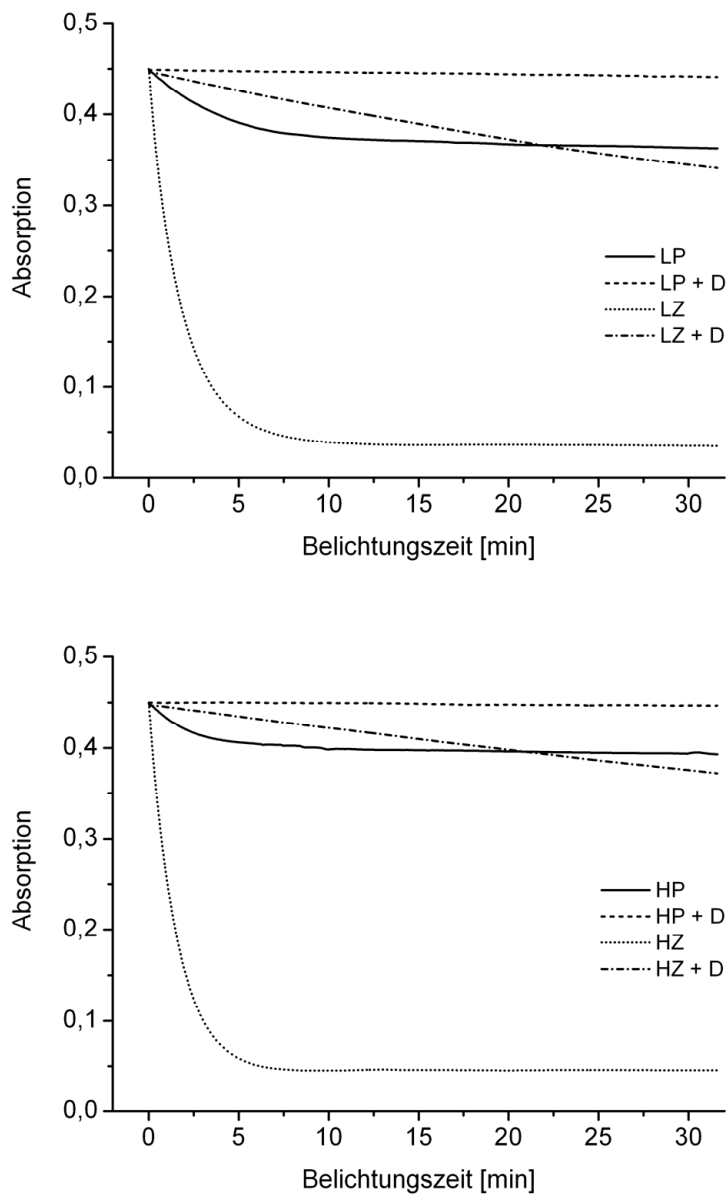
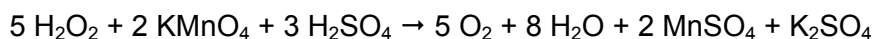
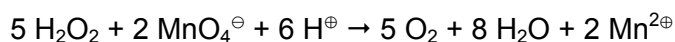


Abb. 3-79: Belichtungskinetiken Pigment-beladener LDL (L; oben) und HDL (H; unten) bei vollständiger Sauerstoff-Entfernung. Dargestellt ist jeweils die Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 0,45$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Alle Experimente wurden in einer dicht verschlossenen Thunberg-Küvette durchgeführt. P, Z: mit Pd- bzw. Zn-BPheid *a* inkubiert. D: mehrfach entgast und mit Argon geflutet, anschließend mit in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöstem Na-Dithionit (Endkonzentration: 15 mM) versetzt.

Wenn eine Erniedrigung der Sauerstoff-Konzentration einer Lösung die Photostabilität von darin gelösten Pigmenten erhöhen kann, so sollte auch der umgekehrte Effekt, d. h. eine stärkere Bleichung durch Zufuhr von reinem Sauerstoff, messbar sein. Für die folgenden Experimente wurde ein Sauerstoff-Generator verwendet, welcher molekularen Sauerstoff durch Oxidation von Wasserstoffperoxid erzeugt:



bzw. gekürzt



Es konnten leider keine Lipoprotein-Fractionen für diese Versuche verwendet werden, da diese bei Begasung auf Grund ihrer hohen Protein- und Lipid-Konzentrationen sehr stark schäumen. Da dies auch für Pigmente in CES gilt, konnten nur Experimente in wässrigem Milieu durchgeführt werden. Als Pigment für diese Versuche kam daher nur das in Wasser sehr gut lösliche WST11 in Frage.

Bei Belichtung einer WST11-Lösung ( $Q_y$ : 745 nm) in Phosphat-Puffer wurde neben farblosen Produkten vor allem das Chlorin-Derivat des WST11 mit einem  $Q_y$ -Absorptionsmaximum bei 639 nm gebildet (Abb. 3-80). Im Laufe der Belichtung kam es zu einer offenbar konzentrationsbedingten Verschiebung des WST11- $Q_y$ -Absorptionsmaximums von 745 auf 752 nm.

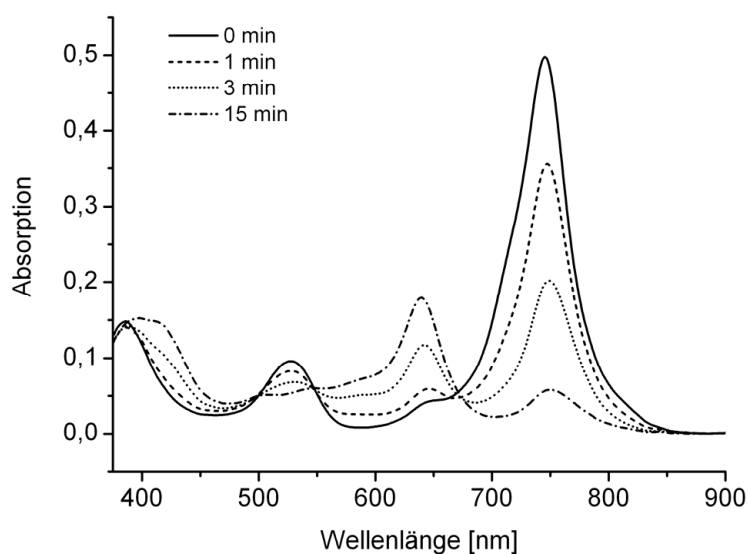


Abb. 3-80: Photoreaktion von WST11 in  $\text{O}_2$ -gesättigtem Phosphat-Puffer. Dargestellt sind die Absorptionsspektren zu ausgewählten Zeitpunkten (0, 1, 3, 15 min) der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).  $A_{\text{Start}} = 0,5$ .

Durch Begasung mit Sauerstoff während der gesamten Belichtung wurde nur in der ersten Minute die Bleichung des WST11 etwas erhöht, danach war kein signifikanter Unterschied zu einer unbegasen Probe feststellbar (ohne Abb.). Der Sauerstoff-Generator war offenbar nicht in der Lage, die Sauerstoff-Konzentration in der Probe im Bereich der Sättigung zu halten. Am Ende der Belichtung (vollständige Bleichung des WST11) war in der mit Sauerstoff begasten Probe lediglich  $\sim 14\%$  mehr des Chlorin-Derivats gebildet worden.

Bei Begasung mit Argon wurde nur ein relativ geringer Teil des Pigments gebleicht, und folglich auch nur sehr wenig des Chlorin-Derivats gebildet. Eine sinnvolle Quantifizierung der Ergebnisse war bei diesen Proben leider unmöglich.

Mit einer deutlich geringeren Konzentration des WST11 ( $A_{\text{Start}} = 0,12$ ) war es jedoch möglich, die Sauerstoff-Konzentration durch Begasung länger auf einem ausreichend hohem Niveau zu halten. Allerdings reichte die Menge an gebildetem Chlorin-Derivat nicht mehr aus, um auch dies quantifizieren zu können. Daher wurde ein externer Sensor für die Oxidationskraft des Pigments zugesetzt.

Die Wahl fiel auf das auch in den Hydroperoxid-Bestimmungen verwendete 2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ; siehe Kap. 3.10.1). Es besitzt im Spektralbereich über 700 nm, in dem sich das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum des WST11 befindet, keine Absorption (siehe Anhang D), und verfälscht daher nicht die Quantifizierung der Bleichung. Gleiches gilt auch für die oxidierte Form, das 2',7'-Dichloro-fluorescein (DCF). Das DCF-System kann z. B. auch zur *ex vivo* Bestimmung der Photosensibilisator-Konzentration und/oder PDT-Effizienz in gewöhnlichem Biopsiematerial verwendet werden (Bourre *et al.*, 2002).

Bei Belichtung einer Lösung von WST11 ( $Q_y$ : 753 nm) und  $\text{H}_2\text{DCF}$  (50 mM) in Phosphat-Puffer wurde erneut neben farblosen Produkten das Chlorin-Derivat des WST11 ( $Q_y$ : 642 nm) gebildet (Abb. 3-81). Gleichzeitig wird jedoch auch DCF mit einem Absorptionsmaximum bei 501 nm gebildet, dessen Absorptionzunahme am Ende der Belichtung etwa 14× größer ist als die des Chlorin-Derivats.

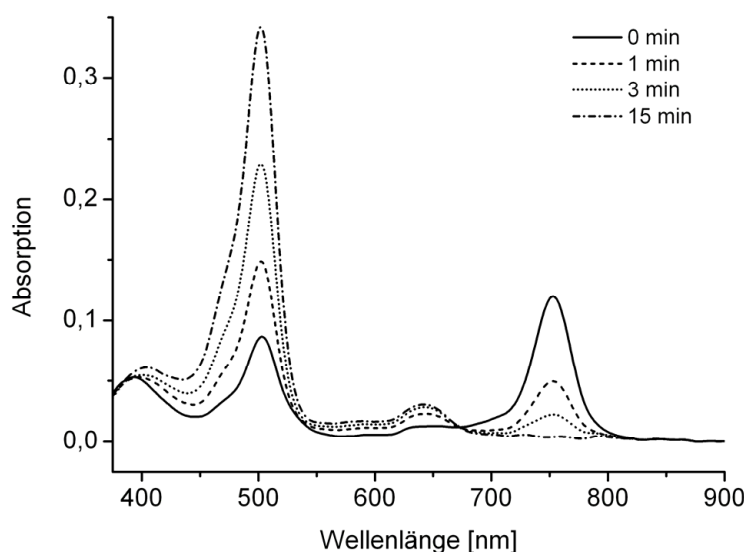


Abb. 3-81: Photoreaktion von WST11 und  $\text{H}_2\text{DCF}$  (50 mM) in  $\text{O}_2$ -gesättigtem Phosphat-Puffer. Dargestellt sind die Absorptionsspektren zu ausgewählten Zeitpunkten (0, 1, 3, 15 min) der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).  $A_{\text{Start}} = 0,12$ .

Das WST11 besaß in dieser Lösung bei Belichtung eine Halbwertszeit von ~25 Sekunden (Abb. 3-82). Bei Begasung mit Sauerstoff während der Belichtung verringerte sich die Halbwertszeit auf ~2 Sekunden, und die DCF-Bildung erhöhte sich um ~25% im Vergleich zur unbegasteten Probe. Bei Begasung mit Argon erhöhte sich die Halbwertszeit auf ~71 Sekunden, und die DCF-Bildung verringerte sich um ~48% im Vergleich zur unbegasteten Probe.

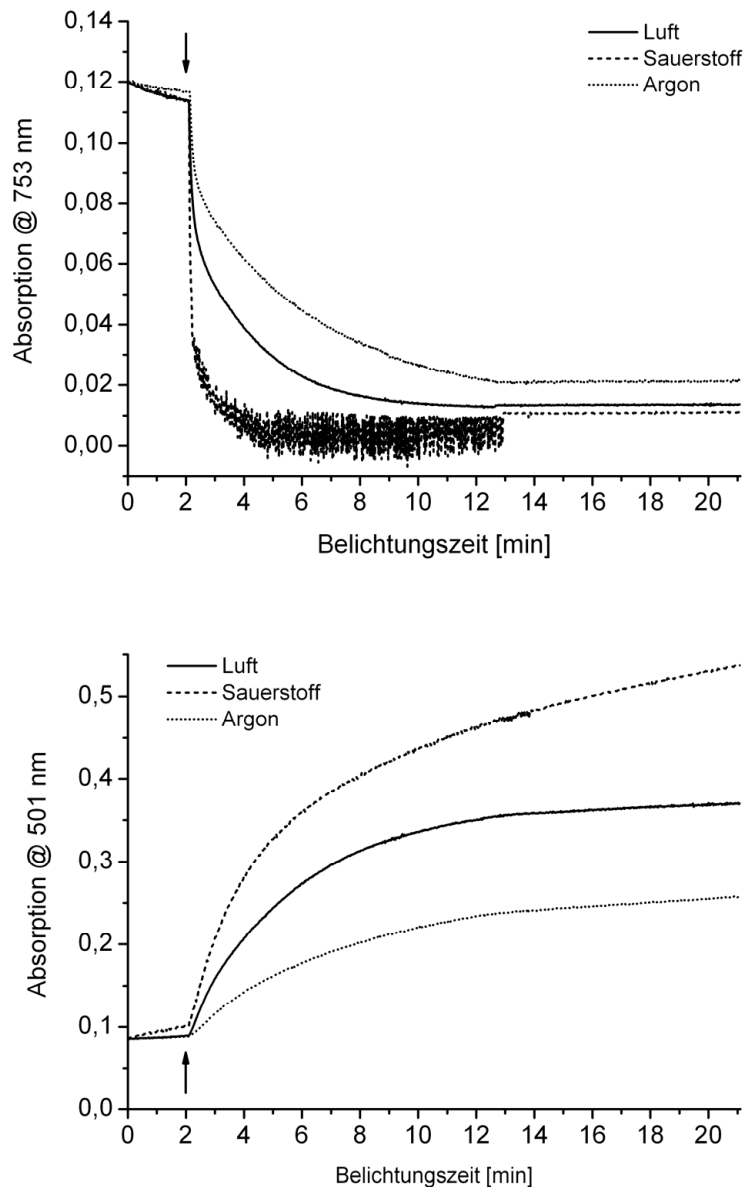


Abb. 3-82: Belichtungskinetiken von WST11 und H<sub>2</sub>DCF (50 mM) in Phosphat-Puffer. Dargestellt sind die Intensitäten des WST11-Q<sub>y</sub>- (oben) und des DCF-Absorptionsmaximums (unten) über die Zeit ( $A_{\text{Start}} = 0,12$ ) während Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Die Belichtung wurde nach 2 Minuten der Messung gestartet (Pfeile). Luft: Lösung stark geschüttelt, offene Küvette; Sauerstoff: die ersten 13 Minuten durchgehend mit reinem Sauerstoff begast; Argon: vor Belichtung mit Argon begast, gasdicht verschlossene Küvette.

Die angegebenen Werte der DCF-Bildung wurden um einen „Dunkelwert“ korrigiert, da H<sub>2</sub>DCF auch ohne Belichtung, d. h. ohne ROS langsam zu DCF oxidiert. Dies ist ersichtlich an der konstanten Zunahme der DCF-Absorption auch nach vollständiger Bleichung des WST11. Die Dunkelwerte lagen bei der unbegasteten, sowie bei der mit Argon begasteten Probe bei ~2 mOD/min, bei der mit Sauerstoff begasteten Probe bei ~7 mOD/min.

**3.9.4 Sauerstoffverbrauch bei Belichtung**

Die Clark-Elektrode (Clark *et al.*, 1953) ermöglicht die Messung der Sauerstoffkonzentration in Flüssigkeiten und Gasen durch Quantifizierung einer elektrochemischen Reaktion mittels eines Galvanometers (Abb. 3-83).

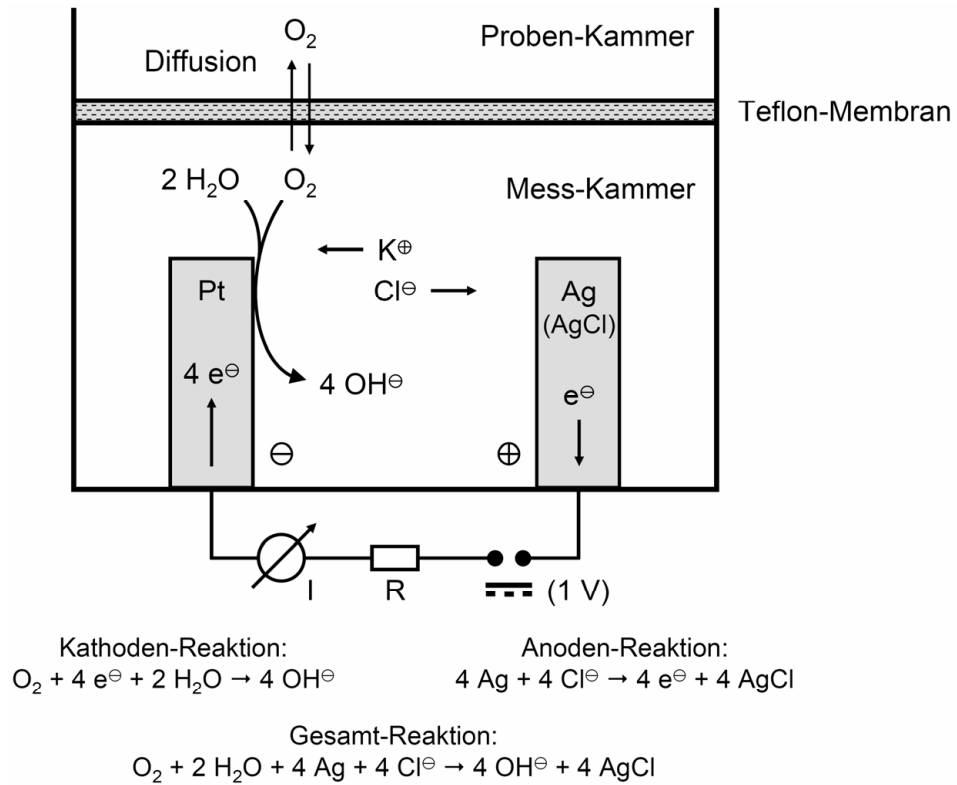


Abb. 3-83: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Clark-Elektrode, sowie zusammenfassende Reaktionsgleichungen ihrer Funktionsweise. Pt: Platin-Kathode; Ag (AgCl): Silber-Anode.

Die Probenkammer der verwendeten Clark-Elektrode stand über eine dünne Kanüle mit der Umgebung in Verbindung, so dass Sauerstoff aus der Luft in die Probenlösung gelangen konnte. Bei einer (berechneten) O<sub>2</sub>-Konzentration von ~0,134 mM stellte sich in der Clark-Elektrode ein Gleichgewicht zwischen O<sub>2</sub>-Verbrauch durch die Kathoden-Reaktion und O<sub>2</sub>-Nachdiffusion ein (Abb. 3-84).



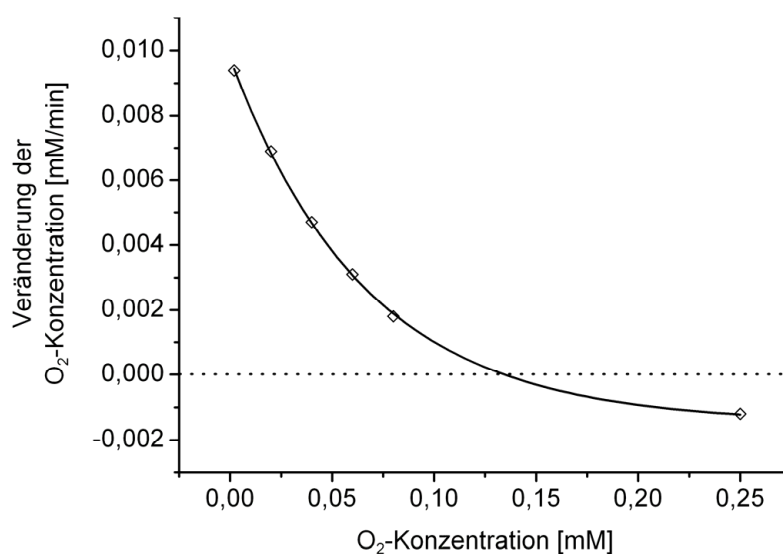


Abb. 3-84: Veränderung der O<sub>2</sub>-Konzentration durch die Kathodenreaktion und die O<sub>2</sub>-Nachdiffusion in Abhängigkeit von der zu Beginn der Messung vorhandenen O<sub>2</sub>-Konzentration.

Oberhalb dieser O<sub>2</sub>-Konzentration überwog zunehmend der O<sub>2</sub>-Verbrauch ( $-0,0012$  mM/min bei  $0,250$  mM O<sub>2</sub>), unterhalb dieser O<sub>2</sub>-Konzentration zunehmend die O<sub>2</sub>-Nachdiffusion ( $+0,0094$  mM/min bei  $0,002$  mM O<sub>2</sub>). Da sich die O<sub>2</sub>-Konzentration bei allen Messungen zwischen  $0,260$  und  $0,120$  mM bewegte, und die größte gemessene O<sub>2</sub>-Halbwertszeit nur  $\sim 10$  Minuten betrug, werden die Veränderungen der O<sub>2</sub>-Konzentration durch die Kathodenreaktion und die Nachdiffusion im Folgenden vernachlässigt.

Als beste Möglichkeit, die Geschwindigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in den getesteten Lösungen zu quantifizieren, erwies sich die Bestimmung der O<sub>2</sub>-Halbwertszeit. Die Zeit bis zur Sauerstofffreiheit der Lösung ( $\leq 0,002$  mM O<sub>2</sub>) konnte in vielen Fällen nicht bestimmt werden, da bereits vorher alles Pigment gebleicht, und damit dieser Endzustand nicht erreicht wurde.

Die O<sub>2</sub>-Halbwertszeit in Lipoprotein-Fractionen mit Pd-BPheid *a* war geringfügig niedriger als in den entsprechenden Fractionen mit Zn-BPheid *a* (in LDL:  $-21\%$ ; in HDL:  $-13\%$ ). Dies wurde durch die geringere Photostabilität des Zink-Derivats verursacht, da durch den etwas größeren Verlust an photodynamisch aktiven Pigmenten weniger Sauerstoff verbraucht wurde. (Abb. 3-85). In den LDL-Fractionen war die O<sub>2</sub>-Halbwertszeit unabhängig vom zugesetzten Pigment etwas höher als in den entsprechenden HDL-Fractionen (mit Pd-BPheid *a*:  $+33\%$ ; mit Zn-BPheid *a*:  $+47\%$ ). Wurden die Proben 1:1 (v/v) mit den entsprechenden Lipoprotein-Fractionen (LDL oder HDL) ohne zugesetztes Pigment verdünnt, so erhöhte sich die O<sub>2</sub>-Halbwertszeit in den Proben mit Pd-BPheid *a* um  $46\%$  (LDL) und  $49\%$  (HDL), in den Proben mit Zn-BPheid *a* um  $85\%$  (LDL) und  $82\%$  (HDL). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich ebenfalls auf die geringere Photostabilität des Zink-Derivats zurückzuführen.

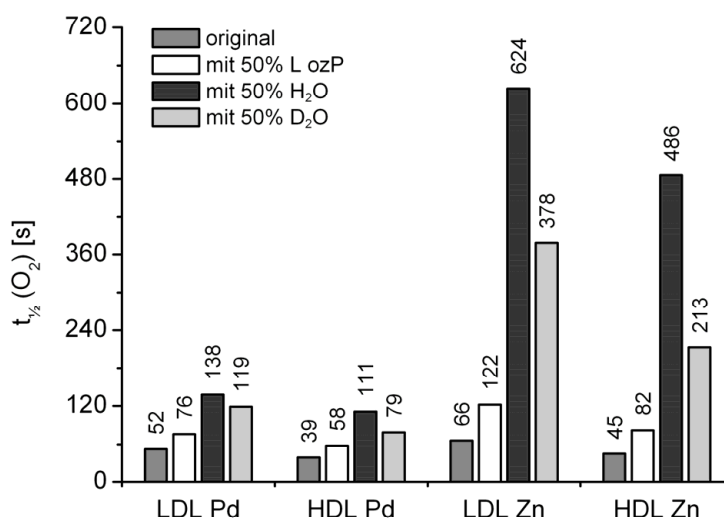


Abb. 3-85: O<sub>2</sub>-Halbwertszeiten in Pigment-beladenen Lipoprotein-Fractionen nach Verdünnung mit Lipoproteinen-Fractionen ozP, mit H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O bei Belichtung (NIR-Lichtintensität: ~530 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; Filter: RG630). A<sub>start</sub> = 0,5. L ozP: entsprechende Lipoprotein-Fraktion (LDL oder HDL) ohne zugesetztes Pigment; Pd, Zn: mit Pd- bzw. Zn-BPheid a inkubiert.

Im Vergleich zu den unverdünnten Proben kam es bei den mit Pd-BPheid a beladenen Lipoproteinen fast zu einer Verdreifachung der O<sub>2</sub>-Halbwertszeit, wenn die Verdünnung mit H<sub>2</sub>O erfolgte (LDL: +165%; HDL: +185%). In den entsprechenden Proben mit Zn-BPheid a kam es sogar in etwa zu einer Verzehnfachung der O<sub>2</sub>-Halbwertszeit (LDL: +845%; HDL: +980%).

Erfolgte die Verdünnung anstelle von H<sub>2</sub>O mit D<sub>2</sub>O, so fiel diese Erhöhung etwas geringer aus (LDL mit Pd-BPheid a: +129%; HDL mit Pd-BPheid a: +103%; LDL mit Zn-BPheid a: +473%; HDL mit Pd-BPheid a: +373%). Dies kommt durch die längere Lebenszeit von Singulett-Sauerstoff in deuterierten Lösungsmitteln zustande, durch die dem angeregten Sauerstoff mehr Zeit für Reaktionen zur Verfügung steht. Im direkten Vergleich der beiden Versuchsreihen mit H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O ist ein weiterer Trend erkennbar. Die O<sub>2</sub>-Halbwertszeit in den beiden LDL-Fractionen nahm weniger ab, als in den entsprechenden HDL-Fractionen (LDL mit Pd-BPheid a: -14%; HDL mit Pd-BPheid a: -29%; LDL mit Zn-BPheid a: -39%; HDL mit Zn-BPheid a: -56%). In den LDL-Fractionen macht sich die längere Lebenszeit des Singulett-Sauerstoffs möglicherweise deshalb weniger stark bemerkbar, da dort mehr geeignete Moleküle für Reaktionen mit ROS zur Verfügung stehen.

Die Intensität der Q<sub>y</sub>-Absorptionsbande des Pigments zu Beginn der Reaktion lag in allen Fällen bei ~0,5. Es wurden für Pd- und Zn-BPheid a Absorptionskoeffizienten in wässrigem Milieu (CES-Lösung) von ~55000 bzw. 45000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ermittelt. Damit betragen die Pigment-Konzentrationen in den Lösungen ~9 und ~11 μM für Pd- bzw. Zn-BPheid a.

Wenn man berücksichtigt, dass die  $O_2$ -Anfangskonzentration zwischen 240 und 260  $\mu\text{M}$  lag, und dass besonders im Falle des Pd-BPheid *a* nur wenige Prozent des Pigments gebleicht wurden, bedeutet dies, dass offenbar nur ein äußerst geringer Bruchteil der bei Belichtung aus dem Sauerstoff gebildeten ROS ein Molekül des vorhandenen Photosensibilisators bleicht. Es ist natürlich möglich, wenn auch relativ unwahrscheinlich, dass manche ROS nur die Peripherie der Pigmente verändern, und das Pigment damit weiterhin als Photosensibilisator erhalten bleibt. Als gesichert kann folglich angenommen werden, dass der Großteil der ROS mit anderen Molekülen als denen des Photosensibilisators reagiert, wie z. B. Lipiden oder Proteinen.

Dagegen kam es bei Zusatz von Natrium-Ascorbat (Endkonzentration: 10 mM) in allen Lipoprotein-Fractionen zu einer deutlichen Erniedrigung der  $O_2$ -Halbwertszeit (Abb. 3-86). Diese relativ großen Veränderungen (LDL mit Pd-BPheid *a*: -56%; HDL mit Pd-BPheid *a*: -44%; LDL mit Zn-BPheid *a*: -58%; HDL mit Zn-BPheid *a*: -40%) können nicht allein durch die höhere Photostabilität der Pigmente erklärt werden, vor allem nicht bei den Proben mit Pd-BPheid *a*. Wahrscheinlicher ist, dass eine sehr schnelle 1:1-Reaktion von Ascorbat mit  $O_2(^1\Delta_g)$  stattfindet (Kramarenko *et al.*, 2006). Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid kann durch seine im Vergleich zu  $O_2(^1\Delta_g)$  deutlich längere Lebenszeit auch weiter entfernte biologische Moleküle oxidieren (Kramarenko *et al.*, 2006). Auffallend ist, dass durch den Zusatz von Ascorbat fast identische  $O_2$ -Halbwertszeiten in den LDL- und HDL-Fractionen zustande kamen, unabhängig von der Art des zugesetzten Pigments.

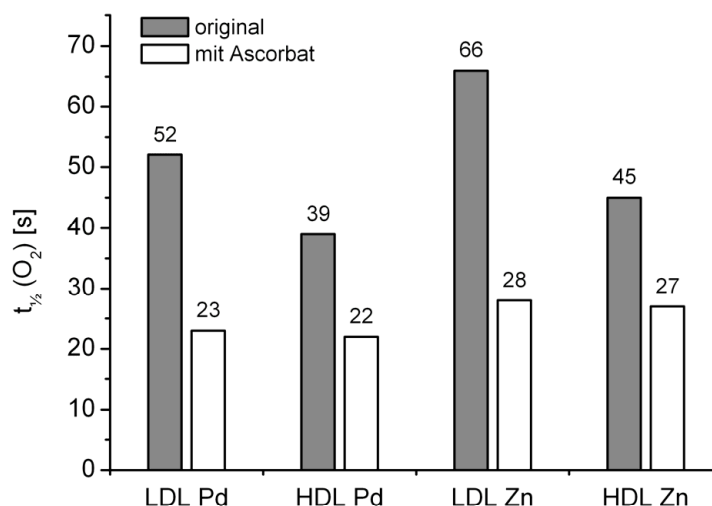


Abb. 3-86:  $O_2$ -Halbwertszeiten in Pigment-beladenen Lipoprotein-Fractionen nach Zusatz von gelöstem Natrium-Ascorbat (Endkonzentration: 10 mM) bei Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630).  $A_{\text{Start}} = 0,5$ . Pd, Zn: mit Pd- bzw. Zn-BPheid *a* inkubiert. Das Natrium-Ascorbat wurde den Ansätzen als 1M Lösung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  zugesetzt.

Möglicherweise beruhen die ursprünglich existenten Unterschiede der O<sub>2</sub>-Halbwertszeiten lediglich auf relativ geringen Konzentrationsunterschieden der vorhandenen Antioxidantien. Diese Unterschiede könnten durch die vergleichsweise hohe Ascorbat-Endkonzentration von 10 mM ausgeglichen worden sein, da die durchschnittlich vorhandene, d. h. natürliche Ascorbinsäure-Konzentration in Blutplasma lediglich ~50–60 µM beträgt (Canoy *et al.*, 2005). Unter Umständen können auch Konzentrationen von 30–150 µM auftreten (Abuja und Albertini, 2001). Bei den Experimenten mit Lösungen, die Pd-BPheid *a* und zugesetztes Ascorbat enthielten ( $t_{1/2}$  (O<sub>2</sub>) = 22–23 s; siehe Abb. 3-86), kam es zu einem maximalen O<sub>2</sub>-Verbrauch von 10 µM/s.

### 3.10 Photoinduzierte Peroxid-Bildung in Lipoproteinen

Entscheidend für die photodynamische Wirkung der Pigmente ist die Bildung von ROS bei Belichtung. Am Ende vieler durch ROS initiiertter Reaktionsketten stehen dabei Peroxide, bei denen es sich sowohl um *Hydroperoxide* (ROOH), wie auch um *Endoperoxide* (ROOR') handeln kann. Beide Arten können durch fluoreszenzspektroskopische Tests quantifiziert werden. Dies geschieht bei den Hydroperoxiden mittels eines auf Fluorescein basierenden Tests, bei den Endoperoxiden durch den TBARS-Test, welcher auf einem gemeinsamen Abbauprodukt der Endoperoxide ungesättigter Fettsäuren basiert.

Für die folgenden Experimente bezüglich der Peroxid-Entstehung wurden mit Pd-BPheid *a* oder Zn-BPheid *a* inkubierte LDL- und HDL-Fraktionen verwendet, die mit entsprechenden Lipoproteinen ozP auf eine Start-OD von 0,5 verdünnt wurden. Den insgesamt 30 Minuten belichteten Ansätzen wurden zu Beginn und am Ende der Belichtung, sowie nach 1, 3, und 10 Minuten Aliquots (jeweils 4 × 50 µl) für die Peroxid-Tests entnommen. Zwei Aliquots wurden für die Hydroperoxid-, die beiden anderen für die Endoperoxid-Tests verwendet. Alle folgenden Werte sind Mittelwerte aus beiden Messungen.

Nach jeder Probennahme wurde ein Absorptionsspektrum gemessen (Abb. 3-87). Die LDL- und HDL-Fraktionen zeigten ein nahezu identisches Verhalten bei Belichtung. Zn-BPheid *a* war bereits nach 3 Minuten zu über 97% gebleicht, jedoch dauerte es die vollen 30 Minuten, um auch das aus Zn-BPheid *a* entstandene Chlorin-Derivat 3Ac-Zn-Pheid *a* (Q<sub>y</sub> nach drei Minuten: ~0,13) größtenteils zu bleichen. Das im Vergleich zum entsprechenden Zink-Derivat deutlich stabilere Pd-BPheid *a* war dagegen auch nach 30 Minuten noch nicht vollständig gebleicht (Q<sub>y</sub> nach 30 Minuten: ~0,08). Das aus Pd-BPheid *a* entstandene Chlorin-Derivat 3Ac-Pd-Pheid *a* (Q<sub>y</sub> nach 30 Minuten: ~0,12) ist nahezu unempfindlich gegenüber dem eingestrahltten Licht, und zeigt damit ebenfalls eine um ein Vielfaches höhere Stabilität gegenüber Photobleichung als das entsprechende Zink-Derivat.

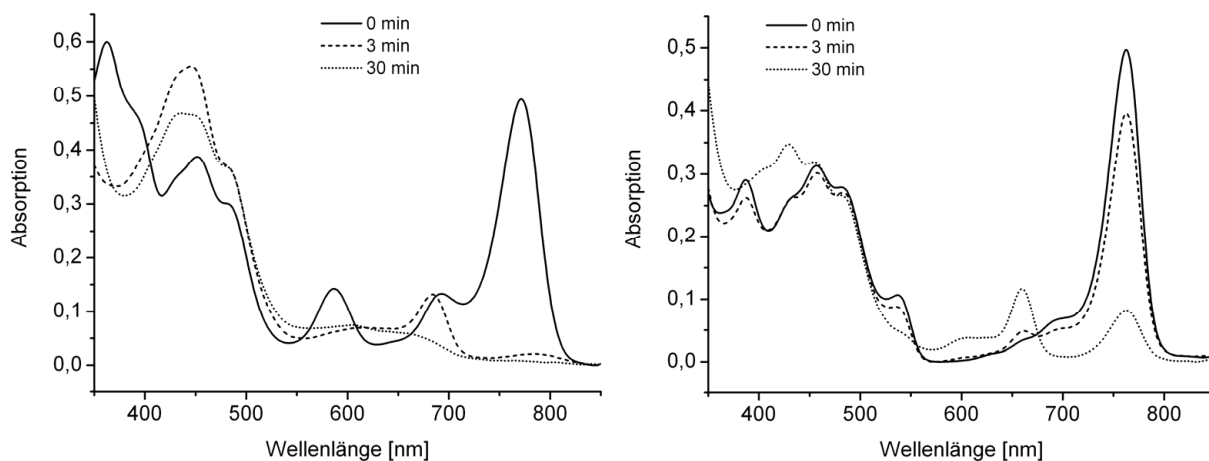


Abb. 3-87: Photooxidationen der Pigmente im Rahmen der Experimente zur Quantifizierung von Peroxiden. Dargestellt sind die Absorptionsspektren von HDL-Fractionen mit Zn-BPheid *a* (links) oder Pd-BPheid *a* (rechts) zu markanten Zeitpunkten der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).

### 3.10.1 Hydroperoxid-Analytik (DCF-Methode)

Die lichtinduzierten Hydroperoxide können über ihre Oxidationswirkung quantifiziert werden. Dazu wird die Fluoreszenzzunahme des Fluorescein-Derivats *2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)* gemessen, das durch Oxidation aus seiner nicht-fluoreszierenden Vorstufe *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF)* bzw. *2',7'-Dichlorofluorescein* entsteht. Diese Vorstufe wird erst unmittelbar vor ihrer Verwendung aus *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA)* bzw. *2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat* durch alkalische Verseifung hergestellt (Abb. 3-88).

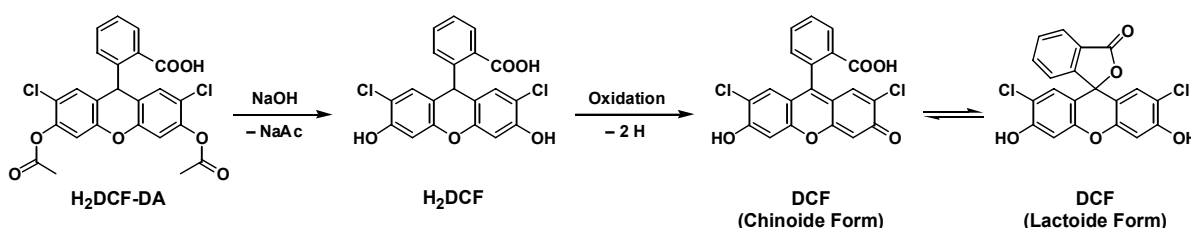


Abb. 3-88: Herstellung von H<sub>2</sub>DCF durch alkalische Verseifung von H<sub>2</sub>DCF-DA, und Oxidation des nicht-fluoreszierenden H<sub>2</sub>DCF zum Fluoreszenz-Farbstoff DCF.

Das unverseifte H<sub>2</sub>DCF-DA ist vor allem für Analysen *in vivo* bestens geeignet. H<sub>2</sub>DCF-DA wird die Eigenschaft zugeschrieben, Zellmembranen überwinden zu können, und im Anschluss durch intrazelluläre Esterasen in H<sub>2</sub>DCF umgewandelt zu werden.

Es wurde jedoch festgestellt, dass sich sowohl  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , wie auch  $\text{H}_2\text{DCF}$ , tief im Inneren der Zellmembran anreichern (Afri *et al.*, 2004). Die Oxidation durch ROS erfolgt daher möglicherweise innerhalb der Membran, das dabei entstehende DCF würde erst nachträglich in das Zellinnere abgegeben werden. Es existiert allerdings eine Kontroverse, welche ROS in der Lage sind,  $\text{H}_2\text{DCF}$  direkt zu DCF zu oxidieren. So wurde bis vor kurzem behauptet, dass Singulett-Sauerstoff nicht zu einer direkten Reaktion in der Lage ist (Bilski *et al.*, 2002), die dafür vorgebrachten Argumente konnten jedoch erst kürzlich größtenteils widerlegt werden (Daghastanli *et al.*, 2008). Das  $\text{H}_2\text{DCF/DCF}$ -Redoxsystem scheint damit als Sensor für den allgemeinen Redoxzustand in biologischen Systemen rehabilitiert.

Im Gegensatz zu der ebenfalls möglichen Reduktion von Fluorescein mittels Zinkstaubs zu Fluorescein (Liebig, 1912), die eher schwer zu handhaben ist, liegen bei dieser Methode in der gebrauchsfertigen Testlösung (nahezu) alle Moleküle in der reduzierten Form vor, da  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  selbst nicht oxidierbar ist (Brandt und Keston, 1965). Es findet jedoch in Lösung eine relativ schnelle Oxidation des  $\text{H}_2\text{DCF}$  zu DCF statt, die allein durch den gelösten Luft-sauerstoff initiiert wird. Deshalb wurde die Testlösung während der alkalischen Verseifung permanent mit Argon gespült, und nach ihrer Fertigstellung umgehend in kleinere Aliquots portioniert. Die nicht benötigten Aliquots wurden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren, und erst unmittelbar vor ihrer Verwendung wieder aufgetaut.

DCF besitzt ein Excitationsmaximum bei 512 nm und ein Emissionsmaximum bei 530 nm (Abb. 3-89). Aufgrund der großen Überlappung der beiden Spektren wurde DCF bei 502 nm angeregt, und die Fluoreszenz bei 540 nm gemessen.

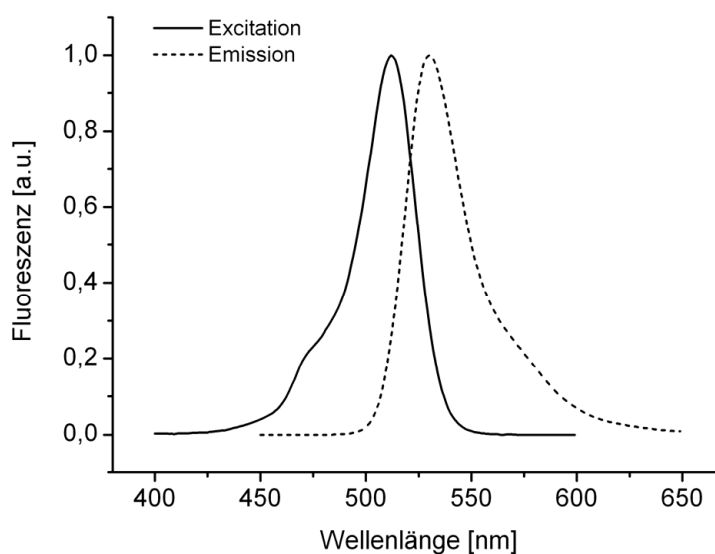


Abb. 3-89: Fluoreszenzspektren des Fluoreszenz-Farbstoffes DCF. Excitationsspektrum: Emission bei 530 nm; Emissionsspektrum: Excitation bei 512 nm. Die Maxima der Spektren wurden jeweils auf eine Fluoreszenz von 1,0 normiert.

Absorption und Fluoreszenz von Fluorescein sind jedoch stark vom pH-Wert der Lösung abhängig (Sjöback *et al.*, 1995). In Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 liegen ~85% der Moleküle als Dianion, ~15% als Monoanion vor (Klonis und Sawyer, 2000; Sjöback *et al.*, 1995). Neutrale Moleküle und Monokationen sind bei pH-Werten >7 nicht mehr vorhanden.

Um den Test zu optimieren, wurde zunächst die Auswirkung der Inkubationszeit auf die DCF-Entwicklung untersucht (Abb. 3-90, links). Die Fluoreszenz näherte sich keinem Endwert an, da beständig weiter DCF durch eine O<sub>2</sub>-vermittelte Oxidation entsteht. Da die Fluoreszenzzunahme pro Minute zwischen der 45. und 90. Minute nahezu konstant war, kann davon ausgegangen werden, dass die eigentliche Reaktion kurz nach der 45. Minute abgeschlossen ist. Es wurde daher eine Inkubationszeit von 50 Minuten für den DCF-Test festgesetzt.

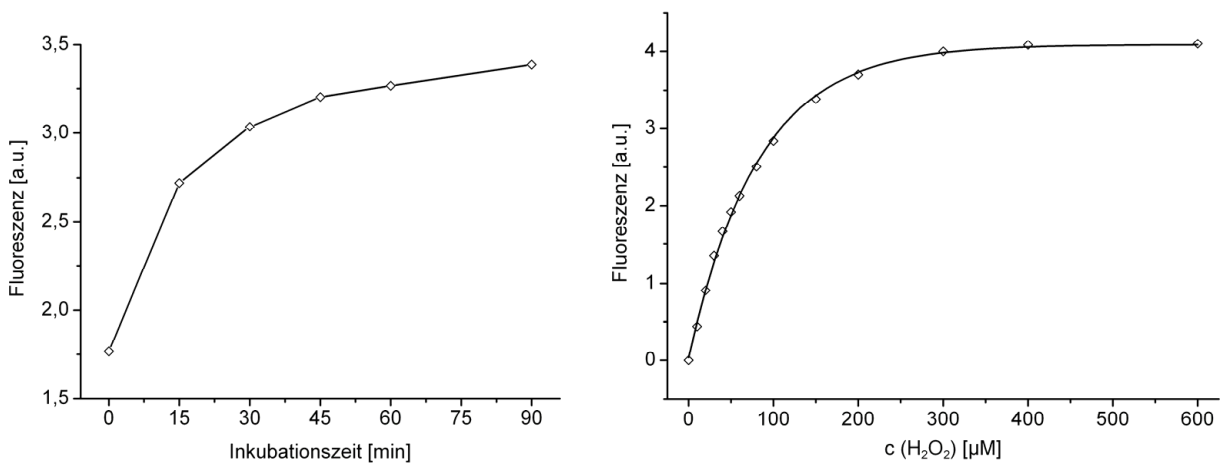


Abb. 3-90: DCF-Fluoreszenz eines Testansatzes (mit 50 µl 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (links), und die auf den Nullwert (Testansatz ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) korrigierte Eichkurve der DCF-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der zugesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (rechts).

Die Eichkurve der DCF-Fluoreszenz wurde mittels einer wässrigen Lösung von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) erstellt (Abb. 3-90, rechts). Es ergibt sich keine lineare Abhängigkeit, da eine starke Fluoreszenzlöschung auftritt. Die Kurve kann durch eine asymptotische Gleichung des Typs  $y = a - b \cdot c^x$  beschrieben werden:  $y = 4,09112 - 4,05656 \cdot 0,98797^x$ .

Daraus ergibt sich folgende Umrechnung:

$$c(\text{H}_2\text{O}_2 \text{ bzw. LOOH}) [\mu\text{M}] = \log_{0,98797} (4,09112 - \text{Fluoreszenz}) / 4,05656.$$

Die Kinetiken der lichtinduzierten ROOH-Bildung zeigen bei den pigmentbeladenen LDL, vor allem jedoch bei den pigmentbeladenen HDL mit zunehmender Belichtungsdauer einen Rückgang an pro Minute gebildeten Hydroperoxiden (Abb. 3-91).

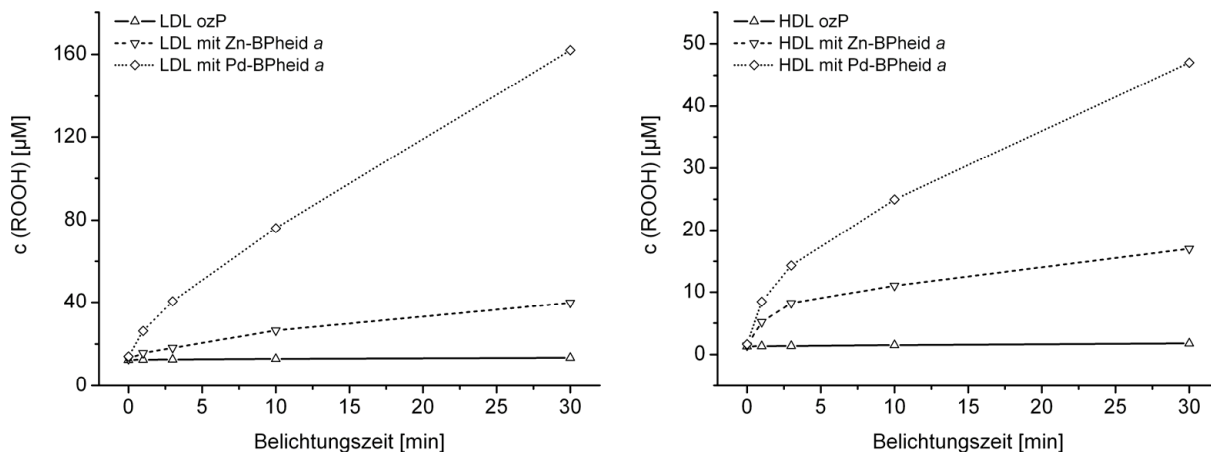


Abb. 3-91: Kinetiken der lichtinduzierten ROOH-Entstehung in Lipoproteinfraktionen. Es wurden LDL- (links) und HDL-Fraktionen (rechts) ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie mit Zn-BPheid a oder Pd-BPheid a inkubierte Fraktionen wie in Abb. 3-87 dargestellt belichtet.  $A_{\text{Start}}$ : 0,5.

Dieser ist wohl vor allem darauf zurückzuführen, dass die Pigment-Konzentration im Laufe der Belichtung abnimmt. Des Weiteren könnte sich auch die Anzahl der zur ROOH-Bildung befähigten Moleküle in der näheren Umgebung der Pigmente verringert haben. Da auch in den Lipoproteinfraktionen mit Zn-BPheid a bis zum Ende der Belichtungszeit eine Zunahme der ROOH-Konzentration erfolgt, muss für diese Konzentrationssteigerung das in den ersten Minuten gebildete 3Ac-Zn-Pheid a verantwortlich sein (siehe Abb. 3-87). Es ist des Weiteren anzunehmen, dass in gleicher Weise in den Lipoproteinfraktionen mit Pd-BPheid a mit zunehmender Belichtungszeit das gebildete 3Ac-Pd-Pheid a einen immer größeren Anteil an der ROOH-Bildung erlangt.

In der graphischen Zusammenstellung aller gemessenen ROOH-Endkonzentrationen (Abb. 3-92), d. h. nach 30 Minuten Belichtung, ist erkennbar, dass bereits die unbelichteten LDL etwa 9-mal mehr ROOH als die unbelichteten HDL enthielten ( $\sim 13,0:1,5 \mu\text{M ROOH}$ ). Bei Belichtung nahm die ROOH-Konzentration in den Lipoproteinfraktionen ozP innerhalb der 30 Minuten nur geringfügig zu (LDL:  $\sim 1 \mu\text{M ROOH}$ ; HDL:  $\sim 0,5 \mu\text{M ROOH}$ ). Diese Zunahme wird möglicherweise durch natürliche Farbstoffe hervorgerufen.

Dagegen entstanden in allen pigmentbeladenen Lipoproteinfraktionen bei Belichtung große Mengen an ROOH. Die ROOH-Konzentrationssteigerung nach 30 Minuten betrug in den LDL mit Zn-BPheid a  $\sim 27,0 \mu\text{M ROOH}$ , in den LDL mit Pd-BPheid a  $\sim 148,0 \mu\text{M ROOH}$ , in den HDL mit Zn-BPheid a  $\sim 15,6 \mu\text{M ROOH}$ , und in den HDL mit Pd-BPheid a  $\sim 45,3 \mu\text{M ROOH}$ . Die deutlich höheren Werte in den LDL-Fraktionen sind wahrscheinlich durch deren viel größere Gesamtmenge an leicht oxidierbaren Molekülen (v. a. ungesättigte Kohlenwasserstoffketten und Cholesterin) zu begründen, die durch die photodynamische Wirkung der Pigmente in Hydroperoxide verwandelt werden können.



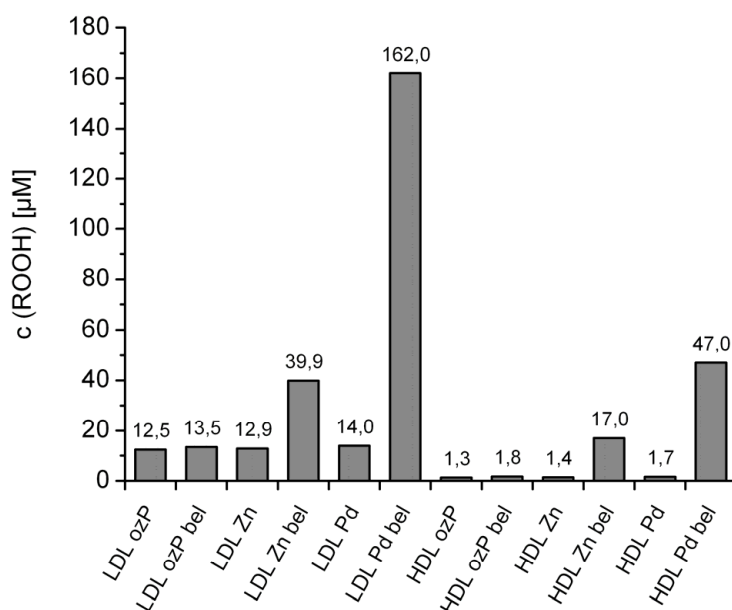


Abb. 3-92: Lichtinduzierte ROOH-Entstehung in Lipoproteinfraktionen. Dargestellt sind die ROOH-Konzentrationen in unbelichteten und 30 Minuten belichteten (bel) LDL- und HDL-Fraktionen ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie mit Zn-BPheid a (Zn) oder Pd-BPheid a (Pd).  $A_{\text{Start}}$ : 0,5.

Das Pd-BPheid a in den LDL etwa 5,5× mehr ROOH erzeugt als Zn-BPheid a, in den HDL dagegen nur etwa 2,9× mehr, unterstützt diese Vermutung, da in beiden Fällen etwa gleich viel Pigment begleicht wurde. Als alternative Erklärung kommt lediglich ein besserer Schutz der oxidierbaren Moleküle durch in den HDL vorhandene Antioxidantien in Frage. Da jedoch jedes der beiden verwendeten Pigmente in LDL und HDL in etwa die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Autoxidation zeigt, ist diese Erklärung eher unwahrscheinlich. Des Weiteren ist die Konzentration der Antioxidantien im Blutplasma zu gering, um einen derart großen Unterschied erklären zu können.

Die Konzentration an Lipid-Hydroperoxiden in Blutplasma liegt zumeist bei ~3–8 µM, wobei die genauen Werte selbst bei vergleichbaren Studien deutlich voneinander abweichen (Arab und Steghens, 2004; Södergren *et al.*, 1998; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996). LDL enthält fast  $\frac{2}{3}$  der Lipid-Hydroperoxide des Blutplasmas (VLDL: 16%; LDL: 65%; HDL: 11%; VHDL/HDP: 8%) (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996). Unter Annahme dieser Verteilung würde im vorliegenden Fall eine ROOH-Blutplasmakonzentration von ~6,1 µM vorgelegen haben.

Die exakten Werte sind jedoch sehr von der chemischen Struktur der in den Lipoproteinen enthaltenen Lipide abhängig, da Fettsäuren mit *bis*-allylischen H-Atomen eine Peroxidation sehr stark erleichtern, d. h. ein hoher Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu einer deutlich schnelleren Bildung von Lipid-Peroxiden führt (Wagner *et al.*, 1994).

### 3.10.2 Endoperoxid-Analytik (TBARS-Methode)

Die lichtinduzierten Endoperoxide können indirekt über ein Folgeprodukt quantifiziert werden. Es handelt sich hierbei um das sekundäre Lipidoxidationsprodukt *Malondialdehyd (MDA)*, welches bei hohen Temperaturen aus den Endoperoxiden mehrfach ungesättigter Lipide entsteht. Das MDA seinerseits kann durch eine spezifische Reaktion mit *2-Thiobarbitursäure (TBA)* quantifiziert werden, bei der ein fluoreszierender Farbstoff entsteht (Abb. 3-93). Dieser Farbstoff entsteht durch Kondensation aus einem Molekül MDA und zwei Molekülen TBA unter Eliminierung zweier Moleküle Wasser (Sinnhuber *et al.*, 1958), und wird daher auch als  $TBA_2$ -MDA bezeichnet. Der Farbstoff existiert in zwei tautomeren Formen (Nair und Turner, 1984; Guzmán-Chozas *et al.*, 1998). Alle chemischen Verbindungen, die in diesem Test einen positiven Befund liefern, werden zu *TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)* zusammengefasst. Die TBARS-Testlösung ist mehrere Tage bei Raumtemperatur stabil, dann setzt eine langsame gelbliche Verfärbung ein, und es beginnt eine schwerlösliche Verbindung auszufallen.

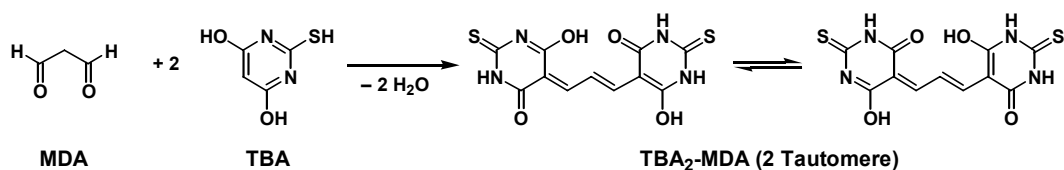


Abb. 3-93: Bildung des TBARS-Farbstoffs ( $TBA_2$ -MDA) aus einem Molekül Malondialdehyd (MDA) und zwei Molekülen 2-Thiobarbitursäure (TBA) durch Kondensation. Der Farbstoff  $TBA_2$ -MDA liegt in zwei tautomeren Formen vor.

Der hitzeinduzierten Bildung von Malondialdehyd aus den Fettsäure-Oxidationsprodukten liegt teilweise ein komplizierter chemischer Mechanismus zugrunde. Bei allen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z. B. der Linolensäure oder der Arachidonsäure, kann es im Rahmen des TBARS-Tests zu einem Intermediat kommen, das große Ähnlichkeit mit dem Prostaglandin  $H_2$  aufweist (Pryor und Stanley, 1975; Pryor *et al.*, 1976).

Auch die Malondialdehyd-Konzentration wird oft zur Quantifizierung von oxidativem Stress verwendet, da der TBARS-Test zwar relativ unspezifisch, aber dafür relativ einfach und schnell durchzuführen ist, sowie eine hohe Empfindlichkeit aufweist (Yagi, 1976).

Der TBARS-Farbstoff besitzt ein Excitationsmaximum bei 534 nm und ein Emissionsmaximum bei 555 nm (Abb. 3-94). Aufgrund der großen Überlappung der beiden Spektren wurde der Farbstoff bei 524 nm angeregt, und die Fluoreszenz bei 565 nm gemessen.

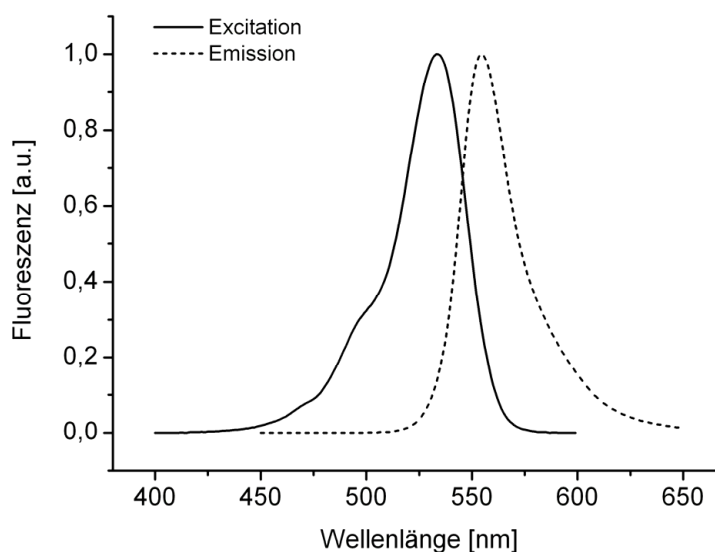


Abb. 3-94: Fluoreszenzspektrern des TBARS-Farbstoffes TBA<sub>2</sub>-MDA. Excitationsspektrum: Emission bei 555 nm; Emissionsspektrum: Excitation bei 534 nm. Die Maxima der Spektren wurden auf eine Fluoreszenz von 1,0 normiert.

Um den Test zu optimieren, wurde zunächst die Auswirkung der Inkubationszeit auf die TBARS-Farbstoff-Entwicklung untersucht (Abb. 3-95, links). Die Fluoreszenz stieg die ersten 15 Minuten an, um danach wieder leicht abzunehmen, da der Farbstoff offenbar nicht völlig hitzestabil ist. Es wurde daher eine Inkubationszeit von 15 Minuten für den TBARS-Test festgesetzt.

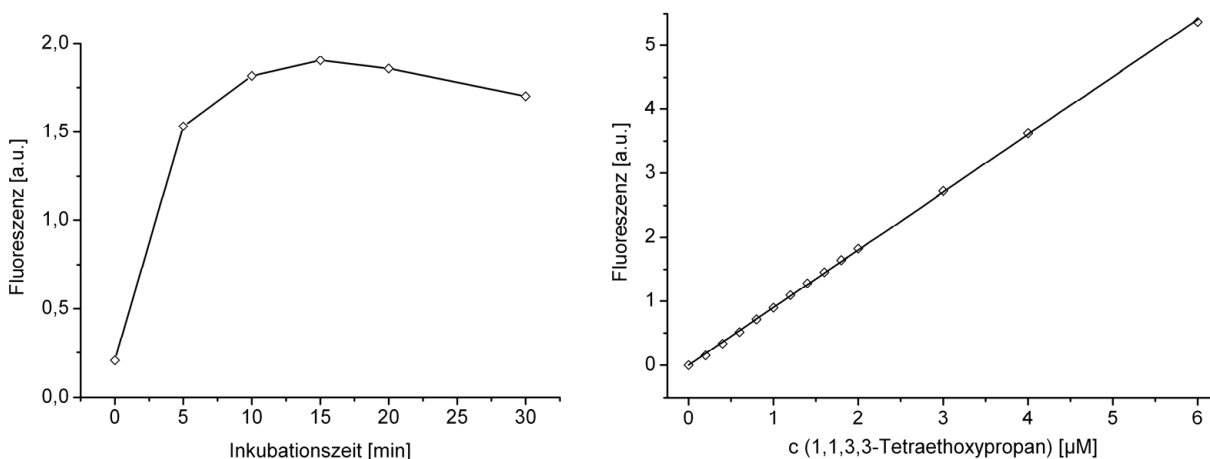


Abb. 3-95: TBARS-Farbstoff-Fluoreszenz eines Testansatzes (mit 50 µl 2 µM TEP) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (links), und die auf den Nullwert (Testansatz ohne TEP) korrigierte Eichgerade der TBARS-Farbstoff-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der zugesetzten TEP-Konzentration (rechts).

Die Eichkurve der TBARS-Farbstoff-Fluoreszenz wurde mittels einer ethanolischen Lösung von 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP) erstellt (Abb. 3-95 rechts), einem Diacetal des MDA, aus dem unter den Reaktionsbedingungen durch saure Hydrolyse Malondialdehyd entsteht (Sinnhuber *et al.*, 1958). Die Kurve kann durch eine lineare Gleichung des Typs  $y = a + b \cdot x$  beschrieben werden:  $y = -0,00124 + 0,90189 \cdot x$ .

Daraus ergibt sich folgende Umrechnung:

$$c(\text{TEP bzw. TBARS bzw. Endoperoxide}) [\mu\text{M}] = (\text{Fluoreszenz} - 0,00124) / 0,90189.$$

Die Kinetiken der lichtinduzierten TBARS-Bildung zeigten ähnlich den Kinetiken der lichtinduzierten ROOH-Bildung (vgl. Abb. 3-91) sowohl bei den pigmentbeladenen LDL, wie auch bei den pigmentbeladenen HDL mit zunehmender Belichtungsdauer einen Rückgang an pro Minute gebildeten TBARS (Abb. 3-96).

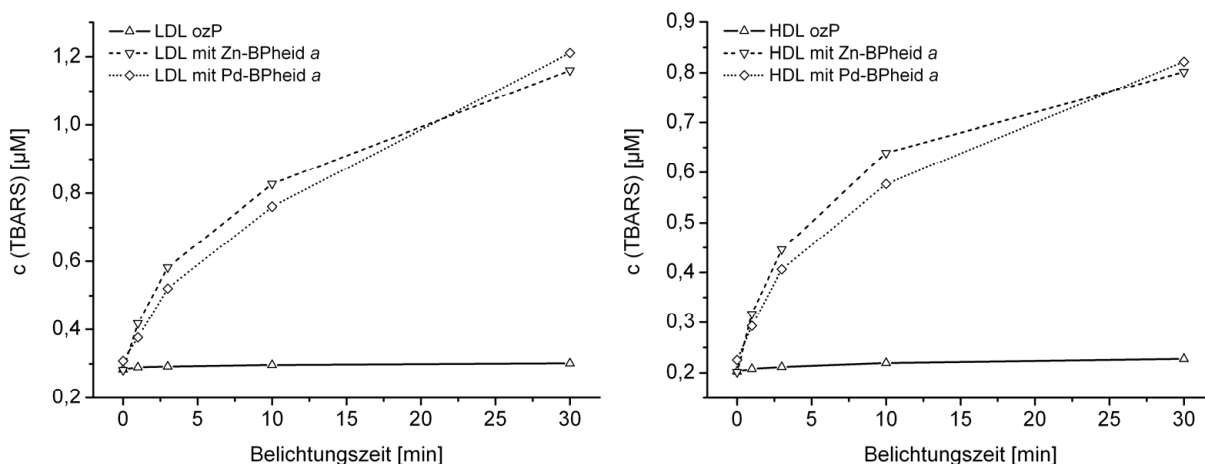


Abb. 3-96: Kinetiken der lichtinduzierten TBARS-Entstehung in Lipoproteinfraktionen. Es wurden LDL- (links) und HDL-Fraktionen (rechts) ohne zugesetztes Pigment (ozP), sowie mit Zn-BPheid a oder Pd-BPheid a inkubierte Fraktionen wie in Abb. 3-87 dargestellt belichtet.  $A_{\text{Start}}: 0,5$ .

Dieser ist wohl ebenfalls vor allem darauf zurückzuführen, dass die Pigment-Konzentration im Laufe der Belichtung abnimmt, und sich in der näheren Umgebung der Pigmente die Anzahl der zur TBARS-Bildung befähigten Moleküle verringert.

Im Gegensatz zur Hydroperoxid-Bildung war hier kein großer Unterschied zwischen den Proben mit Zn-BPheid a und Pd-BPheid a festzustellen. Nachdem zu Beginn sogar etwas mehr TBARS in den Proben mit Zn-BPheid a gebildet worden waren, lagen die TBARS-Konzentrationen in diesen Proben am Ende der Belichtung lediglich knapp unterhalb den TBARS-Konzentrationen in den entsprechenden Proben mit Pd-BPheid a.

In der graphischen Zusammenstellung aller gemessenen TBARS-Endkonzentrationen (Abb. 3-97), d. h. nach 30 Minuten Belichtung, ist zum einen erkennbar, dass die unbelichteten LDL etwa 1,4× mehr TBARS als die unbelichteten HDL enthielten ( $\sim 0,28:0,20 \mu\text{M}$  TBARS). Bei Belichtung nahm die TBARS-Konzentration in den Lipoproteinfraktionen ozP innerhalb der 30 Minuten nur geringfügig zu (LDL:  $\sim 0,02 \mu\text{M}$  TBARS; HDL:  $\sim 0,03 \mu\text{M}$  TBARS). Diese Zunahme wird möglicherweise durch natürliche Farbstoffe hervorgerufen.

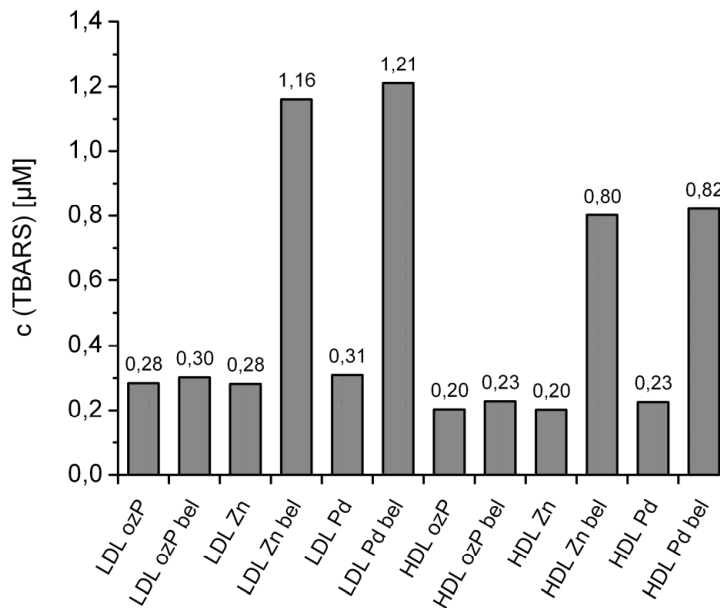


Abb. 3-97: Lichtinduzierte TBARS-Entstehung in Lipoproteinfraktionen. Dargestellt sind die TBARS-Konzentrationen in unbelichteten und 30 Minuten belichteten (bel) LDL- bzw. HDL-Fraktionen ohne externes Pigment (ozP), mit Zn-BPheid *a* (Zn) oder Pd-BPheid *a* (Pd).  $A_{\text{Start}}$ : 0,5.

Dagegen entstanden in allen pigmentbeladenen Lipoproteinfraktionen bei Belichtung große Mengen an TBARS. Die TBARS-Konzentrationssteigerung nach 30 Minuten betrug in den LDL mit Zn-BPheid *a*  $\sim 0,88 \mu\text{M}$  TBARS, in den LDL mit Pd-BPheid *a*  $\sim 0,9 \mu\text{M}$  TBARS, in den HDL mit Zn-BPheid *a*  $\sim 0,6 \mu\text{M}$  TBARS, und in den HDL mit Pd-BPheid *a*  $\sim 0,59 \mu\text{M}$  TBARS.

Die etwas höheren Werte in den LDL-Fraktionen sind wahrscheinlich in Analogie zu den Ergebnissen der Hydroperoxid-Bestimmungen durch deren viel größere Gesamtmenge an leicht oxidierbaren Molekülen zu begründen, die durch die photodynamische Wirkung der Pigmente in Endoperoxide (bzw. TBARS) verwandelt werden können. Da Pd-BPheid *a* in beiden Lipoproteinfraktionen nicht signifikant mehr TBARS erzeugt als Zn-BPheid *a*, muss angenommen werden, dass die Anzahl dieser geeigneten Moleküle so gering ist, dass diese auch im Falle des schnell ausbleichenden Zn-BPheid *a* vollständig zu TBARS umgewandelt werden.

In der Literatur sind nur sehr unterschiedlichste Angaben zur TBARS-Konzentration in Blutplasma zu finden. Es wurden Werte von  $\sim 0\text{--}40\ \mu\text{M}$  in verschiedenen Studien ermittelt, jedoch mit einer Häufung im Bereich von  $\sim 0\text{--}4\ \mu\text{M}$  (Seljeskog *et al.*, 2006; Lykkesfeldt, 2007). Unter der Annahme, dass in den VLDL- und VHDL/HDP-Fractionen nur relativ wenig TBARS enthalten sind, würde im vorliegenden Fall eine TBARS-Blutplasmakonzentration von  $\sim 0,2\ \mu\text{M}$  vorgelegen haben.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass kein EDTA-Blutplasma verwendet wird, da dies die TBARS-Bildung im Vergleich zu Citrat-Blutplasma um  $\sim 75\%$  reduzieren kann (Suttnar *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde stets CPO-Blutplasma aus Vollblut verwendet, das nach Zusatz einer Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung gewonnen wird.

## 3.11 Reaktionsmechanismus in Lipoproteinen

### 3.11.1 Effekte von ROS-Quenchern

Um aufzuklären, ob Pd-BPheid *a* (WST09) in Lipoproteinen ROS-Reaktionen des Typs I oder des Typs II initiiert (siehe Abb. 1-4), wurden Teilmengen von Lipoprotein-Fractionen spezifische *Quencher* bzw. *Scavenger* zugesetzt, und ihr Einfluss auf die Photostabilität des Pigments bestimmt.

Als Quencher für Reaktionen des Typs I wurde D-Mannitol verwendet, das mit Radikalen zu D-Fructose oxidiert wird. Als Quencher für Reaktionen des Typs II diente L-Histidin, dessen konjugierte Dien-Gruppierung mit Singulett-Sauerstoff konzertierte  $(4\pi+2\pi)$ -Cycloadditionen des Diels-Alder-Typs eingeht. Als dritte Substanz wurde Natriumascorbat eingesetzt, das Reaktionen beider Typen quenchen kann.

Während die Photostabilität von Pd-BPheid *a* in LDL bei Zusatz von D-Mannitol nahezu konstant blieb, erhöhte sich sie sich bei Zusatz von Na-Ascorbat oder L-Histidin erheblich (Abb. 3-98).

Sehr ähnliche Ergebnisse wurden bei Belichtung anderer Lipoprotein-Fractionen erzielt. Als Beispiel ist hier ein Experiment mit Zn-BPheid *a* in HDL gezeigt, da dessen absolute Werte bezüglich der Photostabilität (bei einer deutlich kürzeren Belichtungszeit und geringeren Lichtstärke) fast identisch waren mit den verwendeten Werten von Pd-BPheid *a* in LDL. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verwendeten Pigmente weitgehend über eine ROS-Reaktion des Typs II gebleicht werden.

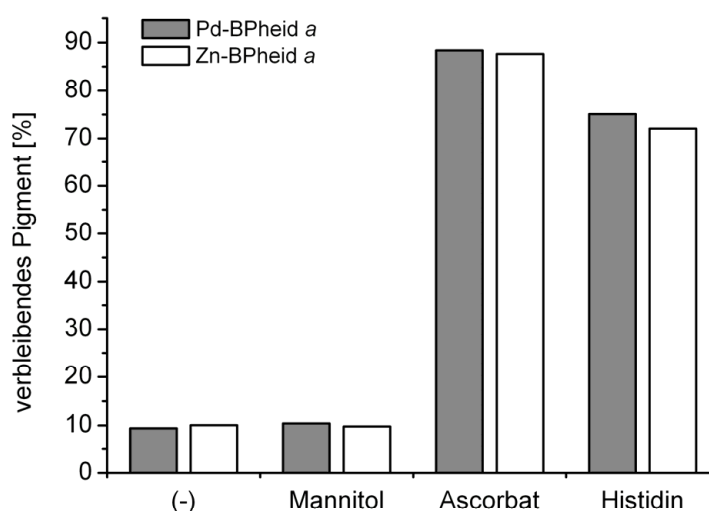


Abb. 3-98: Photostabilität von Pd-BPheid *a* in LDL und Zn-BPheid *a* in HDL nach Zugabe von ROS-Quenchern. Angegeben ist der prozentuale Anteil an ungebleichtem Pigment nach Belichtung, der über den Absorptionsrückgang bestimmt wurde. Die Belichtungszeit betrug im Falle des Pd-BPheid *a* 60 Minuten (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630), im Falle des Zn-BPheid *a* dagegen nur 10 Minuten (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630). Aliquots der Fraktionen wurden 1:1 (v/v) mit einer der folgenden Lösungen verdünnt:  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  (-); 200 mM D-Mannitol; 200 mM Natriumascorbat; 200 mM L-Histidin. Alle Substanzen wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gelöst.

Die Photostabilität der Pigmente bei Zusatz von Quenchern war in LDL und HDL stets gleich. Die relativen Verhältnisse der Photostabilität waren stets unabhängig vom verwendeten Pigment. In den absoluten Werten ergaben sich natürlich große Unterschiede, die durch die allgemeine Photostabilität des verwendeten Pigments, d. h. die Photostabilität des Pigments in Lösung ohne Zusatz jeglicher Quencher, hervorgerufen wurden. Da die Ergebnisse wie bereits erwähnt stets unabhängig vom zugesetzten Pigment waren, wurden alle folgenden Experimente mit Zn-BPheid *a* durchgeführt, da dadurch die Belichtungszeit im Vergleich zu Pd-BPheid *a* von 60 auf 10 Minuten verkürzt werden konnte.

Die Photostabilität von Zn-BPheid *a* in HDL konnte auch durch Zusatz von anderen bekannten Quenchern für Reaktionen des Typs I (Saccharose, Glycerin, DMSO) nicht erhöht werden (Abb. 3-99). Durch Zusatz von Natriumascorbat konnte dagegen die Bleichung des Pigments fast vollständig verhindert werden. Durch Zusatz von  $\text{D}_2\text{O}$ , in dem die Lebenszeit von Singulett-Sauerstoff etwa 10-mal länger ist als in  $\text{H}_2\text{O}$  (siehe Abb. 1-2), sollte es ggf. (bei Reaktionen des Typs II) zu einer Erniedrigung der Photostabilität kommen. Es ist allerdings im Gegenteil sogar eine geringfügige, aber signifikante Erhöhung feststellbar, die jedoch völlig im Einklang mit den Ergebnissen der Belichtungsexperimente von gegen  $\text{D}_2\text{O}$  dialysierten Lipoprotein-Fractionen steht (siehe Kap. 3.9.2).

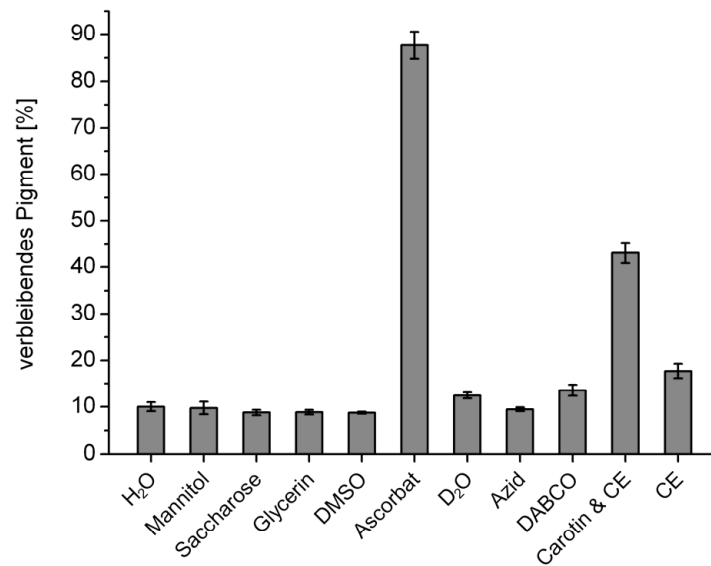


Abb. 3-99: Photostabilität von Zn-BPheid *a* in HDL nach Zugabe von ROS-Quenchern. Angegeben ist der prozentuale Anteil an ungebleichtem Pigment nach 10-minütiger Belichtung, der über den Absorptionsrückgang bestimmt wurde (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630). Aliquots einer HDL-Fraktion mit Zn-BPheid *a* wurden 1:1 (v/v) mit einer der folgenden Lösungen verdünnt: H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>; 200 mM Mannitol; 200 mM Saccharose; 200 mM Glycerin; 200 mM DMSO; 200 mM Natriumascorbat; D<sub>2</sub>O (100%); 200 mM Natriumazid; 200 mM DABCO; 20 mM  $\beta$ -Carotin (in 100% CE); CE (100%). CE: Cremophor<sup>®</sup> EL / Ethanol 1:1 (v/v). Falls nicht anders angegeben, wurde die Substanz in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst. n = 2.

Durch Zusatz von anderen bekannten Quenchern für Reaktionen des Typs II (Natriumazid, DABCO,  $\beta$ -Carotin) konnte nur teilweise die Photostabilität des Pigments gesteigert werden. So zeigte Natriumazid keinen Effekt; DABCO bewirkte nur eine geringfügige Erhöhung der Photostabilität. Durch Zusatz von  $\beta$ -Carotin konnten dagegen  $\sim 37\%$  der Bleichung verhindert werden, jedoch reduzierte die Cremophor<sup>®</sup> EL-Lösung, in der das  $\beta$ -Carotin zugesetzt wurde, allein bereits die Bleichung um  $\sim 8,5\%$ . Die Schutzwirkung von  $\beta$ -Carotin ist insofern beachtlich, da es im Gegensatz zu allen übrigen Feststoffen auf Grund der geringen Löslichkeit nur in einer Konzentration von 20 mM zugesetzt werden konnte. Die natürliche Carotinoid-Konzentration in Blutplasma beträgt allerdings nur  $\sim 2 \mu\text{M}$  (Romanchik *et al.*, 1995).

Weitere bereits bekannte Quencher für Reaktionen des Typs II sind einige der natürlich vorkommenden Aminosäuren. Die gegenüber Photosensibilisator-induzierter Photooxidation sensitiven Aminosäuren sind Cystein, Methionin, Tyrosin, Histidin, und Tryptophan (Spikes und MacKnight, 1970; Schothorst *et al.*, 1972). Die Reaktivität der Aminosäuren wird durch Peptidbindungen dieser Aminosäuren oder andere Aminosäuren in Lösung nicht wesentlich verändert (Michaeli und Feitelson, 1994). Die Reaktionsmechanismen von O<sub>2</sub>(<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) mit diesen Aminosäuren sind mittlerweile größtenteils bekannt (Davies, 2004).



Es wurden im folgenden Experiment alle 20 proteinogenen Aminosäuren auf ihre Fähigkeit getestet, die photoinduzierte Bleichung von Zn-BPheid *a* in HDL herabsetzen zu können. Es zeigte sich, dass außer Histidin (vgl. Abb. 3-99) noch Cystein, Methionin, Tryptophan, und Tyrosin dazu in der Lage sind (Abb. 3-100), was sich völlig mit den Ergebnisse der oben erwähnten Veröffentlichungen deckt. Das Ausmaß des Effekts war in allen Fällen annähernd vergleichbar, im Falle des Tryptophans wurde der Schutz vor Bleichung dadurch etwas verringert, dass auch in einer erwärmten wässrigen Lösung lediglich eine Konzentration von ~100 mM erreichbar war. Dies galt ebenfalls für die in Wasser fast unlösliche Aminosäure Tyrosin, bei der zusätzlich noch etwas Natriumhydroxid (NaOH) zugesetzt werden musste.

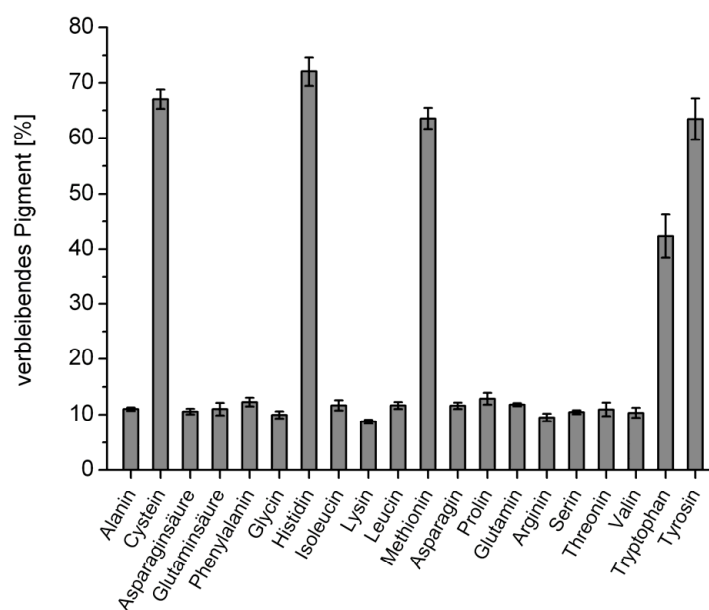


Abb. 3-100: Photostabilität von Zn-BPheid *a* in HDL nach Zugabe von natürlich vorkommenden Aminosäuren. Angegeben ist der prozentuale Anteil an ungebleichtem Pigment nach 10-minütiger Belichtung, der über den Absorptionsrückgang bestimmt wurde (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630). Aliquots einer HDL-Fraktion mit Zn-BPheid *a* wurden 1:1 (v/v) mit 200 mM Lösungen der Aminosäuren in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  verdünnt. Ausnahmen: Tryptophan, Tyrosin: 100 mM. Die Lösungen mit Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tryptophan, und Tyrosin wurden leicht erwärmt, um die Substanz vollständig zu lösen, der Tyrosin-Lösung musste zusätzlich etwas NaOH zugesetzt werden.  $n = 2$ .

Dabei ergibt sich jedoch das Problem, dass der isocyclische Ring E des Zn-BPheid *a* nicht stabil gegenüber dem Angriff einer starken Base ist. Bei Zugabe einer konzentrierten NaOH-Lösung zu Zn-BPheid *a* in CES wird der isocyclische Ring E des Pigments in relativ kurzer Zeit (<5 min) geöffnet, was sich in den zugehörigen Absorptionsspektren der Reaktion in hypsochromen Verschiebungen des  $Q_x$ - ( $576 \rightarrow 564 \text{ nm}$ ) und des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums ( $767 \rightarrow 753 \text{ nm}$ ) widerspiegelt (Abb. 3-101). Bei Zn-BPheid *a* in HDL kommt es wahrscheinlich zu einer identischen Reaktion (ohne Abb.).

Allerdings war dabei nur eine Verschiebung des  $Q_x$ -Absorptionsmaximums (586 → 575 nm) feststellbar, das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum veränderte seine Lage nicht (770 nm). Durch die Zugabe von starken Basen werden folglich die Pigmente in den Lipoproteinen zumindest teilweise in das entsprechende Derivat mit geöffnetem isocyclischen Ring E umgewandelt.

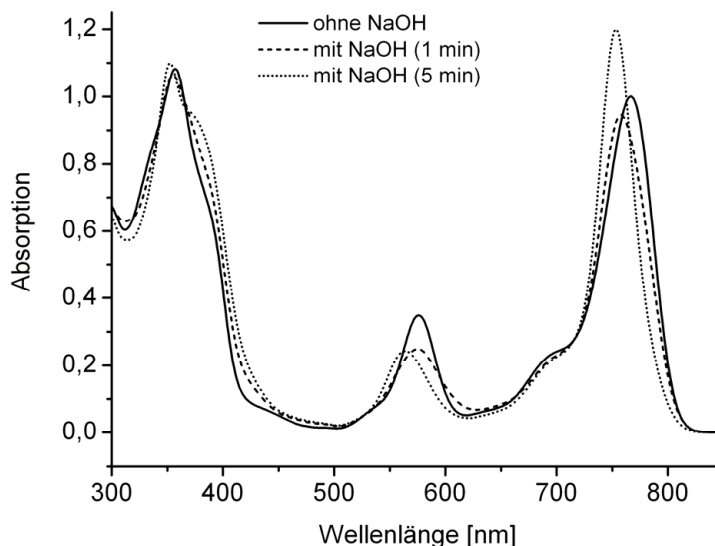


Abb. 3-101: Reaktion von Zn-BPheid a mit einer starken Base (NaOH). Dargestellt sind die Absorptionsspektren vor Zugabe, sowie 1 und 5 min nach Zugabe einer konzentrierten NaOH-Lösung (Endkonzentration: 1M). Das Pigment lag in CES gelöst vor.

Ein Problem ergibt sich vor allem daraus, dass die Photostabilität allein durch Zusatz von NaOH dramatisch erhöht werden kann (Abb. 3-102). Da dies die Messungen stark verfälscht, sollte auf einen Zusatz von NaOH stets verzichtet werden. Ursache für diesen Effekt ist entweder eine viel höhere Photostabilität des Derivats mit geöffnetem isocyclischen Ring E, oder die Bleichung ist protonenkatalysiert (⇒ kinetischer Effekt). Auf Grund dieses Ergebnisses ist auch die in Abb. 3-100 dargestellte Erhöhung der Photostabilität für die Probe mit Tyrosin zumindest teilweise auf die in diesem Fall unvermeidbare Zugabe von NaOH zurückzuführen. Möglicherweise ist auch der gesamte beobachtete Effekt in diesem Fall lediglich auf eine Pigmentmodifikation oder die pH-Wert-Änderung zurückzuführen. Als gesichert kann folglich nur der Schutz vor Photobleichung durch die Aminosäuren Cystein, Methionin, Histidin, und Tryptophan angesehen werden.

Die Wechselwirkungen eines Porphyrins mit einer Lipidmembran sind erheblich abhängig vom pH-Wert der Umgebung, und damit vom Protonierungs- oder Deprotonierungszustand des Porphyrins (Brault *et al.*, 1986; Brault, 1990). Es wird vermutet, dass die geladenen Propionsäure-Seitenketten mit den polaren Kopfgruppen der Lipide interagieren, und damit das Porphyrin an der Oberfläche der Membran fixieren.

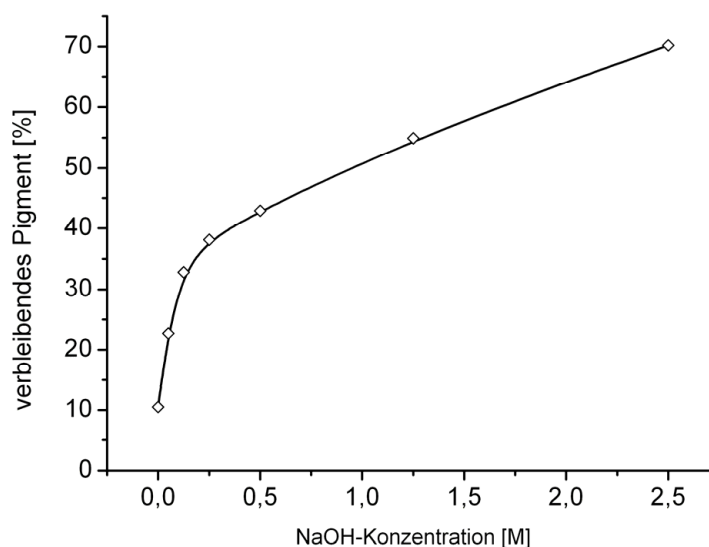


Abb. 3-102: Photostabilität von Zn-BPheid *a* und dessen am isocyclischen Ring E geöffneten Derivats in HDL nach Zugabe von NaOH. Angegeben ist der prozentuale Anteil an ungebleichtem Pigment nach 10-minütiger Belichtung, der über den Absorptionsrückgang bestimmt wurde (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG630). Aliquots einer HDL-Fraktion mit Zn-BPheid *a* wurden 1:1 (v/v) mit 0, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1 M, 2,5 M und 5 M NaOH-Lösungen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verdünnt.

Eine Absenkung des pH-Werts führt daher bei Protoporphyrin IX zu einer Verlagerung des Pigments in tiefere Schichten einer Membran, da die negativen Ladungen der zwei freien Carbonsäuren neutralisiert werden (Bronshtein *et al.*, 2005).

Bei Zn-BPheid *a* müssten durch die basenkatalysierte Öffnung des isocyclischen Rings E in diesem Bereich des Moleküls zwei weitere freie Carbonsäuren entstehen. Dies könnte zu einer oberflächennaheren Position des Pigments führen, die wiederum, durch eine erheblich erleichterte Wegdiffusion der ROS, eine deutliche Erhöhung der Photostabilität des Pigments bewirken könnte.

### 3.11.2 Analyse photoinduzierter Cholesterin-Oxidationsprodukte

Besonders interessant ist die Frage, ob die zugesetzten Pigmente in den Lipoproteinen ROS-Reaktionen des Typs I oder des Typs II initiieren (zur Definition siehe Kap. 1.1.2.2). Erfreulicherweise ermöglicht ausgerechnet eine Verbindungsklasse, die in den meisten Lipoproteinen reichlich vorhanden ist, eine Unterscheidung der beiden Reaktionstypen: Cholesterin und dessen Ester. Damit können die im vorherigen Kapitel gesammelten Ergebnisse durch einen völlig andersartigen methodischen Ansatz überprüft werden.

Cholesterin (Cholesterol; systematisch: 5-Cholesten-3 $\beta$ -ol; Abk.: Chol) sowie dessen Ester werden durch Reaktionen des Typs I überwiegend zu Derivaten oxidiert, die an Position C7 eine Hydroperoxyl-Gruppe tragen. Die Molekülstruktur des Cholesterins ermöglicht hierbei die Bildung beider Stereoisomere, wobei etwas mehr 7 $\beta$ - als 7 $\alpha$ -OOH-Cholesterin entsteht. Da bei den Steroiden die angulare C10-Methylgruppe als  $\beta$ -ständige stereochemische Bezugsgruppe definiert wurde, wird das Derivat mit der Hydroperoxyl-Gruppe zur gleichen Seite wie die C10-Methylgruppe als 7 $\beta$ -OOH-Cholesterin, das Derivat mit der Hydroperoxyl-Gruppe zur anderen Seite dagegen als 7 $\alpha$ -OOH-Cholesterin bezeichnet (Abb. 3-103). Daneben entstehen in sehr geringen Konzentrationen auch die 7-OH-Cholesterine, sowie Spuren einiger weiterer Derivate (z. B. 5,6-Epoxy- und 7-Keto-Cholesterin).

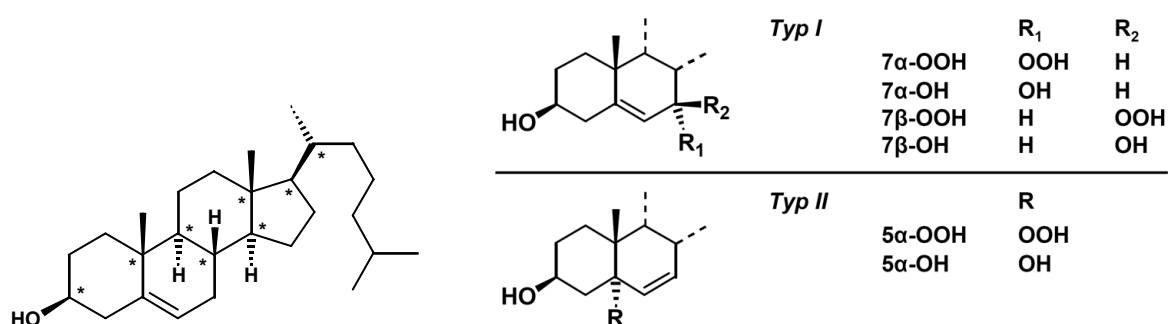


Abb. 3-103: Chemische Strukturen von Cholesterin (links), sowie der häufigsten Oxidationsprodukte bei ROS-Reaktionen des Typs I (rechts oben) und des Typs II (rechts unten). \* chirales C-Atom.

Dagegen wird Cholesterin durch Reaktionen des Typs II überwiegend in ein Derivat mit einer Hydroperoxyl-Gruppe an Position C5 oxidiert. Aufgrund der Molekülstruktur des Cholesterins ist dabei nur das 5 $\alpha$ -OOH-Cholesterin möglich, das 5 $\beta$ -OOH-Cholesterin kann nicht gebildet werden. Des Weiteren entstehen in geringeren Konzentrationen die beiden stereoisomeren 6-OOH-Cholesterine. Da alle Hydroperoxide nicht sonderlich stabil sind, werden diese für die Analytik mittels Reduktionsmitteln in die entsprechenden stabilen Hydroxy-Derivate umgewandelt. Da die entscheidenden Oxidationsprodukte (5 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -OOH-Cholesterin) mittels chromatographischer Methoden unterschieden werden können, sind Rückschlüsse auf den Typ der in den Lipoproteinen ablaufenden ROS-Reaktionen ohne weitere Zusätze möglich.

Die Reaktion des Cholesterins mit Radikalen bei Reaktionen des Typs I beginnt mit der Abspaltung eines allylischen H-Atoms an Position C7 (Abb. 3-104, oben). Das mesomerie-stabilisierte Allyl-Radikal reagiert dann durch Bindung von Triplett-Sauerstoff zu den beiden stereoisomeren 7-Peroxy-Radikalen, welche durch die Abstraktion von H-Atomen aus weiteren Molekülen die entsprechenden 7-OOH-Cholesterine, und gleichzeitig neue Kettenträger-Radikale bilden.

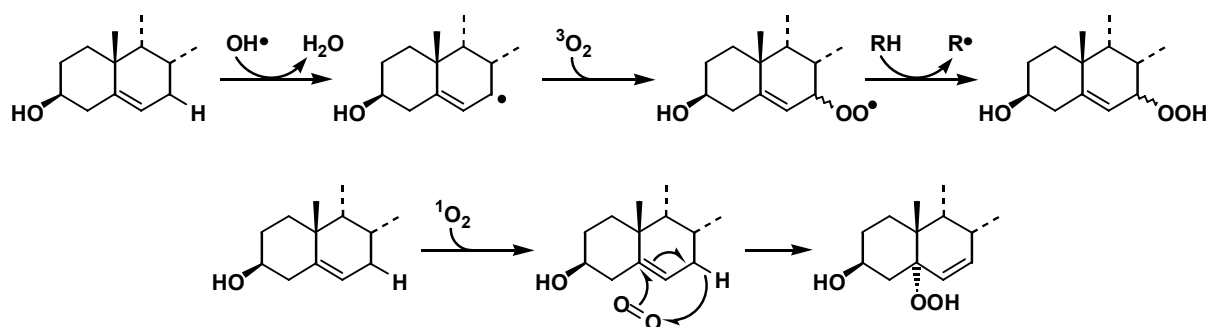


Abb. 3-104: Reaktionsschemata von Cholesterin mit Radikalen (z. B.  $\text{OH}^\bullet$ ) bei ROS-Reaktionen des Typs I (oben) und mit Singulett-Sauerstoff bei ROS-Reaktionen des Typs II (unten).

Die 7-OH-Cholesterine können außer durch Reduktion der Peroxide auch durch eine direkte Reaktion des Allyl-Radikals mit einem weiteren Hydroxyl-Radikal entstehen (ohne Abb.).

Die Reaktion des Cholesterins mit Singulett-Sauerstoff bei Reaktionen des Typs II folgt dem *En-Mechanismus*, der bei vielen Alkenen beobachtet werden kann (Abb. 3-104, unten). Dabei kommt es durch eine konzertierte Verschiebung der Bindungen wiederum zur Bildung eines allylischen Hydroperoxids, aber an Position C5. Bei einer mechanistisch identischen, aber viel selteneren Reaktion unter Beteiligung eines H-Atoms an Position C4 anstelle von C7 entstehen die beiden stereoisomeren 6-OOH-Cholesterine (ohne Abb.).

Die Cholesterin-Oxidationsprodukte wurden mittels HPTLC (siehe Kap. 2.9.3 / 2.9.4) untersucht. Die dafür nötigen Vergleichssubstanzen wurden stets frisch hergestellt. Der Standard für ROS-Reaktionen des Typs II war zum einen das bereits oben beschriebene Hydroperoxy-Derivat  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin, das durch Belichtung einer methanolischen Lösung von Cholesterin und dem Photosensibilisator Bengalrosa (Dinatrium-Salz des 4,5,6,7-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodo-fluoresceins) zugänglich war. Durch Reduktion mittels Natriumborhydrid konnte das stabile Hydroxy-Derivat  $5\alpha$ -OH-Cholesterin erzeugt werden, das ebenfalls als Standard verwendet wurde. Bengalrosa erzeugt bei Belichtung mit sichtbarem Licht ausschließlich Singulett-Sauerstoff (Lambert *et al.*, 1996a), bei Belichtung mit UV-Licht werden dagegen zusätzlich geringe Mengen an Radikalen gebildet (Allen *et al.*, 1991).

Als Standard für ROS-Reaktionen des Typs I musste eine Mischung der Hydroxy-Derivate  $7\alpha$ - und  $7\beta$ -OH-Cholesterin verwendet werden, die durch Reduktion mittels Natriumborhydrid aus käuflich erworbenem 7-Keto-Cholesterin synthetisiert wurde. Die Hydroperoxy-Derivate  $7\alpha$ - und  $7\beta$ -OOH-Cholesterin waren nicht durch Belichtung von Cholesterin in Gegenwart des Farbstoffs Neutralrot herstellbar, der ein bekannter Photosensibilisator für Reaktionen des Typs I ist (Fischer *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2005).

Die Anfärbung aller untersuchten Cholesterin-Derivate erfolgte durch zwei postchromatographische Derivatisierungsverfahren. Das erste beruhte auf einer Reaktion mit farblosem N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenylendiamin (TMPD), dabei wurden die Hydroperoxy-Derivate nach wenigen Minuten als kräftig blau-violette Banden sichtbar. Bei dem Farbstoff, der auch als *Wursters Blau* gekannt ist, handelt es sich um das TMPD-Radikal-Kation. Dazu wurden die HPTLC-Platten vollständig in eine mit Argon gespülte Derivatisierungslösung getaucht. Auch der Plattenuntergrund zeigte bei dieser Methode eine leichte Färbung, da TMPD bereits durch den Sauerstoff der Luft langsam oxidiert wird. Nur bei weit höheren Konzentrationen an Oxidantien als in den folgenden Versuchen erreichten, kann das Radikalkation wieder in ein farbloses Derivat, das TMPD-Dikation, verwandelt werden.

Alle Lipide konnten durch Verwendung einer Kupfersalz-Lösung sichtbar gemacht werden. Auch in diesem Fall wurden die HPTLC-Platten vollständig in eine Derivatisierungslösung getaucht. Erst nach Erhitzen zeigten sich die Lipide als meist bräunlich gefärbte Banden. Cholesterin färbte sich violett, die Hydroxy-Derivate des Cholesterins hellblau, Natriumchoolat olivgrün, und 7-Keto-Cholesterin schwach gelb. Es ist noch nicht vollständig geklärt, worauf die Färbungen beruhen. Als schnellste und zuverlässigste Methode zur Entwicklung erwies sich dabei die Verwendung einer Heißluftpistole. Bei Entwicklung in einem Trockenofen kam es dagegen zu einer teilweisen Ablösung des Chromatographiematerials von der Aluminium-Trägerfolie.

Die oben beschriebenen Standards trennten sich in im verwendeten HPTLC-System ausreichend, um das 5 $\alpha$ -OH-Cholesterin deutlich von den 7-OH-Cholesterinen unterscheiden zu können (Abb. 3-105).

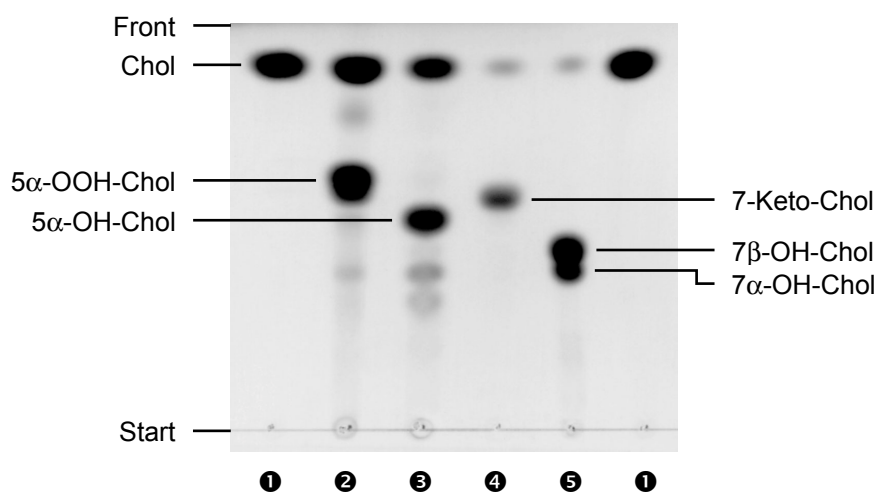


Abb. 3-105: HPTLC-Analyse der Cholesterin-Derivate zur Unterscheidung von ROS-Reaktionen der Typen I und II (CuSO<sub>4</sub>-Färbung). ❶: Chol; ❷: Chol + Bengalrosa belichtet (5 $\alpha$ -OOH-Chol-Standard); ❸: ❷ reduziert (5 $\alpha$ -OH-Chol-Standard); ❹: 7-Keto-Chol; ❺: ❹ reduziert (7 $\alpha$ -OH-Chol-Standard).

Auf die Angabe von Retentionszeiten wird im Folgenden verzichtet, da diese sehr stark in Abhängigkeit von nur schwer steuerbaren äußeren Parametern (v. a. Temperatur) variierten. Die Chromatogramme sind bei parallelem Auftrag der entsprechenden Standards aber trotzdem eindeutig. Die Zuordnung der beiden 7-OH-Cholesterine erfolgte durch den Vergleich mit ähnlichen Experimenten der Gruppe um Prof. Dr. Albert Girotti (Girotti *et al.*, 1987; Bachowski *et al.*, 1988). Alle Phospholipid-Peroxide verbleiben bei diesem System an der Auftragsstelle (Bachowski *et al.*, 1988).

In allen belichteten Lipoprotein-Fractionen konnten unabhängig vom zugesetzten Pigment Spuren von  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin detektiert werden (Abb. 3-106). Die Hauptmenge der Oxidationsprodukte stellten allerdings OOH-Cholesterinester dar, die auf Grund ihres unpolaren Fettsäurerestes mit der Lösungsmittelfront liefen. Um zu entscheiden, ab es sich bei diesen ebenfalls (überwiegend) um Moleküle des  $5\alpha$ -OOH-Derivats handelte, wurde eine Methode zu deren Analyse ausgearbeitet.

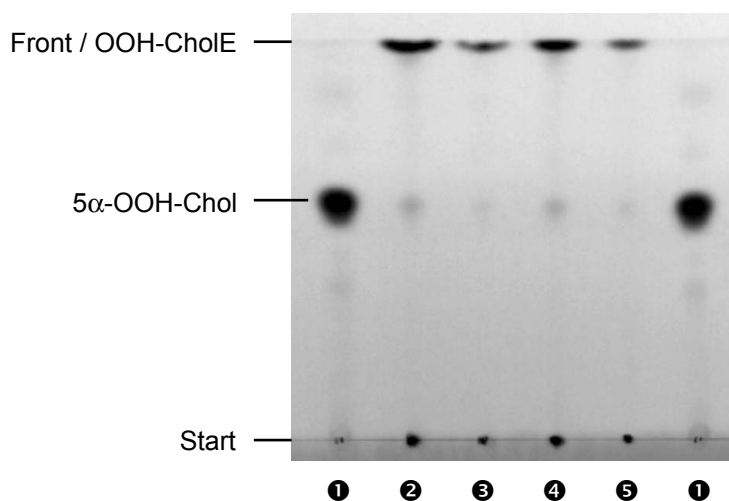


Abb. 3-106: HPTLC-Analyse von belichteten Lipoprotein-Fractionen (TMPD-Färbung). ❶:  $5\alpha$ -OOH-Chol-Standard; ❷: LDL mit Pd-BPheid a; ❸: LDL mit Zn-BPheid a; ❹: HDL mit Pd-BPheid a; ❺: HDL mit Zn-BPheid a.

Dazu wurden die Cholesterinester und deren Derivate in die entsprechenden Cholesterin-Derivate umgewandelt, für die geeignete Standards (siehe Abb. 3-105) verfügbar waren. Als Kontrolle wurde ein Aliquot einer belichteten Mischung von Cholesteryloleat (CholE) und Bengalrosa in 2-Propanol mit dem gleichen Volumen einer Lösung von Cholesterin-Esterase (CholEase) und Natriumchololat in Phosphat-Puffer vermischt und mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert (siehe Kap. 2.9.5). Die HPTLC-Analyse dieser Lösung zeigte, dass die Cholesterin-Esterase auch Hydroperoxid-Derivate spalten kann (Abb. 3-107).

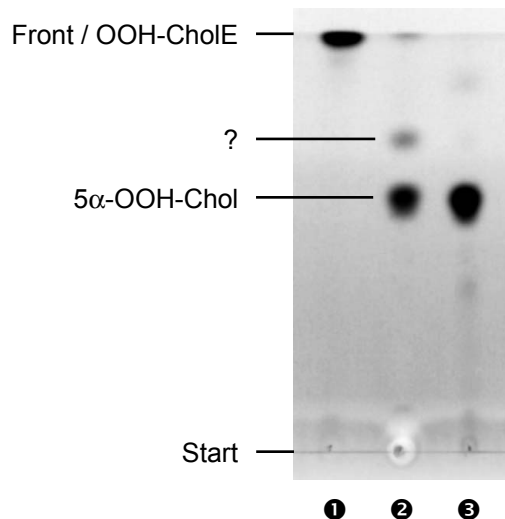


Abb. 3-107: HPTLC-Analyse von OOH-CholE nach CholEase-Reaktion (TMPD-Färbung). **1**: CholE + Bengalrosa belichtet; **2**: **1** nach CholEase-Reaktion; **3**: 5 $\alpha$ -OOH-Chol-Standard.

Die bei Belichtung entstandenen OOH-Cholesterinester wurden nahezu quantitativ in 5 $\alpha$ -OOH-Cholesterin umgewandelt (**2**). Bei der ebenfalls sichtbaren zweiten Bande könnte es sich um die 6-OOH-Cholesterine handeln. Daher kann der Rückschluss gezogen werden, dass es sich bei den OOH-Cholesterinestern größtenteils um die 5 $\alpha$ -Derivate gehandelt hat. 2-Propanol wurde nur bei diesem Experiment verwendet, da die Aktivität der CholEase mit diesem Lösungsmittel höher als mit anderen Lösungsmitteln ist (Takeda *et al.*, 2006).

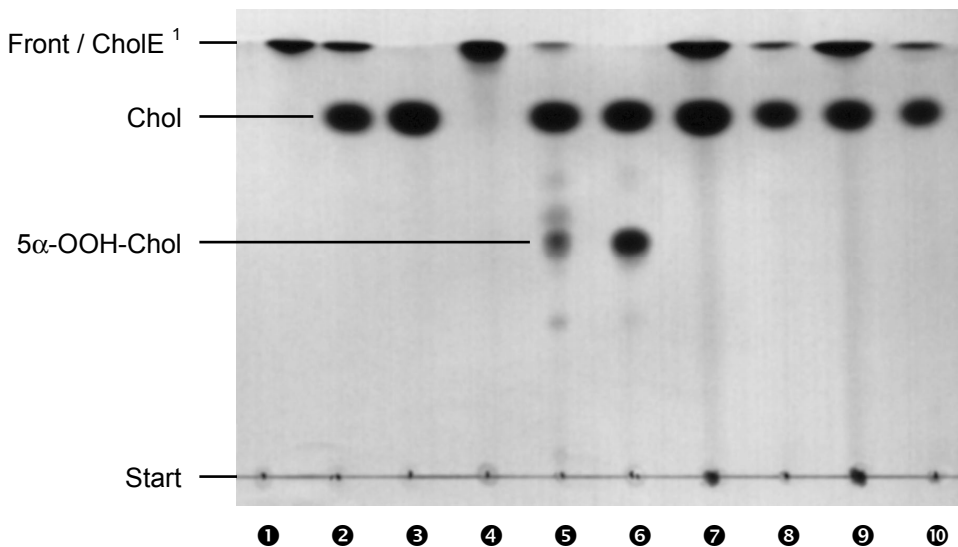


Abb. 3-108: HPTLC-Analyse von CholE und OOH-CholE nach CholEase-Reaktion (CuSO<sub>4</sub>-Färbung). **1**: CholE; **2**: **1** nach CholEase-Reaktion; **3**: Chol; **4**: CholE + Bengalrosa belichtet; **5**: **4** nach CholEase-Reaktion; **6**: 5 $\alpha$ -OOH-Chol-Standard; **7**: LDL-Lipide; **8**: **7** nach CholEase-Reaktion; **9**: HDL-Lipide; **10**: **9** nach CholEase-Reaktion. <sup>1</sup> In den Spuren **4** und **5** sind in den Banden neben CholE auch geringe Mengen an OOH-CholE enthalten.



Auch die HPTLC-Analyse aller Lipide nach Inkubation mit der Cholesterin-Esterase-Lösung bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 3-108). Die in der belichteten Lösung vorhandenen OOH-Cholesterinester wurden nahezu quantitativ zu  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin abgebaut (⑤). Dies gilt ebenfalls für die normalen, d. h. nicht-oxidierten Cholesterinester, sowohl in methanolischer Lösung (②), wie auch in Lipoprotein-Fractionen (③ und ⑩).

Die bereits analysierten Lösungen belichteter Lipoprotein-Fractionen (siehe Abb. 3-106) wurden jetzt entsprechend mit der Cholesterin-Esterase-Lösung inkubiert, und einer zweiten HPTLC-Analyse unterworfen. Wie bereits in den Experimenten mit OOH-Cholesterinestern in Methanol (siehe Abb. 3-107), werden auch hier alle OOH-Cholesterinester nahezu quantitativ abgebaut (Abb. 3-109).

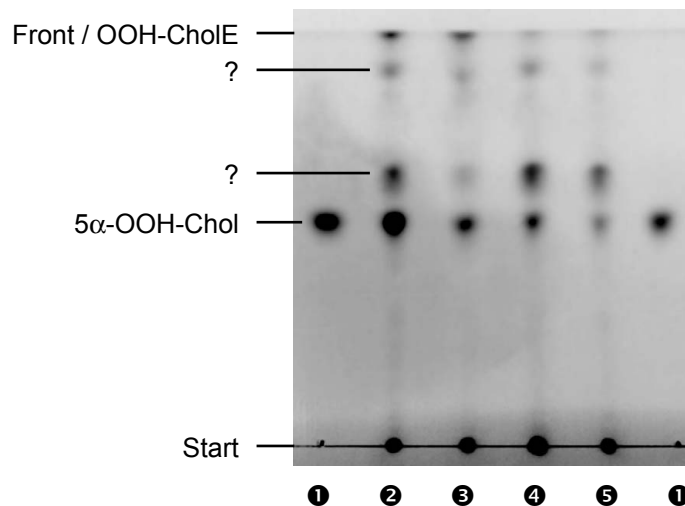


Abb. 3-109: HPTLC-Analyse von belichteten Lipoprotein-Fractionen nach CholEase-Reaktion (TMPD-Färbung). ①:  $5\alpha$ -OOH-Chol-Standard; ②: LDL mit Pd-BPheid a; ③: LDL mit Zn-BPheid a; ④: HDL mit Pd-BPheid a; ⑤: HDL mit Zn-BPheid a.

In allen Fällen wurde  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin als Hauptprodukt gefunden, was auf einen Typ II-Mechanismus unter Beteiligung von Singulett-Sauerstoff hindeutet. Neben Spuren von nicht enzymatisch verseiften OOH-Cholesterinestern sind noch zwei weitere Banden erkennbar, bei denen es sich (u. a.) um die 6-OOH-Cholesterine handeln könnte. Die Verhältnisse der Banden sind jedoch nicht konstant. In beiden LDL-Proben wird deutlich mehr  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin im Vergleich zu den zwei unidentifizierbaren Produkten gebildet, in den HDL-Proben ist dagegen kaum ein mengenmäßiger Unterschied feststellbar.

Die Intensität der Banden, auch wenn diese nur sehr schwer quantifizierbar ist, bestätigt die Ergebnisse der Hydroperoxid-Messungen mittels DCF (siehe Kap. 3.10.1).

So wurden mit Abstand die meisten Hydroperoxide in LDL mit Pd-BPheid *a* gebildet, die wenigsten in HDL mit Zn-BPheid *a*. In LDL mit Zn-BPheid *a* entstehen etwas weniger dieser Oxidationsprodukte als in HDL mit Pd-BPheid *a*.

Die endgültige Bestätigung, dass im Wesentlichen die  $5\alpha$ -Derivate gebildet werden (d. h. ein Typ II-Mechanismus vorliegt), konnte erbracht werden, indem die Produkte in den belichteten und mit Cholesterin-Esterase-Lösung inkubierten Lipoprotein-Fractionen (siehe Abb. 3-109) chemisch reduziert wurden. Erleichtert wurde die Auswertung der HPTLC-Analyse dadurch, dass sich bei der  $\text{CuSO}_4$ -Färbung alle OH-Cholesterine hellblau anfärbten, und damit gut von den überwiegend bräunlich gefärbten übrigen Lipiden unterscheidbar waren (Abb. 3-110). In allen Proben war  $5\alpha$ -OH-Cholesterin erkennbar, dagegen waren in keiner Probe auch nur Spuren von 7-OH-Cholesterinen nachweisbar.

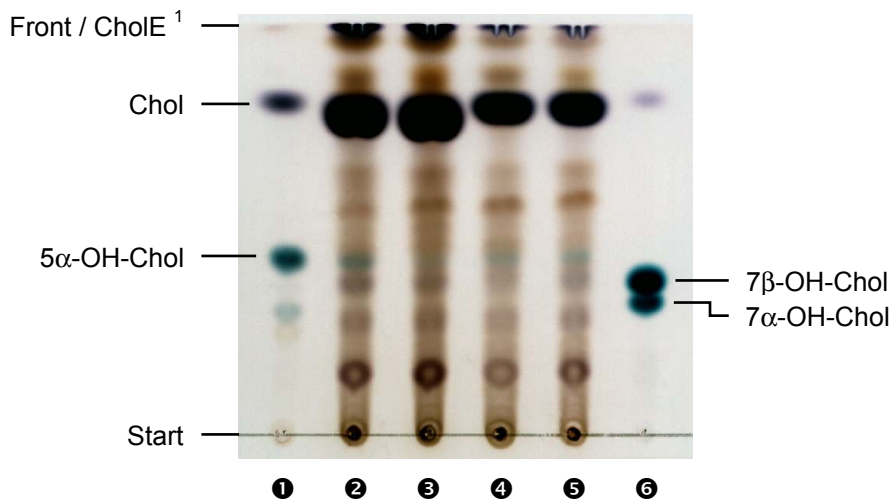


Abb. 3-110: HPTLC-Analyse von belichteten Lipoprotein-Fractionen nach CholEase-Reaktion und chem. Reduktion ( $\text{CuSO}_4$ -Färbung). ①:  $5\alpha$ -OH-Chol-Standard; ②: LDL mit Pd-BPheid *a*; ③: LDL mit Zn-BPheid *a*; ④: HDL mit Pd-BPheid *a*; ⑤: HDL mit Zn-BPheid *a*; ⑥:  $7\alpha\beta$ -OH-Chol-Standard. <sup>1</sup> In den Spuren ②–⑥ sind in den Banden neben CholE wohl auch geringe Mengen an OH-CholE enthalten.

Es ist zwar eine Bande in Höhe des  $7\beta$ -OH-Cholesterins erkennbar, diese weist aber zum einen nicht die charakteristische hellblaue Färbung aller OH-Cholesterine auf, zum anderen fehlt die Bande des  $7\alpha$ -Derivats, das bei einem Typ I-Mechanismus ebenfalls entstehen müsste. Erneut fällt auf, dass in LDL mit Pd-BPheid *a* deutlich mehr  $5\alpha$ -OH-Cholesterin als in den übrigen Proben gebildet wurde. In der Spur des  $5\alpha$ -OH-Chol-Standards (①) ist dagegen etwas  $7\alpha$ -OH-Cholesterin erkennbar. Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich, da aus  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin durch eine relativ schnelle allylische Umlagerung zunächst  $7\alpha$ -OOH-Cholesterin, aus diesem wiederum durch Epimerisierung  $7\beta$ -OOH-Cholesterin entstehen kann (Beckwith *et al.*, 1988; Beckwith *et al.*, 1989).

$7\alpha$ -OOH-Cholesterin stellt hierbei jedoch stets das  $7$ -OOH-Cholesterin-Hauptprodukt dar, während bei der radikalischen Bildung von  $7$ -OOH-Cholesterin immer  $7\beta$ -OOH-Cholesterin mengenmäßig deutlich dominiert. Gleiches gilt, wie aus Abb. 3-110 ersichtlich, für die Bildung von  $7\alpha\beta$ -OOH-Cholesterin aus  $7$ -Keto-Cholesterin (Girotti *et al.*, 1987; Bachowski *et al.*, 1988).

Im Gegensatz dazu kann der Nachweis von  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin als so gut wie eindeutiger Nachweis für eine Photoreaktion des Typs II angesehen werden (Girotti, 2001). Nur in sehr seltenen Fällen könnte  $7\alpha\beta$ -OOH-Cholesterin evtl. durch eine Peroxylradikal-Disproportionierung des Russel-Typs  $^1\text{O}_2$  erzeugen ( $2 \text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{ROOOOR} \rightarrow \text{RO} + ^1\text{O}_2 + \text{ROH}$ ), der dann mit noch vorhandenem Cholesterin zu  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin reagieren könnte (Howard und Ingold, 1968; Girotti, 2001).

### 3.11.3 Analyse $\text{Cu}^{2\oplus}$ -induzierter Cholesterin-Oxidationsprodukte

Nach Abschluss der bisher beschriebenen analytischen Experimente gelang auch noch die indirekte, d. h. nicht-photoinduzierte Herstellung von  $7\alpha\beta$ -OOH-Cholesterin in Lipoprotein-Fractionen. Wurden Lipoproteine über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  mit einer sauren Kupfersalzlösung (20 mM Kupfersulfat / 50 mM Citronensäure; ad pH 4,0 mit NaOH) inkubiert, so war in der HPTLC-Analyse ein Oxidationsprodukt mit einem etwas geringeren  $R_f$ -Wert als  $5\alpha$ -OOH-Cholesterin erkennbar (Abb. 3-111). Die wichtigsten Reaktionen von Kupferionen mit biologischen Molekülen sind im Detail im Anhang H beschrieben.

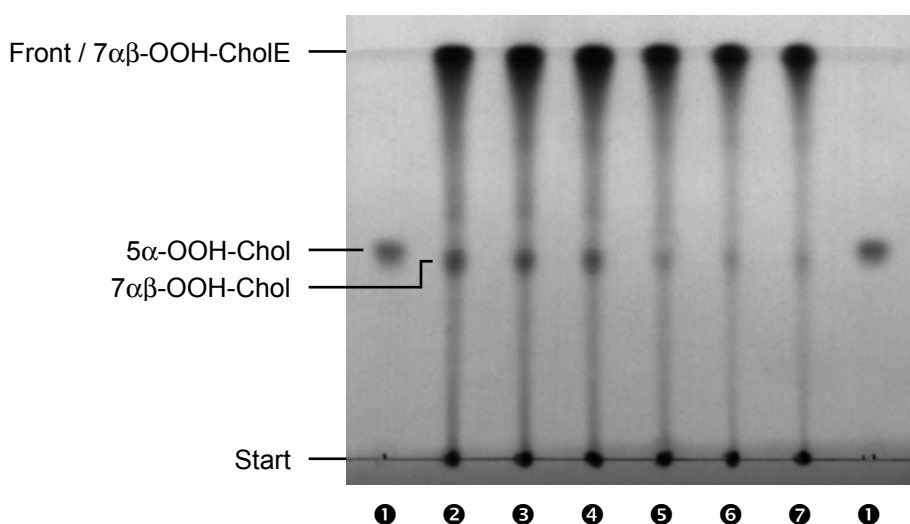


Abb. 3-111: HPTLC-Analyse von Lipoprotein-Fractionen nach Inkubation (24 h) mit saurer Kupfersalzlösung (TMPD-Färbung). ①:  $5\alpha$ -OOH-Chol-Standard; ②: LDL ozP; ③: LDL mit Pd-BPheid a; ④: LDL mit Zn-BPheid a; ⑤: HDL ozP; ⑥: HDL mit Pd-BPheid a; ⑦: HDL mit Zn-BPheid a.

Dieses Produkt entstanden, wie zu erwarten, auch im Dunkeln in Abwesenheit zugesetzter Photosensibilisatoren. Im Unterschied zu den beiden 7-OH-Cholesterinen sind die beiden 7-OOH-Cholesterine chromatographisch nicht auftrennbar (Geiger *et al.*, 1997).

Dass es sich bei diesem Oxidationsprodukt tatsächlich um die gesuchten 7-OOH-Derivate handelte, konnte durch eine weitere HTPLC-Analyse verifiziert werden. Dazu wurden die Produkte einer der Lösungen mit einem hohen Anteil der potentiellen 7-OOH-Derivate (LDL mit Pd-BPheid a) mittels Natriumborhydrid reduziert.

Eine HPTLC-Analyse wies in dieser Lösung große Mengen an 7-OH-Cholesterinen nach, dagegen konnte keinerlei 5 $\alpha$ -OH-Cholesterin gefunden werden (Abb. 3-112). Damit handelte es sich sehr wahrscheinlich bei den ebenfalls gebildeten OOH-Cholesterinestern (siehe Abb. 3-111) auch ausschließlich um die 7 $\alpha\beta$ -Derivate.

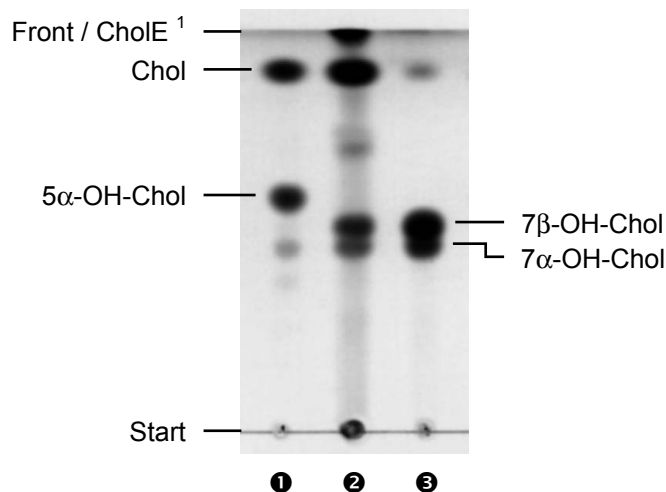


Abb. 3-112: HPTLC-Analyse einer ausgewählten Lipoprotein-Fraktion (Spur ③ in Abb. 3-111) nach Inkubation (24 h) mit saurer Kupfersalzlösung und chem. Reduktion (CuSO<sub>4</sub>-Färbung). ①: 5 $\alpha$ -OH-Chol-Standard; ②: LDL mit Pd-BPheid a; ③: 7 $\alpha\beta$ -OH-Chol-Standard. <sup>1</sup> In der Spur ② sind in der Bande neben CholE wohl auch geringe Mengen an 7 $\alpha\beta$ -OH-CholE enthalten.

## 3.12 Photoinduzierte Pigment-Oxidationsprodukte in Lipoproteinen

### 3.12.1 Oxidationsprodukte der Tetrapyrrole

Tetrapyrrole erzeugen bei Belichtung ROS, welche sowohl die Tetrapyrrole selbst, wie auch andere Moleküle in deren Umgebung oxidieren können. Bakteriochlorine werden dabei meist zum einen in ihre entsprechenden Chlorin-Derivate, zum anderen in im VIS/NIR nur schwach absorbierende Abbauprodukte umgewandelt (siehe Kap. 3.9).

So waren mit den relativ begrenzten Möglichkeiten der Absorptionsspektroskopie in belichteten Lipoprotein-Proben mit Zn- oder Pd-BPheid *a* außer den ungebleichten Ausgangspigmenten stets nur die entsprechenden Chlorin-Derivate 3Ac-Zn- bzw. 3Ac-Pd-Pheid *a* nachzuweisen (Abb. 3-113). Sowohl in allen Lipoprotein-Proben, wie auch in allen getesteten organischen Lösungsmitteln wurden jedoch bei Belichtung mehrheitlich farblose Oxidationsprodukte gebildet.

Als farblos werden im Folgenden alle Verbindungen ohne nennenswerte Absorption im VIS/NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums bezeichnet. Bei einer Bleichung auf etwa 25% der ursprünglichen Pigment-Menge betrug die Summe der Intensitäten aller nach Belichtung erkennbaren  $Q_y$ -Absorptionsmaxima in allen Fällen weniger als 50% der Intensität des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums des Ausgangspigments vor Belichtung (ohne Abb.).

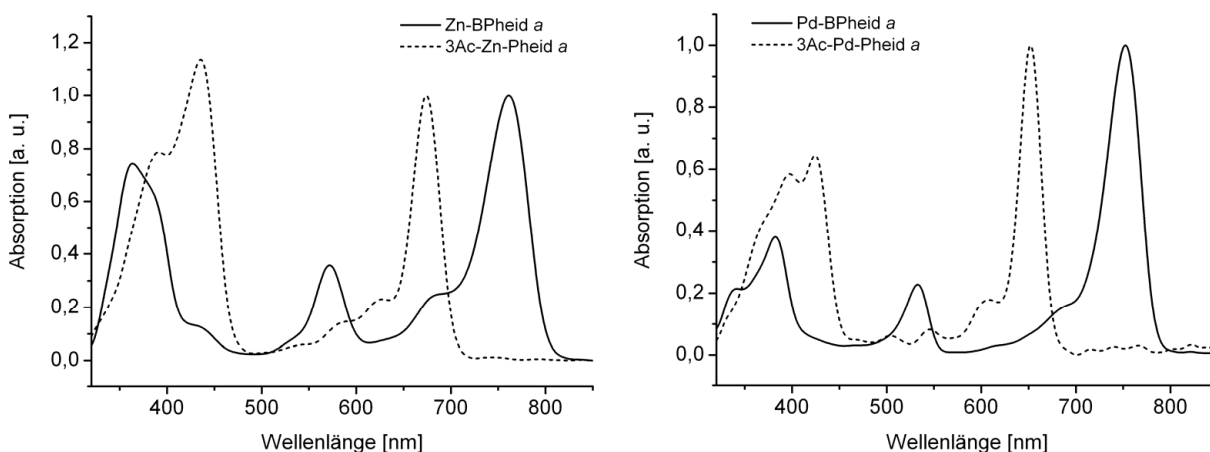


Abb. 3-113: Aus den HPLC-Chromatogrammen entnommene Absorptionsspektren von Zn-BPheid *a* und 3Ac-Zn-Pheid *a* (links), sowie Pd-BPheid *a* und 3Ac-Pd-Pheid *a* (rechts). Belichtete HDL-Proben mit Zn- oder Pd-BPheid *a* wurden dazu auf einer RPC-Säule getrennt (siehe Kap. 2.8.2). Qualitativ identische Spektren ergaben sich bei entsprechenden LDL-Proben (ohne Abb.).

Dies gilt auch, wenn der normalerweise im Vergleich zu den Bakteriochlorin-Derivaten etwas geringere Absorptionskoeffizient der entsprechenden 3Ac-Chlorin-Derivate berücksichtigt wird. So wird  $\epsilon$  (770 nm) von BChl *a* in Aceton mit  $\sim 69,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  angegeben (Permentier *et al.*, 2000),  $\epsilon$  (677 nm) des Monohydrats von 3-Ac-Chl *a* in Aceton mit  $\sim 65,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Lindsay-Smith und Calvin, 1966).

Die Radikalkationen von BChl *a* und dessen transmetallierten Derivaten weisen dagegen im NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums Absorptionsbanden auf (BChl *a*: 866 nm; Zn-BPhe *a*: 847 und 895 nm; Pd-BPhe *a*: 856 nm), die in allen Fällen eine eher geringe Intensität aufweisen (Geskes *et al.*, 1995). Derartige Produkte konnten jedoch in keinem Fall sicher nachgewiesen werden.

Ein anderes Bild ergab sich bei Belichtung von Pd-BPheid a in einer Detergens-Umgebung. Auch hier entstanden bei Belichtung überwiegend farblose Oxidationsprodukte, jedoch konnte neben 3Ac-Pd-Pheid a auch noch das entsprechende Pd-Porphyrin-Derivat als ein farbiges Oxidationsprodukt identifiziert werden.

Bereits in den Absorptionsspektren einer belichteten Lösung von Pd-Bpheid a in verdünntem CE ist neben den  $Q_y$ -Absorptionsmaxima des Pd-Bpheid a bei 760 nm, und des 3Ac-Pd-Pheid a bei 657 nm, das  $Q_y$ -Absorptionsmaximum des entsprechenden Pd-Porphyrin-Derivats bei 601 nm zu erkennen (Abb. 3-114, links). Der Unterschied zu den Lipoprotein-Proben mit Pd-BPheid a, bei denen kein Porphyrin-Derivat nachweisbar war, ist besonders deutlich beim Vergleich der Abb. 3-68 und 3-114 erkennbar.

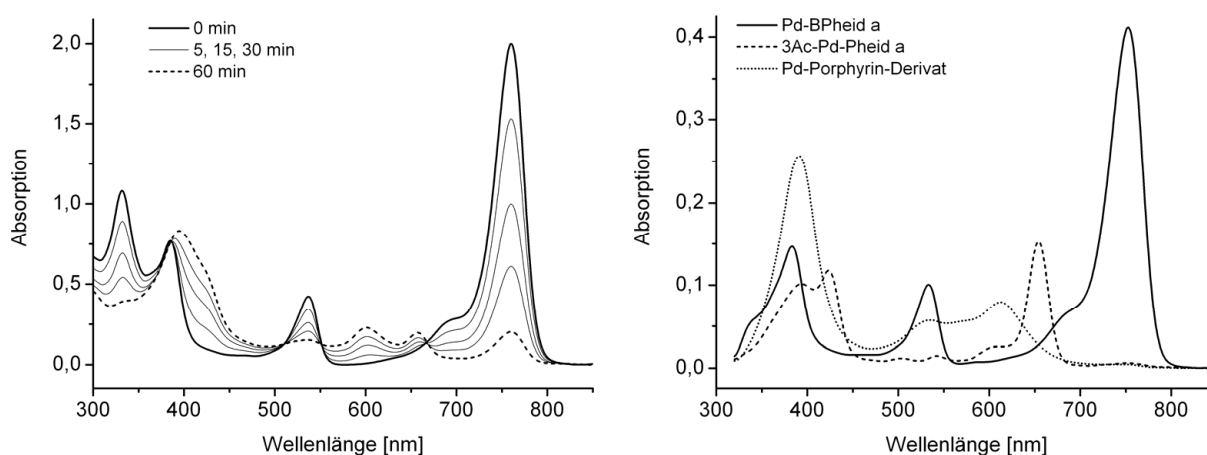


Abb. 3-114: Photoreaktion von Pd-BPheid a in CES. Dargestellt sind Absorptionsspektren vor und nach ausgewählten Zeitpunkten der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695) (links), sowie den 3D-Chromatogrammen der HPLC-Analyse (Gradientenprogramm: LP) entnommene Absorptionsspektren der drei nach Belichtung existenten Pigmente (Pd-BPheid a, 3Ac-Pd-Pheid a, Pd-Porphyrin-Derivat) (rechts).

Das Absorptionsspektrum des Pd-Porphyrin-Derivats konnte mittels einer HPLC-Analyse der nach Belichtung existenten Pigmente aufgenommen werden (Abb. 3-114, rechts). In der Lösungsmittelmischung des verwendeten HPLC-Programms sind die  $Q_y$ -Absorptionsmaxima der drei Pigmente gegenüber der Situation in CES geringfügig verschoben (Pd-Bpheid a: 753 nm; 3Ac-Pd-Pheid a: 654 nm; Pd-Porphyrin-Derivat: 612 nm).

Auch in Triton X-100-Mizellen werden als Hauptoxidationsprodukte das Chlorin-Derivat ( $Q_y$ :  $\sim 660$  nm), und das Porphyrin-Derivat ( $Q_y$ :  $\sim 600$  nm) gebildet (Vakrat-Haglili *et al.*, 2005). Bei Zugabe des  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ -Quenchers Natriumazid wurde mehr Chlorin-, und weniger Porphyrin-Oxidationsprodukt gebildet. Auf Grund dieser Feststellung stellten die Autoren die Hypothese auf, dass das Chlorin-Derivat durch Photoreaktionen des Typs I, und das Porphyrin-Derivat durch Photoreaktionen des Typs II gebildet wird.

Diese Hypothese wird durch die beiden im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse (Abb. 3-68; Abb. 3-114, links) vollständig unterstützt. In einer reinen Detergens-Umgebung (CES oder Triton X-100) wird mehr Porphyrin-, in einer „ $O_2(^1\Delta_g)$ -quencheden“ Umgebung (Lipoprotein oder Natriumazid) mehr Chlorin-Oxidationsprodukt generiert. Ein Lipoprotein müsste aufgrund seiner hohen Konzentrationen an Cholesterin(estern), ungesättigten Fettsäuren, reaktiven Aminosäuren, sowie Antioxidantien einen sehr guten  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quencher darstellen.

In einer Zelle wird  $^1O_2$  vor allem von den Proteinen, zu einem geringen Teil von Wasser, und zu einem nahezu vernachlässigbaren Teil von Lipiden, Antioxidantien, DNA, etc. gequencht (Baker und Kanovsky, 1992).

Dies gilt jedoch wahrscheinlich nicht für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten relativ hydrophoben Photosensibilisatoren, die bevorzugt in Membranen lokalisiert sind. Auch in Blutplasma wird  $^1O_2$  zu 77% von Biomolekülen, vor allem Proteinen, und zu nur 23% von Wasser gequencht (Kanovsky, 1990). Die im Blutplasma enthaltenen Antioxidantien haben dagegen trotz ihrer sehr hohen Reaktivität mit  $^1O_2$  aufgrund ihrer im Vergleich zu den Proteinen sehr geringen Konzentrationen kaum einen Anteil an den insgesamt ablaufenden  $^1O_2$ -Quenchvorgängen.

### 3.12.2 Oxidationsprodukte der Carotinoide

Die in allen Lipoproteinen enthaltenen Carotinoide fungieren in einer Vielzahl von natürlichen Systemen als effektive Schutzpigmente, da sie schnell mit ROS reagieren, und damit andere Moleküle vor Oxidation bewahren können. Diese antioxidative Wirkung beruht überwiegend auf der Fähigkeit von einigen Carotinoiden (z. B.  $\beta$ -Carotin), den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff schnell durch Spin-erlaubten Energietransfer entgiften zu können (Abb. 3-115).

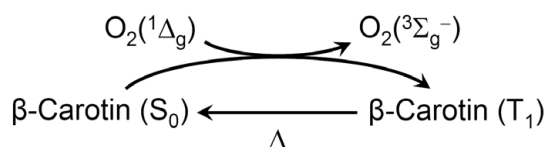


Abb. 3-115: Schematische Darstellung der Carotinoid-vermittelten (hier:  $\beta$ -Carotin) Überführung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff  $O_2(^1\Delta_g)$  in Triplett-Sauerstoff  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  mittels eines Spin-erlaubten Energieübertragungs-Mechanismus und anschließender innerer Konversion (Abgabe von Wärme). Das Carotinoid bleibt hierbei chemisch unverändert.

Teilweise werden Carotinoide jedoch durch ROS modifiziert, so dass eine Reihe von neuen, oxygenierten Verbindungen entsteht (Fiedor *et al.*, 2005). Es wurde daher versucht, derart veränderte Carotinoide mittels HPLC-Analysen von belichteten Lipoprotein-Fractionen zu identifizieren.

In mit Zn-BPheid *a* inkubierten Lipoproteinproben konnte nach Belichtung lediglich ein Oxidationsprodukt in geringer Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 3-116).

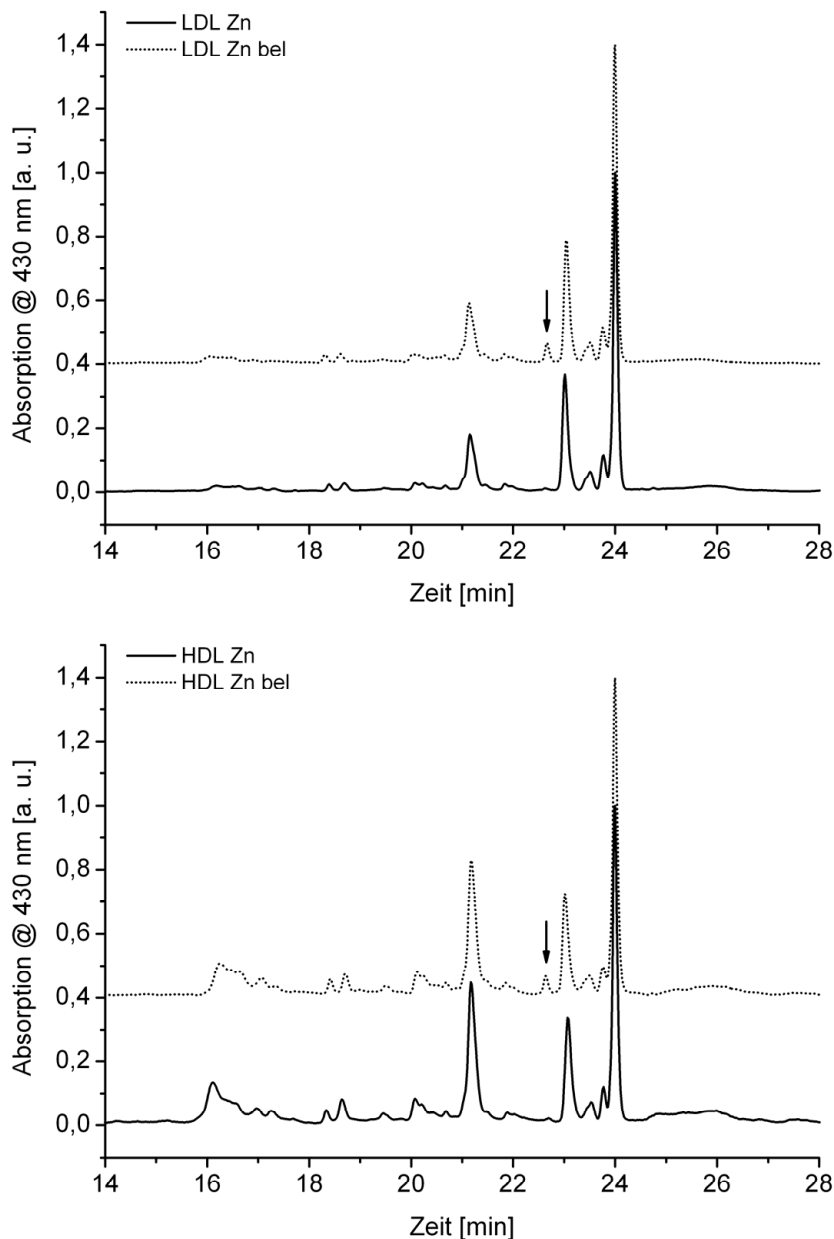


Abb. 3-116: HPLC-Chromatogramme der extrahierten Carotinoide von mit Zn-BPheid *a* inkubierten LDL- (oben) und HDL-Proben (unten) vor und nach Belichtung (bel). Gradientenprogramm: LP. Die Pfeile kennzeichnen das einzige nachweisbare Oxidationsprodukt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden den Chromatogrammen der belichteten Proben 0,4 Einheiten hinzuaddiert.



Bei genauerer Durchsicht der Absorptionsspektren aller in den HPLC-Analysen detektierten Carotinoide erwies sich eine Wellenlänge von 430 nm als optimal zur Darstellung der Chromatogramme, da alle Verbindungen dort zumindest eine mäßige Absorption ( $A_{430} > 40\% A_{\max}$ ) besaßen. Die Zuordnung der Carotinoide erfolgte durch Cochromatographie oder durch Vergleich mit bereits veröffentlichten HPLC-Analysen von Blutplasma-Carotinoiden (Khachik *et al.*, 1992b; Khachik *et al.*, 1997). Die häufigsten Carotinoide waren stets  $\beta$ -Cryptoxanthin (3-Hydroxy- $\beta$ -Carotin; 21,2 min), Lycopin (23,0 min), und  $\beta$ -Carotin (24,0 min). In allen Lipoproteinen ohne zugesetztes Pigment konnten nach Belichtung keinerlei Oxidationsprodukte nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Das Oxidationsprodukt ( $t_r = 22,7$  min) besaß ein typisches Carotinoid-Absorptionsspektrum mit Maxima bei 430 und 454 nm, und einer Schulter bei  $\sim 409$  nm (Abb. 3-117). Dieses Absorptionsspektrum ähnelt sehr dem des 7,8-Dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotins, das Maxima bei 529 und 454 nm, und eine Schulter bei 410 nm besitzt (Takaichi *et al.*, 1996).

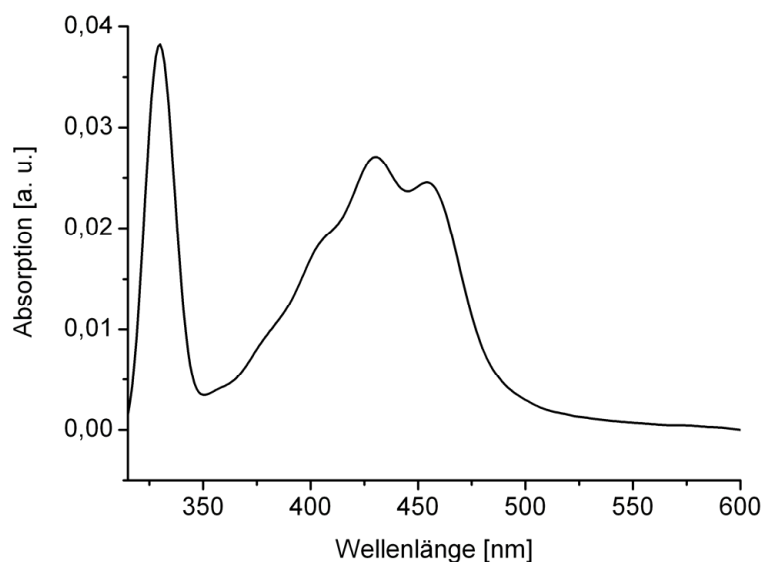


Abb. 3-117: Absorptionsspektrum des nach Belichtung einer mit Zn-BPheid *a* inkubierten LDL-Probe mittels HPLC-Analyse (siehe Abb. 3-116) gefundenen Oxidationsprodukts.

Alle anderen Carotinoide mit demselben verkürzten  $\pi$ -Elektronensystem weisen ein nahezu identisches Absorptionsspektrum auf, z. B. Mutatochrom (5,8-Epoxy-5,8-dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin), das in Hexan Absorptionsmaxima bei 404, 426, und 452 nm aufweist (Kennedy und Liebler, 1992). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich bei dem gefundenen Oxidationsprodukt um 5,8-Endoperoxy-5,8-dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin (Abb. 3-118) handelt, das bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen als Produkt der Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit  $O_2(^1\Delta_g)$  beschrieben wurde. So wurden in einer Bengalrosa-induzierten Photoreaktion in Lösungsmittel als Oxidationsprodukte von  $\beta$ -Carotin die Spaltprodukte  $\beta$ -apo-8'-Carotenal,  $\beta$ -apo-10'-Carotenal,  $\beta$ -apo-14'-Carotenal,  $\beta$ -Ionon, sowie 5,8-Endoperoxy- $\beta$ -Carotin gefunden (Stratton *et al.*, 1993).

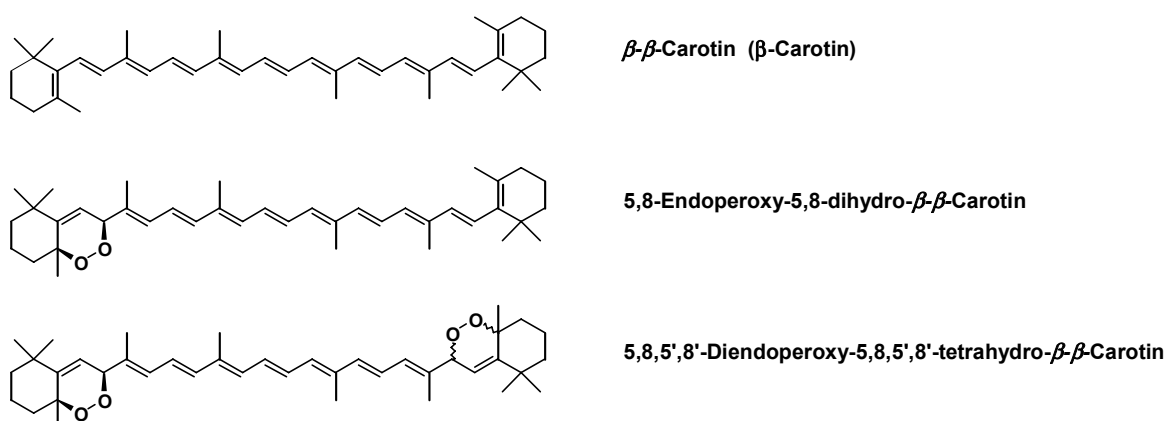


Abb. 3-118: Chemische Strukturen von  $\beta$ - $\beta$ -Carotin (oben), 5,8-Endoperoxy-5,8-dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin (Mitte), und 5,8,5',8'-Diendoperoxy-5,8,5',8'-tetrahydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin (unten).

In einer Bengalrosa-induzierten Photoreaktion in inversen Mizellen konnte dagegen als Hauptprodukt der Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit  $O_2(^1\Delta_g)$  lediglich 5,8-Endoperoxy- $\beta$ -Carotin nachgewiesen werden (Montenegro *et al.*, 2002). Bei längeren Belichtungszeiten entstanden auch in den inversen Mizellen einige der in Lösungsmittel gefundenen Spaltprodukte.

Bei der Bakteriopheophytin-induzierten Photooxidation von  $\beta$ -Carotin in Aceton wurden als Hauptprodukte außer 5,8-Endoperoxy- $\beta$ -Carotin noch 7,10-Endoperoxy- $\beta$ -Carotin, 7,10,5',8'-Diendoperoxy- $\beta$ -Carotin, und 5,8,5',8'-Diendoperoxy- $\beta$ -Carotin nachgewiesen (Fiedor *et al.*, 2001; Fiedor *et al.*, 2005). Die Stereochemie des Hauptprodukts 5,8-Endoperoxy- $\beta$ -Carotin wurde bereits aufgeklärt (Fiedor *et al.*, 2005).

In Lipoproteinen generierte Oxidationsprodukte von endogenem  $\beta$ -Carotin in wurden bisher (nach meinem Wissen) in der Literatur nicht beschrieben. Alle Veröffentlichungen in diesem Zusammenhang beschränken sich auf Oxidationsprodukte von  $\beta$ -Carotin in Lösungsmitteln oder Mizellen, induziert durch Belichtung eines  $O_2(^1\Delta_g)$ -produzierenden Photosensibilisators. Bei allen Untersuchungen bezüglich einer eventuellen antioxidativen Wirkung von  $\beta$ -Carotin oder anderen Carotinoiden sollte daher außer der physikalischen (siehe Abb. 3-115), auch die chemische Schutzfunktion dieser Pigmente beachtet werden.

Für einen effektiven, d. h. lang anhaltenden Schutz der Carotinoide gegenüber  $O_2(^1\Delta_g)$  darf jedoch das chemische Quenchen gegenüber dem physikalischen Quenchen nur eine relativ unbedeutende Nebenreaktion darstellen (Edge *et al.*, 1997). Oft kommt es zu praktisch keiner Bildung von  $\beta$ -Carotin-Oxidationsprodukten, obwohl jedes einzelne  $\beta$ -Carotin-Molekül mehrere Hundert  $O_2(^1\Delta_g)$ -Moleküle physikalisch gequencht haben muss (Foote und Denny, 1968b). Bei den chemischen Reaktionen entstehen allerdings stets Moleküle mit diversen Sauerstoff-Funktionen, deren Toxizität bisher noch nicht untersucht wurde.

Ähnlich Ergebnisse zeigten sich bei mit Pd-BPheid *a* inkubierten Lipoproteinproben. Bei diesen konnten nach Belichtung sogar vier Oxidationsprodukte nachgewiesen werden (Abb. 3-119). Außer dem bereits in den Proben mit Zn-BPheid *a* gefundenen Produkt mit einer Retentionszeit von 22,7 min (4) eluierten drei weitere Produkte mit Retentionszeiten von 19,0 min (1), 20,6 min (2), und 21,0 min. (3).

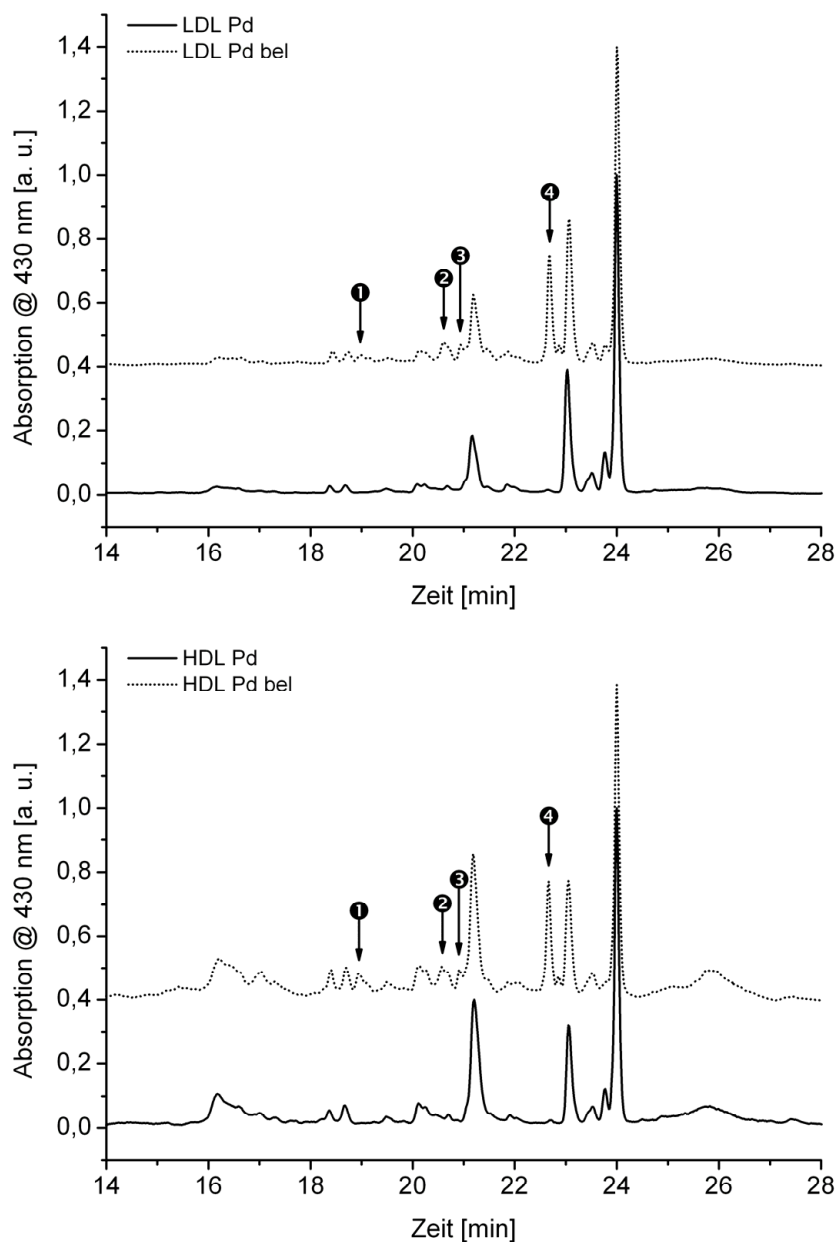


Abb. 3-119: HPLC-Chromatogramme der extrahierten Carotinoide von mit Pd-BPheid *a* inkubierten LDL- (oben) und HDL-Proben (unten) vor und nach Belichtung (bel). Gradientenprogramm: LP. Die Beschriftungen und Pfeile kennzeichnen die vier nachweisbaren Oxidationsprodukte: 1 @ 19,0 min; 2 @ 20,6 min; 3 @ 21,0 min; 4 @ 22,7 min. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden den Chromatogrammen der belichteten Proben 0,4 Einheiten hinzuaddiert.

Nicht nur die Retentionszeit, auch das Absorptionsspektrum des Produkts ④ war identisch mit dem des Produkts, das in belichteten Proben mit Zn-BPheid a gefundenen worden war (Abb. 3-120). Das Produkt ① besaß ein nahezu identisches Absorptionsspektrum mit Maxima bei 430 und 455 nm, und einer Schulter bei ~409 nm.

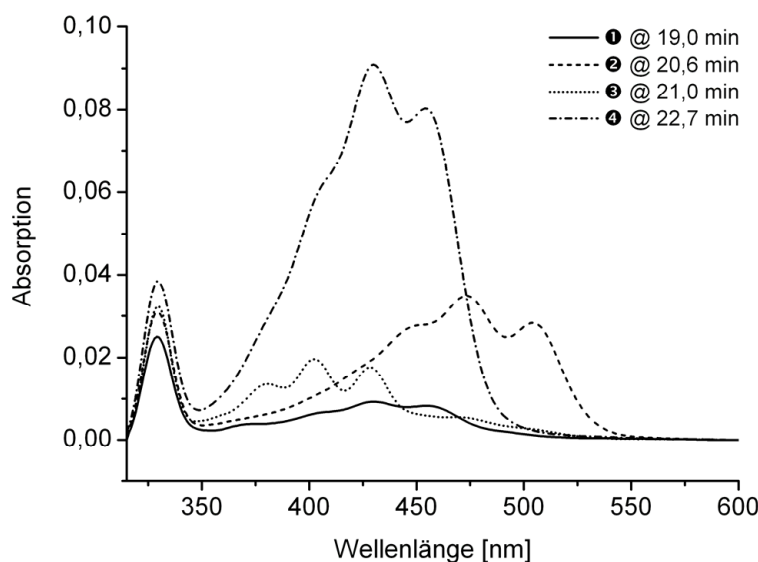


Abb. 3-120: Absorptionsspektrum der nach Belichtung einer mit Pd-BPheid a inkubierten LDL-Probe mittels HPLC-Analysen (siehe Abb. 3-119) gefundenen vier Oxidationsprodukte.

Das Absorptionsspektrum des Produkts ② mit Maxima bei 473 und 504 nm, und einer Schulter bei ~453 nm, ähnelt sehr dem Spektrum von Lycopin, welches Maxima bei 449, 473, und 504 nm aufweist (ohne Abb.). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesem Produkt um ein Lycopin-Oxidationsprodukt handelte, bei dem das  $\pi$ -Elektronensystems in voller Länge erhalten blieb.

Das Absorptionsspektrum des Produkts ③ mit Maxima bei 381, 402, und 428 nm, ähnelt sehr dem Spektrum von  $\zeta$ -Carotin (7,8,7',8'-Tetrahydro- $\psi$ , $\psi$ -Carotin), welches Maxima bei 378, 400–402, und 426 nm aufweist (Khachik *et al.*, 1997; Carotenoids Handbook, 2004). Bei diesem Produkt handelte es sich möglicherweise um 5,8,5',8'-Diendoperoxy-5,8,5',8'-tetrahydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin (Abb. 3-118), das wie 5,8-Endoperoxy-5,8-dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin bereits in einer Veröffentlichung als Produkt der Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit  $O_2(^1\Delta_g)$  beschrieben wurde (Fiedor *et al.*, 2005).

Ein direkter Vergleich zwischen den verschiedenen Lipoproteinproben ist äußerst schwierig, da die LDL-Proben etwa 3× mehr Carotinoide enthielten als die HDL-Proben, und andererseits die Photosensibilisatoren in den HDL-Proben deutlich höher konzentriert waren als in den LDL-Proben. In HDL-Proben waren folglich Carotinoide in der Umgebung der Pigmente seltener, jedoch wurden mehr ROS gebildet.

Die relative Zunahme der Carotinoid-Oxidationsprodukte (Normierung der Chromatogramme auf den  $\beta$ -Carotin-Peak) war bei den LDL- und HDL-Proben sehr ähnlich, nur das Produkt ① wies in den beiden LDL-Proben etwas niedrigere Werte als in den beiden entsprechenden HDL-Proben auf (Abb. 3-121). Diese äußerst geringen Unterschiede sind jedoch in Anbetracht der unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse wahrscheinlich nicht signifikant.

Für die folgende quantitative Auswertung wird davon ausgegangen, dass die vier gebildeten Oxidationsprodukte einen identischen Absorptionskoeffizienten besitzen. Das Produkt ④ stellte in den allen Proben das Hauptprodukt dar (62–72% an der Gesamtmenge aller Produkte). Die übrigen drei Produkte waren stets in deutlich geringen Mengen vorhanden (①: 6–15%, ②: 13–17%, ③: 4–11% an der Gesamtmenge aller Produkte).

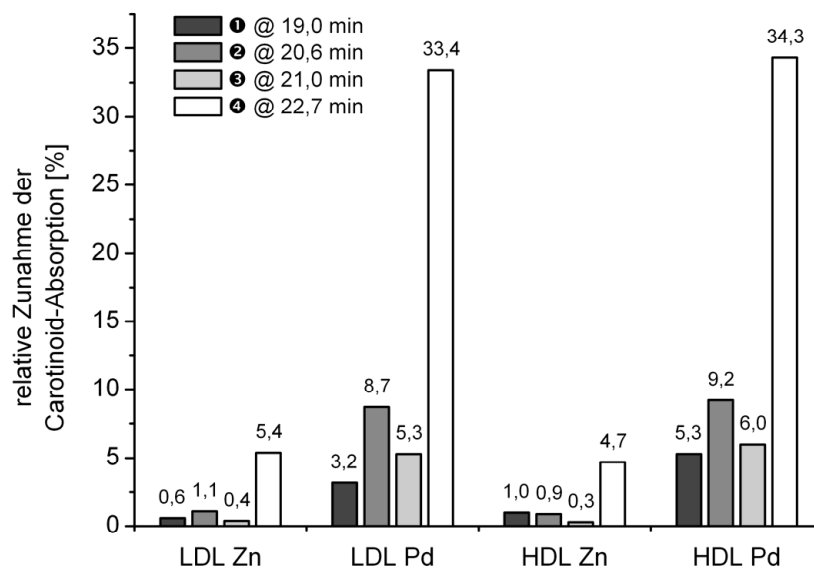


Abb. 3-121: Relative Zunahme der Carotinoid-Absorption in Prozent. Dargestellt ist die Zunahme der Carotinoid-Absorption bei 430 nm im Vergleich vor und nach Belichtung. In den dafür verwendeten Chromatogrammen wurde jeweils der  $\beta$ -Carotin-Peak bei 430 nm auf 100% normiert.

Mengenmäßig wurden natürlich in den Proben mit Zn-BPheid *a* deutlich weniger Carotinoid-Oxidationsprodukte erzeugt als in den entsprechenden Proben mit Pd-BPheid *a*, was auf die viel geringere Stabilität des Zn-BPheid *a* im Vergleich zu Pd-BPheid *a* zurückzuführen ist. Durch die dadurch bedingte deutlich geringere ROS-Entstehung erreichte die Konzentration an photoinduzierten Carotinoiden in den Proben mit Zn-BPheid *a* nur 5–20% im Vergleich zu den Proben mit Pd-BPheid *a*.

### 3.13 Photostabilität von BChl *a* in organischen Lösungsmitteln

Die Stabilität von Tetrapyrrolen in organischen Lösungsmitteln gegenüber photoinduzierter Bleichung ist stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängig (Marsh und Connolly, 1984; Limantara *et al.*, 2006). Eine Abhängigkeit der Stabilität von bestimmten physiko-chemischen Eigenschaften des dabei verwendeten Lösungsmittels konnte jedoch bisher nicht gefunden werden. Es wurden daher weitere Experimente zu diesem Thema durchgeführt, um eine evtl. vorhandene derartige Gesetzmäßigkeit nachweisen zu können, die wahrscheinlich auch für die Interpretation der Ergebnisse in wässrigen Systemen relevant wäre.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde (noch) angenommen, dass die Polarität des verwendeten Lösungsmittels großen Einfluss auf die Photostabilität besitzt. Eine Quantifizierung der Lösungsmittelpolarität ist allerdings sehr schwierig, da die Polarität nicht eindeutig durch eine einzige Zahl (z. B. die Dielektrizitätskonstante) definiert ist.

Sowohl experimentell, wie auch mittels theoretischer Berechnungen konnte bisher noch kein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen dem elektrischen Dipolmoment eines Lösungsmittels, und der beobachteten Solvatochromie eines in diesem Lösungsmittel gelösten Farbstoffes gefunden werden. Daher erfolgte die Quantifizierung der Lösungsmittelpolarität wiederholt mittels empirischer Messungen. Die umfangreichste Datenbank dazu wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Christian Reichardt (Universität Marburg) erstellt (Katritzky *et al.*, 2004).

Sie beruht auf der negativen Solvatochromie des Pyridinium-*N*-phenolat-Betainfarbstoffs 2,6-Diphenyl-4-(2,4,6-triphenylpyridinium-1-yl)phenolat (Abb. 3-122, links), welche auf Grund des sehr großen Dipolmoments des Farbstoffes im Grundzustand äußerst ausgeprägt ist.

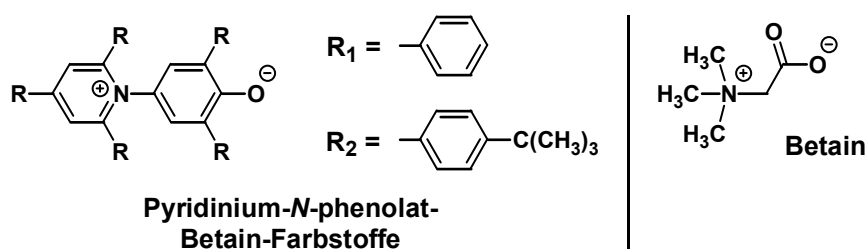


Abb. 3-122: Chemische Struktur von 2,6-Diphenyl-4-(2,4,6-triphenylpyridinium-1-yl)phenolat (links), auf welchem die  $E_T^N$ -Skala zur Quantifizierung der Lösungsmittelpolarität basiert, und von Betain (rechts). Der Standard-Farbstoff besitzt fünf Phenyl-Reste ( $R_1$ ), bei besonders unpolaren Lösungsmitteln (z. B. TMS, *n*-Hexan) kommt ein Farbstoff-Derivat mit fünf *tert*-Butyl-substituierten Phenyl-Resten ( $R_2$ ) zur Anwendung, dessen elektronische Übergangsenergien in  $E_T^N$ -Werte des Standard-Farbstoffs umgerechnet werden können.

Das Dipolmoment kommt durch die Betain-ähnliche Struktur zustande (Abb. 3-122, rechts), bei der sich im Gegensatz zu vielen anderen Zwitterionen (z. B. Aminosäuren) die positive und die negative Ladung nicht durch eine Protonenumlagerung neutralisieren können. Die Absorptionsbande dieses Farbstoffs, welche einen sog. *charge-transfer*-Übergang darstellt, besitzt in Diphenylether ein Maximum bei 810 nm, in Wasser dagegen bei nur 453 nm (Reichardt, 1965). Aufgrund dieser extremen hypsochromen Verschiebung (357 nm!) beim Übergang zu einem polarerem Lösungsmittel spricht man von einer negativen Solvatochromie. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Einheit zur Quantifizierung der Lösungsmittelpolarität ist  $E_T^N$ , die *normalisierte elektronische Übergangsenergie* (Reichardt, 1994; Reichardt, 2007). Für diese dimensionslose Einheit wurde die elektrische Übergangsenergie von Tetramethylsilan (TMS) als 0, die von Wasser als 1 definiert.

Die Photostabilität von BChl *a* in wurde in den 16 in unserem Labor gängigsten organischen Lösungsmitteln für Pigment-Synthesen und -Analytik untersucht. Alle Messungen erfolgten in gasdicht verschlossenen Küvetten, um eine verdunstungsbedingte Konzentrationserhöhung des BChl *a* zu verhindern. Diese würde bei den Lösungsmitteln mit hohem Dampfdruck eine erhöhte Photostabilität vortäuschen. Die Polarität der 16 Lösungsmittel gemäß der  $E_T^N$ -Skala variierte zwischen 0,009 (n-Hexan) und 0,762 (Methanol) (Abb. 3-123).

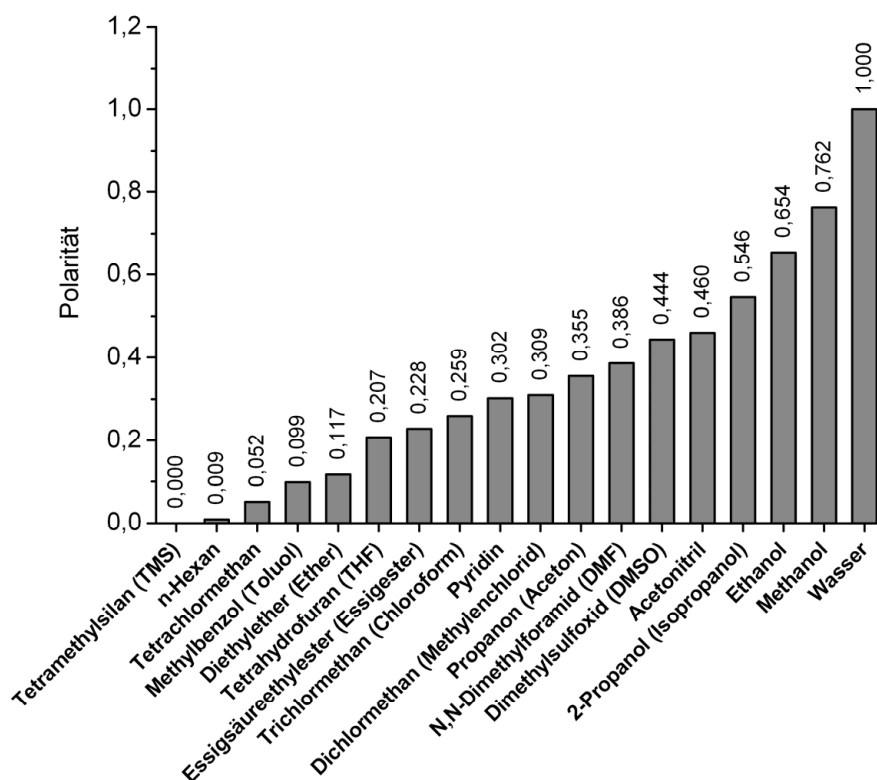


Abb. 3-123: Polarität der verwendeten organischen Lösungsmittel gemäß der  $E_T^N$ -Skala (Reichardt, 1994). Definitionen: Tetramethylsilan (TMS) = 0,000; Wasser = 1,000.

Es zeigte sich jedoch bei Belichtung kein Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels und der Photostabilität des gelösten BChl *a* (Abb. 3-124).

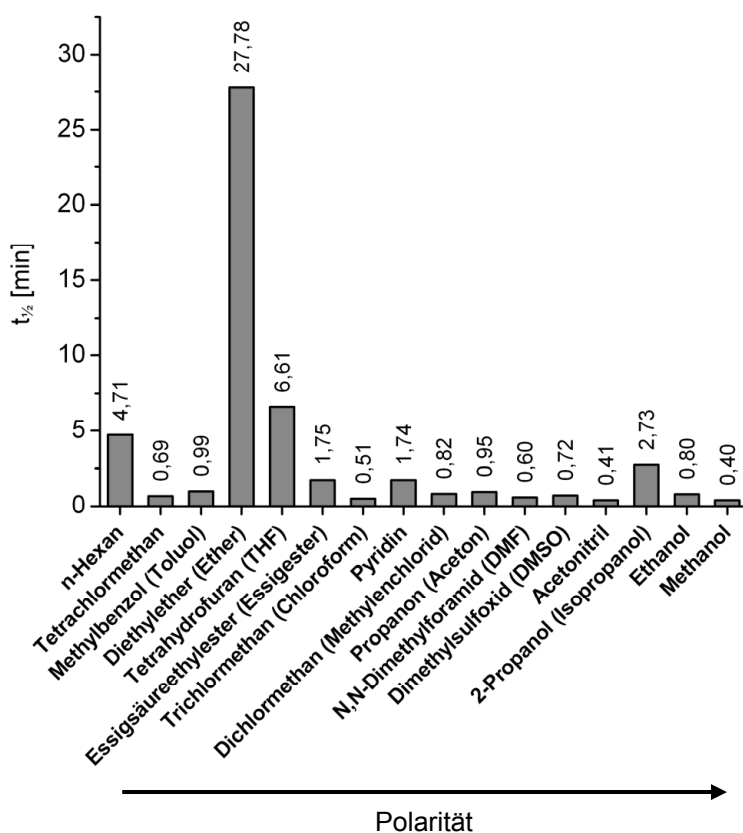


Abb. 3-124: Halbwertszeiten von BChl *a* in verschiedenen Lösungsmitteln bei Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695).  $A_{\text{Start}}$ : 1,0. Die LM sind gemäß ihrer Polarität nach der  $E_{\text{T}}^{\text{N}}$ -Skala angeordnet (siehe Abb. 3-123).

Auffallend war die ungewöhnlich hohe Photostabilität in Diethylether. Da auch der cyclische Ether Tetrahydrofuran (THF) eine deutliche Erhöhung der Photostabilität bewirkte, ist wohl im Wesentlichen die Ether-Gruppierung für diesen Effekt verantwortlich. Eine ebenfalls sehr hohe Photostabilität wurde in 1,4-Dioxan beobachtet (Marsh und Connolly, 1984). Von den anderen Lösungsmitteln besaßen nur noch n-Hexan und 2-Propanol die Fähigkeit, die photoinduzierte Bleichung von BChl *a* merklich zu verlangsamen. In geringerem Ausmaß galt dies auch für Essigsäureethylester (Essigester) und Pyridin. Besonders schnell dagegen erfolgte die Bleichung von BChl *a* in Acetonitril und Methanol.

Die Ergebnisse für Toluol, THF, Pyridin, Aceton, 2-Propanol, Ethanol, und Methanol waren weitgehend identisch (Abweichung  $<3\%$ ) mit einer zu einem früheren Zeitpunkt in unserem Labor durchgeführten Testreihe (Limantara *et al.*, 2006). Für die übrigen Lösungsmittel existierten noch keine Vergleichswerte.



Eine Erklärung für die oben gezeigten Ergebnisse konnte auch nach Auswertung dieser umfangreichen Studie nicht gefunden werden. Alle verfügbaren physiko-chemischen Eigenschaften der Lösungsmittel, z. B. die  $O_2(^1\Delta_g)$ -Lebenszeit (Abb. 3-125), zeigten keinen Trend-Verlauf, der im Einklang mit den oben genannten Werten stehen würde. Die  $O_2(^1\Delta_g)$ -Lebenszeiten wurden in den meisten Fällen aus mehreren Werten gemittelt (Wilkinson *et al.*, 1995). Ebenfalls berücksichtigt wurden die Dielektrizitätskonstante, das Dipolmoment, die Viskosität, und der Brechungsindex der Lösungsmittel (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2008). Wahrscheinlich handelt es sich deshalb um eine Kombination aus mehreren physikalischen und chemischen Eigenschaften der Lösungsmittel. Vor allem letztere sind nur schwer abschätzbar, da einige Lösungsmittel z. B. als ROS-Quencher fungieren könnten.

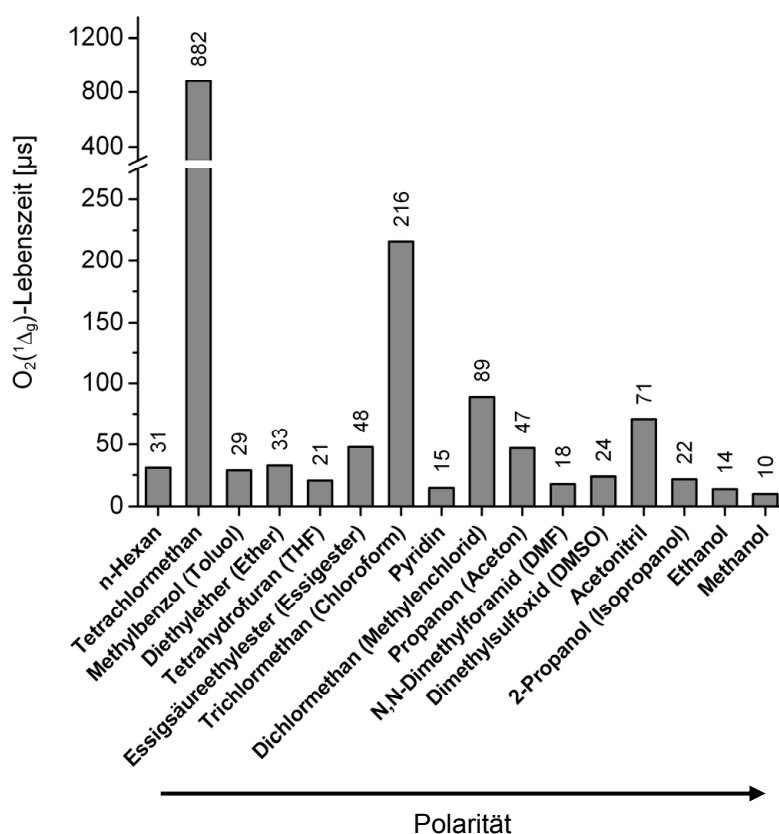


Abb. 3-125: Lebenszeiten von  $O_2(^1\Delta_g)$  in verschiedenen Lösungsmitteln (Wilkinson *et al.*, 1995). Für Tetrachlormethan ( $CCl_4$ ) werden auch Lebenszeiten von über 30 ms angegeben. Die LM sind gemäß ihrer Polarität nach der  $E_T^N$ -Skala angeordnet (siehe Abb. 3-123).

Auch für die exakte Position des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums von BChl *a* in den getesteten Lösungsmitteln (Abb. 3-126) konnte kein Zusammenhang mit einer physiko-chemischen Eigenschaft des Lösungsmittels gefunden werden. Es ist eine Korrelation mit dem Faktor  $(n^2-1)/(n^2+2)$  postuliert worden, wobei  $n$  für den Brechungsindex des Lösungsmittels steht (Limantara *et al.*, 1997). Jedoch wurden auch etliche Ausnahmen zu dieser Regel gefunden.

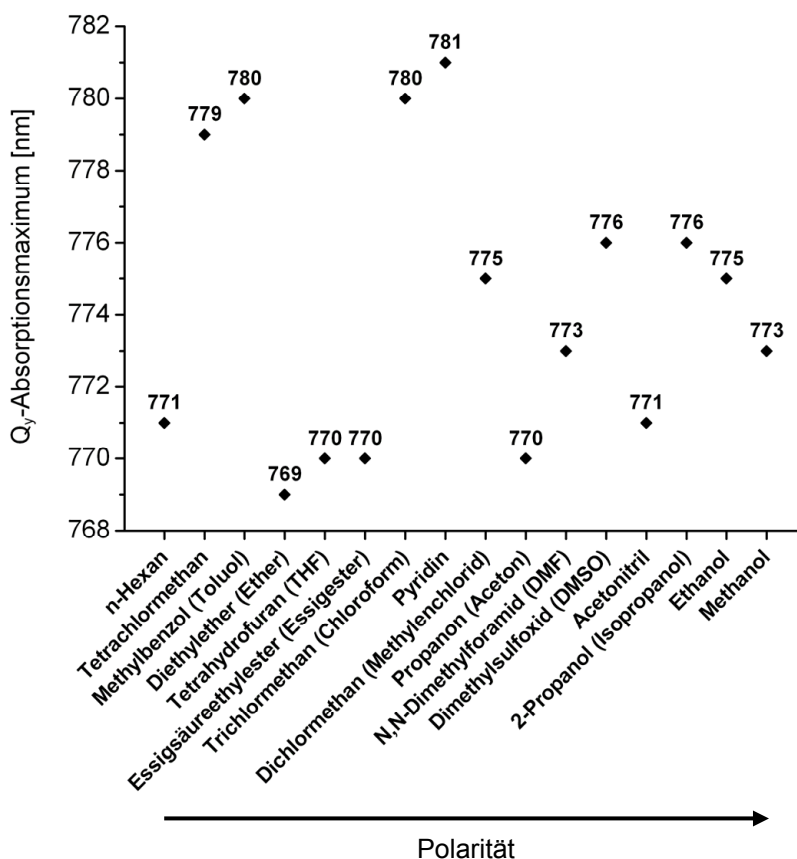


Abb. 3-126: Positionen der Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaxima von BChl a in verschiedenen Lösungsmitteln. Die LM sind gemäß ihrer Polarität nach der  $E_T^N$ -Skala angeordnet (siehe Abb. 3-123).

Ein wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist die Koordinationszahl des zentralen Mg-Atoms. Bei 6-facher Koordination interagiert dieses stärker mit den Stickstoffen der Pyrrolringe. Dadurch wird das  $a_{2u}$ -Orbital, das Elektronendichten an allen vier Stickstoffen aufweist (siehe Anhang B), sehr stark beeinflusst (Callahan und Cotton, 1987). Die beiden  $e_g$ -Orbitale, die Elektronendichten an lediglich zwei Stickstoffen aufweisen, werden folglich eher gering beeinflusst, das  $a_{1u}$ -Orbital, das keine Elektronendichte an den Stickstoffen aufweist, bleibt energetisch unverändert. Dadurch lassen sich einige der beobachteten Absorptionsmaxima-Verschiebungen in unterschiedlich koordinierenden Lösungsmitteln erklären.

Ein wesentlicher Aspekt scheint dabei die *koordinative Ungesättigkeit* des Mg-Zentralmetalls zu sein: Das zentrale Mg-Atom versucht sich durch Anlagerung eines geeigneten 5. oder sogar 6. Liganden koordinativ abzusättigen (Brereton und Sanders, 1983). BChl a bildet in feuchtem Benzol Dimere, in z. B. Aceton und Diethylether liegt es als 5-fach koordiniertes Monomer mit einem gebundenen Solvens-Molekül, und in Pyridin, THF und allen primären Alkoholen (selbst bei 1-Decanol) als 6-fach koordiniertes Monomer mit zwei gebundenen Solvens-Molekülen vor (Connolly *et al.*, 1982; Brereton und Sanders, 1983; Koyama und Limantara, 1998).

Einen Spezialfall stellt 2-Propanol (Isopropanol) dar, das BChl *a* im Grundzustand 5-fach, das Radikalkation des BChl *a* dagegen 6-fach koordiniert (Koyama und Limantara, 1998).

### 3.14 Reaktionsmechanismus in Lösungsmitteln

#### 3.14.1 Effekte von ROS-Quenchern

Auch in Lösungsmitteln ist es möglich, durch Zusatz von geeigneten Quenchern zwischen ROS-Reaktionen des Typs I und des Typs II zu unterscheiden. Die Effizienz der Quencher kann anhand des Rückgangs an Pigmentbleichung bestimmt werden.

Als Quencher für Reaktionen des Typs I kam 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol zum Einsatz. Dieses Phenol-Derivat kann die Autooxidationskette terminieren, da es mit Radikalen relativ unreaktive, da gut mesomeriestabilisierte Phenoxyradikale bildet. Diese Verbindung, die auf Grund ihrer antioxidativen Wirkung auch als Lebensmittelzusatzstoff (*E* 321) Verwendung gefunden hat, ist bekannter unter dem Namen Butylhydroxytoluol (BHT).

Als Quencher für Reaktionen des Typs II wurde 1,4-Diaza-bicyclo[2.2.2]octan (DABCO) verwendet, das durch einen Elektronentransfer-Prozess Singulett-Sauerstoff unter Abgabe von Wärme wieder in Triplett-Sauerstoff zurückführen kann. Die Fähigkeit von DABCO,  $O_2(^1\Delta_g)$  zu quenchen, ist besonders stark ausgeprägt, da es ein tertiäres Amin darstellt (Young *et al.*, 1973; Monroe, 1977; Clennan *et al.*, 1989). Diese wurde bereits 1968 einem reversiblen Ladungstransfer (charge transfer process) zugeschrieben (Ouannes und Wilson, 1968). Im Rahmen dieses Ladungstransfers wird ein *Exciplex* (*excited complex*) gebildet, der formal eine Mischung aus einem dezentral angeregten Singulettzustand [ $^1(O_2(^1\Delta_g)\cdots Q)$ ], und einem Radikationenpaar im Singulettzustand [ $^1(O_2^{\bullet e}\cdots Q^{\bullet \oplus})$ ] darstellt (Darmanyan *et al.*, 1998). Dieser Exciplex wandelt sich in einen Komplex im Triplettzustand um [ $^3(O_2^{\delta-}\cdots Q^{\delta+})$ ], wodurch die Energie des  $O_2(^1\Delta_g)$  vernichtet wird. Auch die Wechselwirkungen von Chlorophyllen und verwandten Molekülen mit  $O_2(^1\Delta_g)$  finden wohl durch einen Exciplex-artigen Übergangszustand statt (Tanielian und Wolff, 1988).

Bei Belichtung von BChl *a* in Aceton betrug die Halbwertszeit des Pigments unter den gewählten Rahmenbedingungen ~55 Sekunden (Abb. 3-127). Mit 50 mM BHT erhöhte sich die Halbwertszeit geringfügig auf ~84 Sekunden (+53%), mit 0,5 M BHT auf ~121 Sekunden (+120%). Mit 50 mM DABCO erhöhte sich die Halbwertszeit dagegen deutlich auf ~301 Sekunden (+447%), mit 0,5 M DABCO sogar auf ~529 Sekunden (+862%).

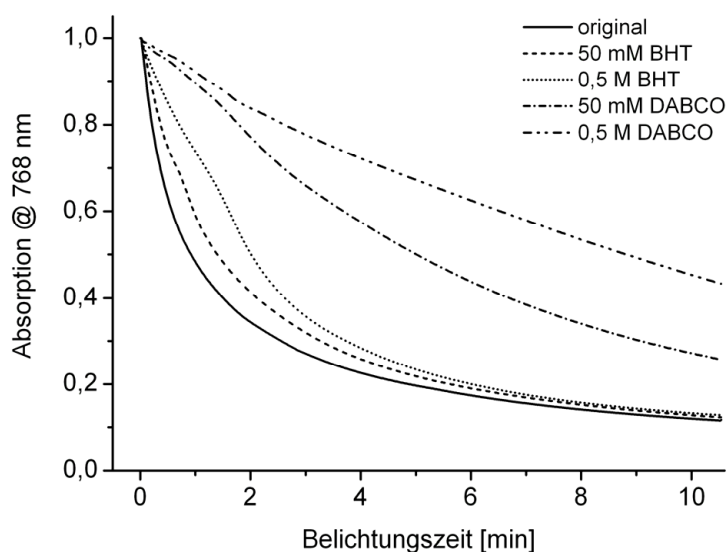


Abb. 3-127: Belichtungskinetiken von BChl *a* in Aceton bei Zusatz von ROS-Quenchern. Dargestellt ist  $A_{768}$  des BChl *a* während der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Als Quencher wurden BHT (Typ I) und DABCO (Typ II) verwendet (Endkonzentrationen siehe Legende).

Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den gebildeten ROS überwiegend um Singulett-Sauerstoff handelte. Der geringfügige Rückgang an Pigmentbleichung bei Zusatz von BHT ist deutlich schwerer zu interpretieren. Er könnte bedeuten, dass bei Belichtung auch Radikale in relativ geringen Mengen gebildet werden. Jedoch kann BHT außer mit Hydroxyl- und Peroxyl-Radikalen auch mit  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  reagieren (Thomas und Foote, 1978; Lambert *et al.*, 1996b). Dabei kann es sowohl zu einem physikalischen, wie auch zu einem chemischen Quenchen kommen. Als Oxidationsprodukt des BHT entsteht das 4-Hydroperoxid-Derivat, das eine Chinon-ähnliche Struktur aufweist.

Bei allen Belichtungskinetiken mit zugesetzten Quenchern war in den ersten  $\sim 1,5$  Minuten eine im Vergleich zum weiteren Verlauf der Kinetik geringfügig erhöhte Stabilität des Pigments erkennbar, deren Ursache nicht geklärt werden konnte.

Bei Belichtung von BChl *a* in Methanol betrug die Halbwertszeit des Pigments unter den gewählten Rahmenbedingungen lediglich  $\sim 14$  Sekunden (Abb. 3-128). Mit 50 mM BHT erhöhte sich die Halbwertszeit auf  $\sim 22$  Sekunden (+57%), mit 0,5 M BHT auf  $\sim 28$  Sekunden (+100%). Mit 50 mM DABCO erhöhte sich die Halbwertszeit auf  $\sim 25$  Sekunden (+79%), mit 0,5 M DABCO auf  $\sim 39$  Sekunden (+179%). Es sind damit ähnliche Trends erkennbar wie bei Belichtung in Aceton (vgl. Abb. 3-127), jedoch ist bedingt durch die kurzen Halbwertszeiten ein deutlich größerer Fehler bei diesen Messungen vorhanden.

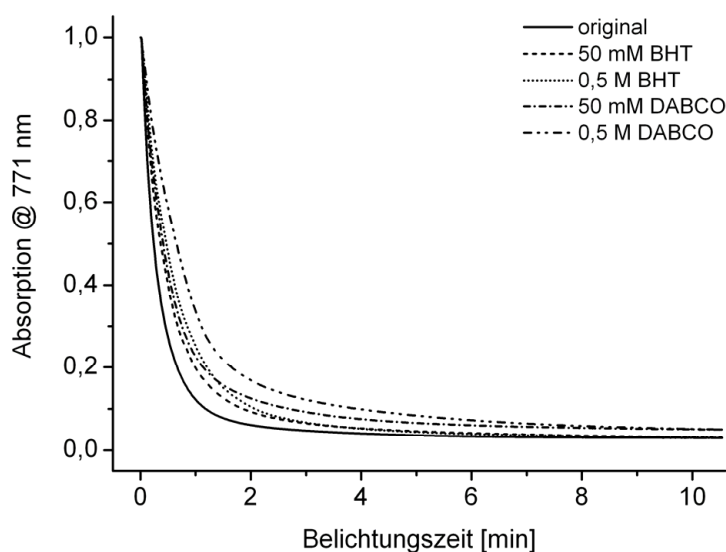


Abb. 3-128: Belichtungskinetiken von BChl a in Methanol bei Zusatz von ROS-Quenchern. Dargestellt ist  $A_{771}$  des BChl a während der Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 64 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Als Quencher wurden BHT (Typ I) und DABCO (Typ II) verwendet (Endkonzentrationen siehe Legende).

### 3.14.2 Analyse photoinduzierter Cholesterin-Oxidationsprodukte

Auch in den meisten Lösungsmitteln wurden bei Belichtung einer Mischung aus Cholesterin und Pd-BPheid a (WST09) relativ große Mengen an Cholesterin-Hydroperoxiden gebildet (Abb. 3-129). Für diese Experimente wurden die 16 Lösungsmittel verwendet, die bereits im Rahmen der Messreihe zur Pigmentstabilität (siehe Kapitel 3.13) ausgewählt worden waren.

Das einzige Lösungsmittel, in dem keine Hydroperoxide nachweisbar waren, war Dimethylsulfoxid (DMSO). Da DMSO ein bekannter Quencher für ROS-Reaktionen des Typs I ist, könnte dies auf eine Beteiligung von Radikalen bei der Erzeugung der OOH-Cholesterine in DMSO hindeuten. Des Weiteren musste festgestellt werden, dass DMSO die TMPD-Färbung vollständig verhinderte, wie deutlich anhand der beiden weißen Flecken im Bereich der DMSO-Auftragstelle ersichtlich ist.

Relativ unbekannt ist jedoch, dass DMSO auch mit  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  reagieren kann. So wird 1% (v/v) DMSO in einer methanolischen Bengalrosa-Lösung durch photoinduzierten  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  zu Dimethylsulfon ( $\text{DMSO}_2$ ) oxidiert (Mali *et al.*, 1994). Auch in einer Bengalrosa-Lösung in reinem DMSO findet die gleiche Reaktion statt, die nachweislich Licht benötigt, sowie Sauerstoff verbraucht (Schenck und Krauch, 1963; Mali *et al.*, 1994).

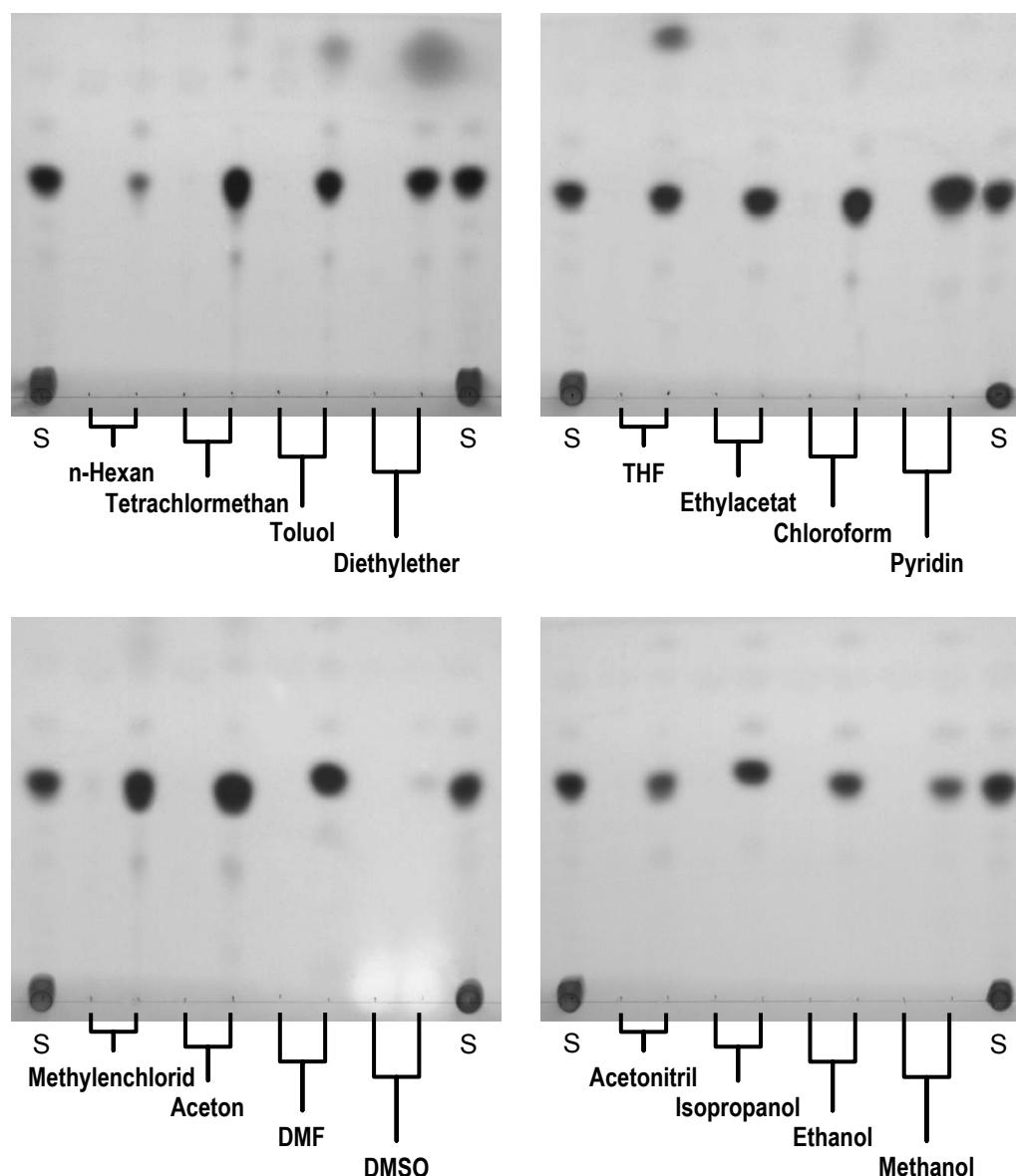


Abb. 3-129: HPTLC-Analysen belichteter Mischungen aus Cholesterin und Pd-BPheid a (WST09) in verschiedenen Lösungsmitteln (TMPD-Färbung). Bei der jeweils linken Spur handelte es sich um eine unbelichtete Kontrolle, bei der jeweils rechten Spur um eine 60 min belichtete Probe. Cholesterin-Konzentration: 5 mg/ml.  $A_{\text{Start}}$  (Pd-BPheid a): 1,0. S:  $5\alpha$ -OOH-Chol-Standard.

Außer Bengalrosa initiieren noch etliche weitere Farbstoffe bei Belichtung diese Reaktion, unter anderem Chlorophyll (Schenck und Krauch, 1963). Es ist daher eher davon auszugehen, dass DMSO im vorliegenden Fall als  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quencher fungierte.

Bestätigt wurde diese Annahme von der Tatsache, dass in fast allen Lösungsmitteln das entstehende OOH-Cholesterin anhand des Standards eindeutig als  $5\alpha$ -Derivat identifiziert werden konnte. Da sich die Retentionszeit der  $7\text{-OOH-Cholesterine}$  nur geringfügig von der des  $5\alpha\text{-OOH-Cholesterins}$  unterscheidet (siehe Abb. 3-111), ist bei einigen Lösungsmitteln keine eindeutige Identifikation der OOH-Cholesterine möglich.

Auffallend ist ferner, dass im Falle des Toluols, des Diethylethers, und des Tetrahydrofurans jeweils eine weitere Peroxid-Bande mit deutlich größerem  $R_f$ -Wert entstand, bei der es sich möglicherweise um das entsprechende Peroxid dieses Lösungsmittels handelte.

Um den Oxidationsort (C5 oder C7) eindeutig zu identifizieren wurden die entstandenen OOH-Cholesterine durch Zugabe von Natriumborhydrid in methanolischer Lösung zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Im Falle des n-Hexans, welches mit Methanol nicht mischbar ist, wurde zuerst das Lösungsmittel im Argonstrom abgedampft. In 11 Fällen wurde nahezu ausschließlich das  $5\alpha$ -OH-Cholesterin gebildet (Abb. 3-130).

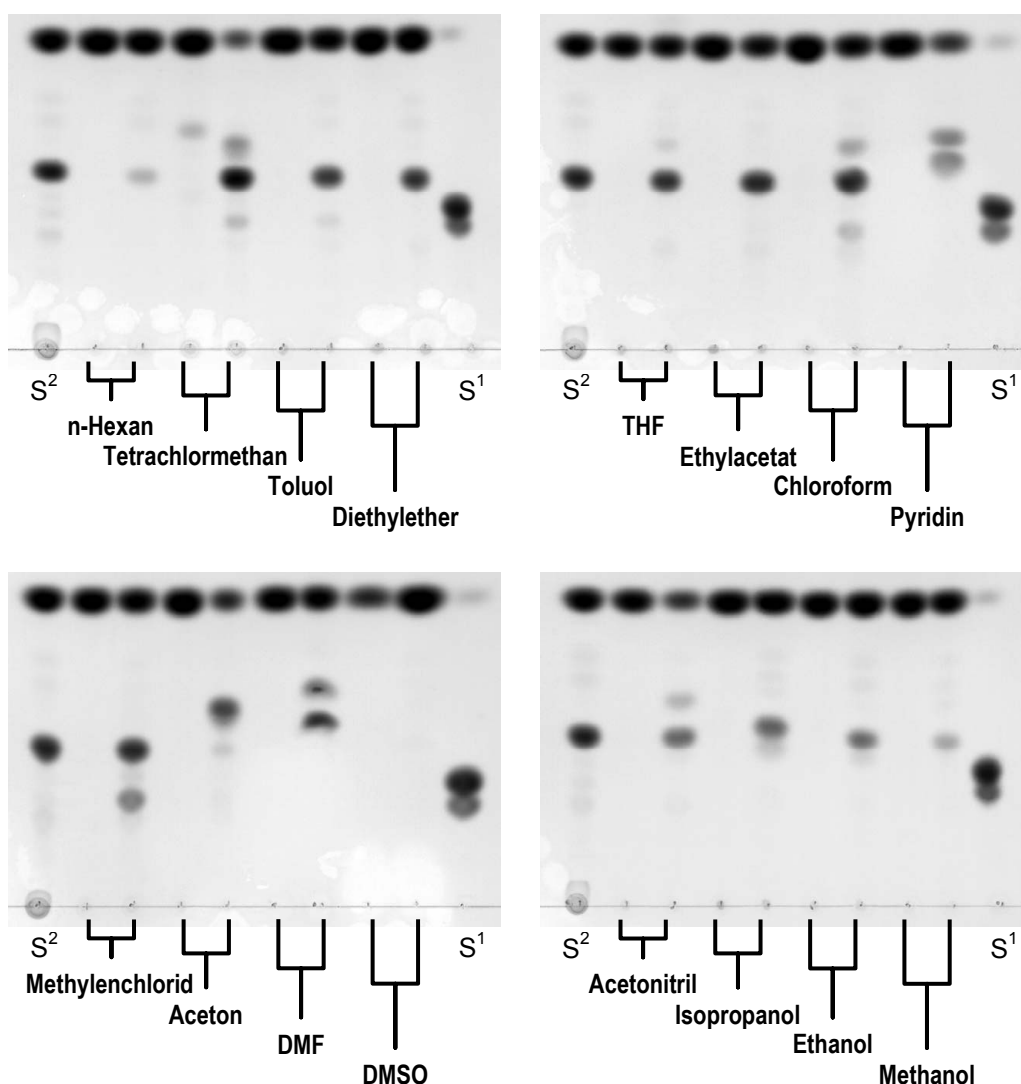


Abb. 3-130: HPTLC-Analysen belichteter Mischungen aus Cholesterin und Pd-BPheid a (WST09) in verschiedenen Lösungsmitteln nach chem. Reduktion ( $\text{CuSO}_4$ -Färbung). Bei der jeweils linken Spur handelte es sich um eine unbelichtete Kontrolle, bei der jeweils rechten Spur um eine 60 min belichtete Probe. Cholesterin-Konzentration: 5 mg/ml.  $A_{\text{Start}}$  (Pd-BPheid a): 1,0.  $S^1$ :  $7\alpha\beta$ -OH-Chol-Standard (Typ I);  $S^2$ :  $5\alpha$ -OH-Chol-Standard (Typ II).

Zum Teil entstanden weitere Produkte, bei denen es sich u. a. um das durch allylische Umlagerung entstandene 7 $\alpha$ -OH-Cholesterin gehandelt haben könnte (vgl. Abb. 3-110).

Ausnahmen bildeten die Oxidationsprodukte der Proben mit Pyridin, Aceton, DMF, und Isopropanol. Hier fanden sich Produkte mit einem erhöhten R<sub>f</sub>-Wert, die wahrscheinlich durch Reaktion des Lösungsmittels mit dem primären Oxidationsprodukt entstanden waren. Auch in diesen vier Fällen konnten keine 7-OH-Cholesterine nachgewiesen werden. In der DMSO-Probe färbten sich außer dem ursprünglich vorhandenen Cholesterin keine weiteren Lipide an. Dies bestätigt das Ergebnis der Hydroperoxid-Analytik (vgl. Abb. 3-129), dass keine Arten von OOH-Cholesterinen gebildet wurden. Ein klarer Hinweis auf die Beteiligung von Radikalen an der photosensibilisierten Oxidation von Cholesterin in Lösungsmitteln (hier: 7 $\beta$ -OH-Cholesterin als Hauptprodukt) konnte in keinem Fall entdeckt werden.

### 3.15 Photoinduzierte Oxidationsprodukte von BChl *a* in Aceton

Da auf Grund der geringen Gesamtmenge an Bakteriochlorinen in den Lipoprotein-Proben nur die Hauptbauprodukte, d. h. die entsprechenden 3Ac-Chlorin-Derivate nachweisbar waren, wurde versucht, durch Belichtung von BChl *a* in Lösungsmitteln auch photoinduzierte Oxidationsprodukte zu isolieren, die nur in geringer Konzentration entstehen. Mit einem nachträglichen Zusatz von Pigment in CES wäre nicht sicher zu klären gewesen, ob das Pigment vollständig in die Lipoproteine übertragen wird oder zumindest teilweise in zwei Kompartimenten (CES und Lipoproteine) vorliegt. Die bereits beschriebenen Experimente zur Neuverteilung der Pigmente in Lipoproteinen lassen dafür keine Rückschlüsse zu, da bei diesen mit weitaus geringeren Pigment-Konzentrationen gearbeitet wurde.

Bei allen Belichtungen betrug die Intensität der langwelligsten Absorptionsbande des BChl *a* (Q<sub>y</sub>: 769 nm) zu Beginn der Belichtung ~1,0. Die Belichtung wurde so lange durchgeführt, bis A<sub>769</sub> auf ~0,25 abgesunken war. Die Aceton-Lösung wurde dabei mit Luft begast und gerührt, um die Sauerstoff-Konzentration hoch und möglichst konstant zu halten. Bei Belichtung von BChl *a* in Aceton ist anhand der Absorptionsspektren nur die Bildung einer langwelligsten Absorptionsbande bei 676 nm erkennbar, die dem Q<sub>y</sub>-Absorptionsmaximum des 3Ac-Chl *a* entspricht (Abb. 3-131).

Nach Belichtung von BChl *a* in Aceton liegen nur ~15% des Pigments als Oxidationsprodukt 3Ac-Chl *a* vor, wenn bereits ~80% des BChl *a* gebleicht sind (Limantara *et al.*, 2006). Die verbleibenden ~65% des BChl *a* werden zu anderen Produkten oxidiert, die nahezu keine Absorption im VIS/NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums aufweisen.



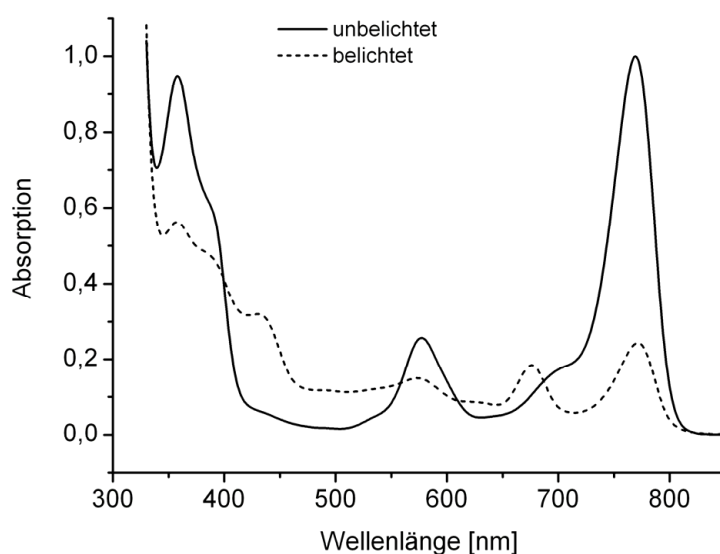


Abb. 3-131: Absorptionsspektren von BChl *a* in Aceton vor und nach 7-minütiger Belichtung (NIR-Lichtintensität:  $\sim 530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Filter: RG695). Die Lösung wurde während der Belichtung mit Luft begast und kräftig gerührt.

Durch eine Aufreinigung der nach Belichtung vorliegenden Pigmente mittels HPLC konnten einige im Vergleich zum Ausgangspigment BChl *a* sehr polare Verbindungen isoliert werden. Es wurde dazu ein HPLC-Programm verwendet, das bereits zu Beginn alle Moleküle mit einer dem Ausgangsprodukt BChl *a* ähnlichen Polarität entfernt. Diese vergleichsweise unpolaren Pigmente, deren Hauptkomponenten BChl *a/a'* und 3Ac-Chl *a/a'* waren, eluierten bereits im Ausschussvolumen der Säule nach knapp 1,4 min (Abb. 3-132).

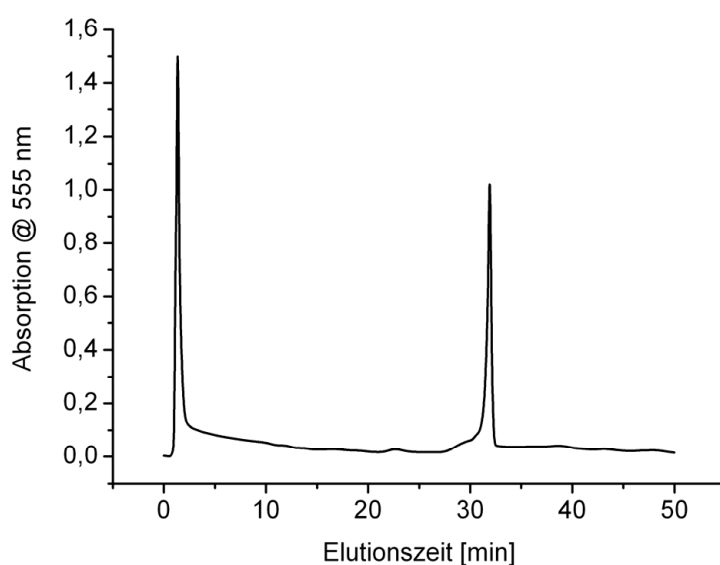


Abb. 3-132: 2D-Chromatogramm der Pigmenttrennung von BChl *a* und dessen photoinduzierten Derivaten nach Belichtung in Aceton (vgl. Abb. 3-131). Gradientenprogramm: NPC-UPP.

Erst bei einer viel höheren Polarität des Laufmittels eluierte nach 31,9 min eine zweite Substanz mit einer für nachfolgende Analysen ausreichenden Konzentration. Das Produkt bei 31,9 min besaß ein sehr ungewöhnliches Absorptionsspektrum, das keinerlei Ähnlichkeit mit einem typischen Bakteriochlorin-, Chlorin-, oder Porphyrin-Spektrum aufwies (Abb. 3-133). Es ähnelte vielmehr dem Spektrum eines Bilins, d. h. eines offenkettigen Tetrapyrrols. Dieses Produkt wird im Folgenden als *UPP* (*unbekanntes Photoprodukt*) bezeichnet.

Nach 24,1 min eluierte eine geringe Menge einer im Folgenden als *BPP* (*bekanntes Photoprodukt*) bezeichneten Komponente der Pigmentmischung, deren Absorptionsspektrum identisch war mit dem eines bereits beschriebenen Oxidationsprodukts des BChl *a* mit noch unbekannter Struktur (Limantara *et al.*, 2006: Produkt Nr. 6).

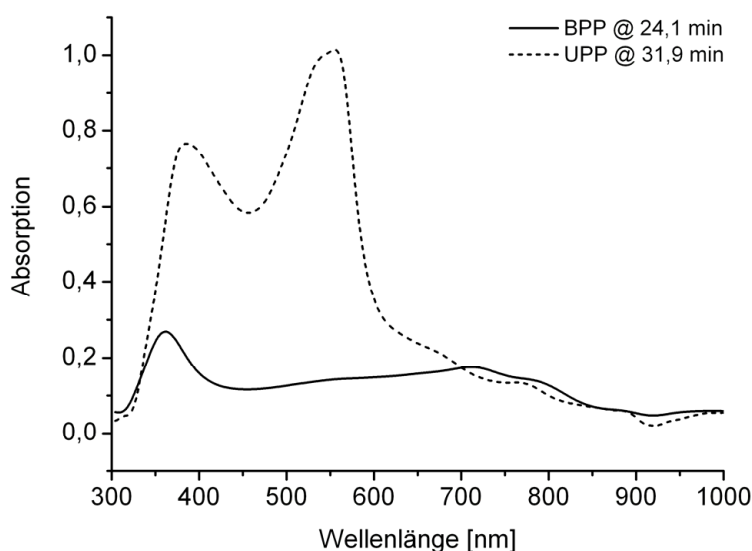


Abb. 3-133: Absorptionsspektren von BPP und UPP. Die Spektren wurden direkt aus dem während der HPLC aufgezeichneten 3D-Datensatz des DAD-Spektrophotometers entnommen. BPP @ 24,1 min; UPP @ 31,9 min.

Bei Bilinen kann durch Ansäuern ihrer methanolischen Lösung die Absorption intensiviert werden, zudem verschiebt sich das Absorptionsmaximum bathochrom. Beim *Phycoerythrobilin* (*PEB*) nimmt die Absorption bei Zusatz von HCl um rund 50% zu (Abb. 3-134, links), das Absorptionsmaximum verschiebt sich um 62 nm (528 → 590 nm). Dagegen verhält sich UPP bei Zusatz von HCl fast umgekehrt wie ein Bilin (Abb. 3-134, rechts). Eine Zuordnung der Banden ist nicht einfach, jedoch scheinen sich alle langwelligeren Absorptionsbanden hypsochrom zu verschieben (535 → 491 nm, 561 → 529 nm, 635 → 579 nm, 678 → 654 nm, 778 → 748 nm). Die Absorption nimmt nur bei den drei langwelligeren Maxima zu, bei den beiden kurzwelligeren Maxima nimmt sie dagegen ab.

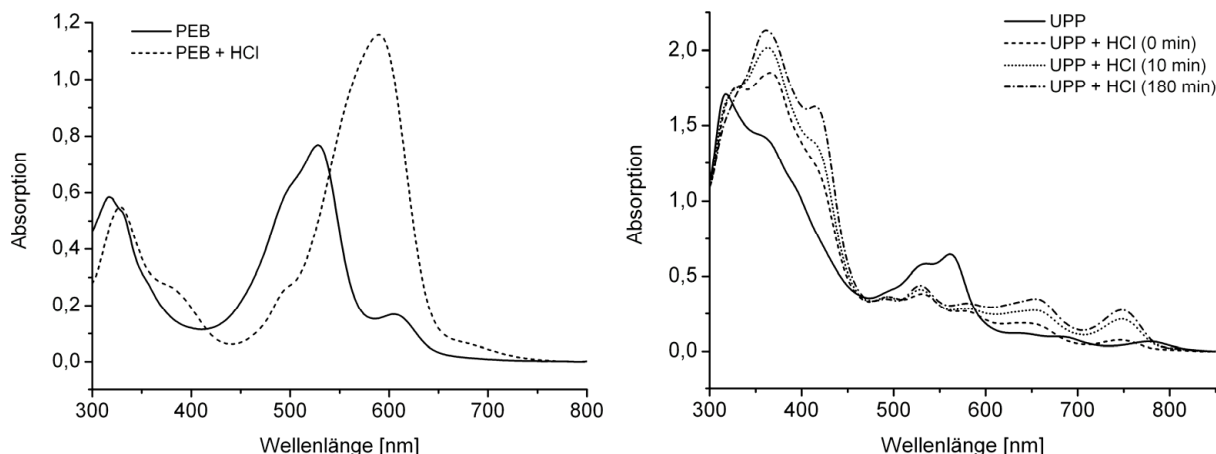


Abb. 3-134: Absorptionsspektren von PEB (links) und UPP (rechts) in Methanol vor und nach Anäuern der Lösung. Die HCl-Endkonzentration betrug in beiden Fällen jeweils 2,5% (v/v).

Das Massenspektrum des UPP zeigte jedoch, dass es sich nicht um eine Reinsubstanz handelte, sondern um eine etwa 1:1 Mischung zweier Komponenten mit einer Masse von 943,55 und 1017,58 Da (ohne Abb.). Auch im 3D-Chromatogramm der ersten Pigmentaufreinigung war bereits eine Unsymmetrie der Bande erkennbar gewesen, bei der es sich jedoch auch um ein Artefakt der Trennung gehandelt haben könnte. Daher wurde versucht, diese beiden UPP-Bestandteile durch eine nachfolgende zweite Auftrennung mittels HPLC voneinander zu trennen. Im Gegensatz zur ersten Aufreinigung wurde keine weitere Trennung an einer Säule mit normaler Phase (Si-Säule  $\Rightarrow$  NPC) versucht, sondern eine Säule mit reverse Phase ( $C_{18}$ -Säule  $\Rightarrow$  RPC) verwendet.

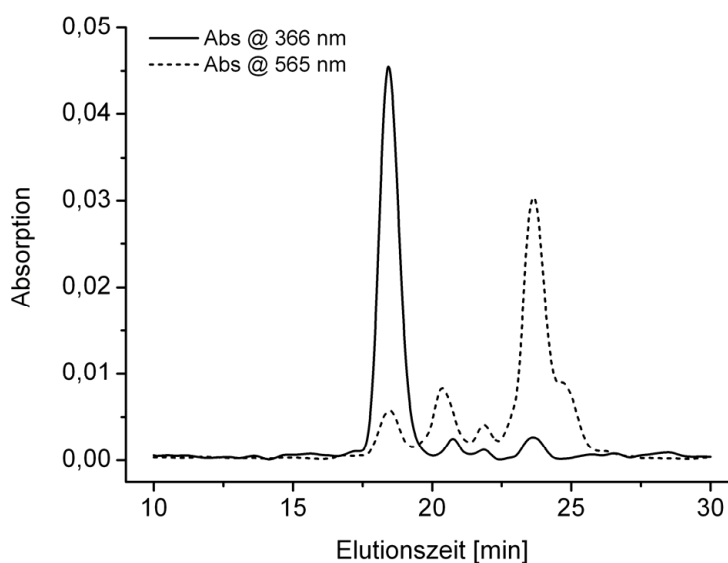


Abb. 3-135: 2D-Chromatogramm der Pigmenttrennung von UPP. Gradientenprogramm: RPC-UPP. UPP1 @ 18,4 min ( $A_{\max}$ : 366 nm); UPP2 @ 23,6 min ( $A_{\max}$ : 565 nm).

Es gelang eine vollständige Trennung der beiden UPP-Komponenten, die im Folgenden als UPP1 (18,4 min) und UPP2 (23,6 min) bezeichnet werden (Abb. 3-135). Das Absorptionsspektrum von UPP1 ähnelte dem von BPP, jedoch wies es zusätzlich einige kurzwelligere Absorptionsmaxima bei 500, 534, und 576 nm auf (Abb. 3-136). Das Maximum der sehr breiten Absorption im langwelligen Bereich des Spektrums lag bei 777 nm. Eine Reihe von unaufgelösten Nebenmaxima schien vorhanden zu sein.

Dagegen wies das Absorptionsspektrum von UPP2 eine sehr große Ähnlichkeit mit dem eines Bilins auf (vgl. Abb. 3-134, links). Das Absorptionsmaximum war jedoch mit 565 nm im Vergleich zu PEB etwa 37 nm bathochrom verschoben. Der Chromophor des UPP2 könnte damit ähnlich dem des Phycoviolobilins (PVB) sein, dessen  $\pi$ -Elektronensystem aus sieben konjugierten Doppelbindungen besteht (PEB: sechs konjugierte Doppelbindungen).

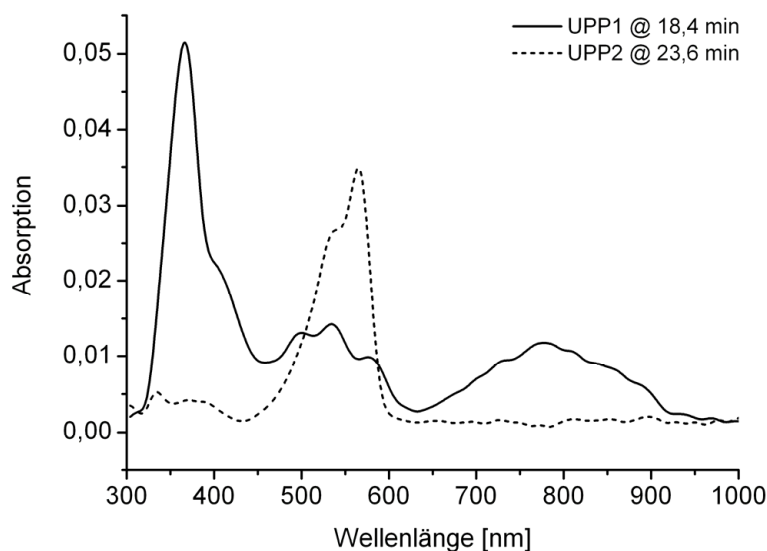


Abb. 3-136: Absorptionsspektren von UPP1 und UPP2. Die Spektren wurden direkt aus dem während der HPLC aufgezeichneten 3D-Datensatz des DAD-Spektrophotometers entnommen. UPP1 @ 14,8 min; UPP2 @ 23,6 min.

Bei UPP1 und UPP2 handelte es sich diesmal tatsächlich um Reinsubstanzen. Dies konnte durch abschließende massenspektroskopische Untersuchungen eindeutig bestätigt werden (Abb. 3-137). Bei UPP1 handelte es sich um das bereits erwähnte Produkt mit einer Masse von 943,55 Da ( $C_{55}H_{75}O_8N_4Mg$ ), bei UPP2 um das Produkt mit einer Masse von 1017,58 Da ( $C_{58}H_{81}O_{10}N_4Mg$ ).

Zur genaueren Strukturaufklärung wurden weitere Fraktionierungen dieser beiden Produkte durchgeführt (ohne Abb.). Es werden im Folgenden nur die monoisotopischen Massen angegeben. Die Abweichung der gemessenen Massen von den anhand der Summenformeln berechneten lag in allen Fällen  $<3$  mmu.

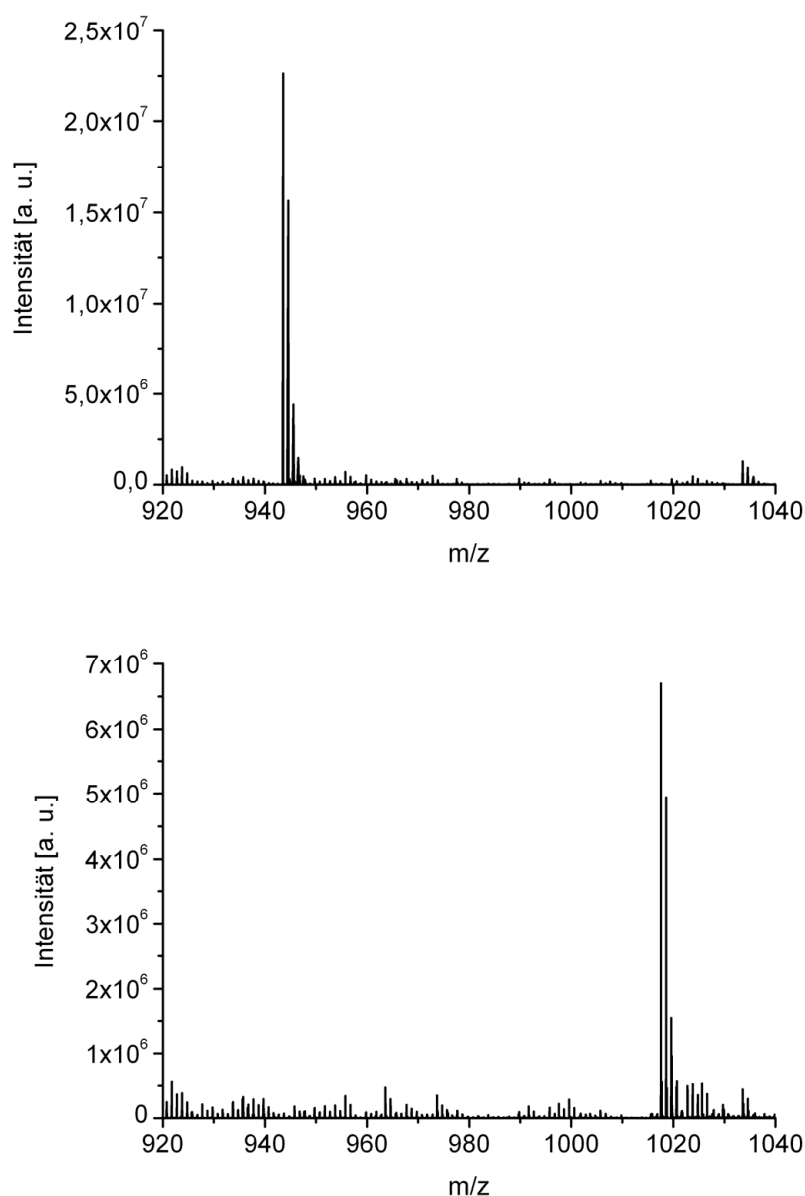


Abb. 3-137: Massenspektren von UPP1 (oben) und UPP2 (unten).

UPP1 (943,55 Da;  $C_{55}H_{75}O_8N_4Mg$ ) fraktionierte zu Bruchstücken mit Massen von 665,25 Da ( $C_{35}H_{37}O_8N_4Mg$ ) und 647,24 Da ( $C_{35}H_{35}O_7N_4Mg$ ), wobei ersteres nur in geringen Mengen detektierbar war. Ersteres entsteht durch Abspaltung des Phytol-Rests (278,30 Da;  $C_{20}H_{38}$ ) aus UPP1, letzteres durch eine Wasserabspaltung (18,01 Da;  $H_2O$ ) aus dem schwereren Fragment. UPP1 besitzt im Vergleich zu BChl *a* eine um 33,00 Da größere Masse, was einer Summenformel von  $HO_2$  entspricht. Die beobachtete Abspaltung des Phytol-Rests war auch bei BChl *a* der erste Schritt der Fraktionierung. So fraktionierte BChl *a* mit einer Masse von 910,55 Da ( $C_{55}H_{74}O_6N_4Mg$ ) zu BChlid *a* mit einer Masse von 632,25 Da ( $C_{35}H_{36}O_6N_4Mg$ ). Bei UPP1 könnte es sich daher um ein protoniertes Derivat des BChl *a* mit zwei zusätzlichen Sauerstoff-Atomen in Form eines Hydro- oder Endo-Peroxids handeln.

UPP2 (1017,58 Da;  $C_{58}H_{81}O_{10}N_4Mg$ ) fraktionierte dagegen zu Bruchstücken mit Massen von 721,27 Da ( $C_{38}H_{41}O_9N_4Mg$ ) und 739,28 Da ( $C_{38}H_{43}O_{10}N_4Mg$ ), wobei letzteres etwas häufiger nachweisbar war. Ersteres entsteht in Analogie zur Entstehung der oben beschriebenen UPP1-Fragmente durch Abspaltung des Phytol-Rests (278,30 Da;  $C_{20}H_{38}$ ) aus UPP2, letzteres durch eine Wasserabspaltung (18,01 Da;  $H_2O$ ) aus dem schwereren Fragment.

UPP2 besaß im Vergleich zu BChl *a* eine um 107,04 Da ( $C_3H_7O_4$ ), im Vergleich zu UPP1 eine um 74,03 Da ( $C_3H_6O_2$ ) größere Masse. Es handelte sich bei UPP2 folglich ziemlich sicher um ein protoniertes Derivat des BChl *a* mit einem kovalent gebundenen Molekül Aceton ( $C_3H_6O$ ), sowie drei zusätzlichen Sauerstoff-Atomen. Möglicherweise handelte es sich bei UPP2 um ein aus UPP1 entstandenes Folgeprodukt. Bislang wurde noch kein dem UPP2 ähnliches Produkt mit einem kovalent verknüpften Lösungsmittelmolekül beschrieben.

Anhand der Massenspektren stand ebenfalls fest, dass sowohl UPP1, wie auch UPP2 noch Mg als Zentralmetall enthielten. Damit erklären sich auch die z. T. großen Veränderungen des UPP-Absorptionsspektrums beim Ansäuern der Lösung (siehe Abb. 3-134, rechts), da es durch die HCl-Zugabe sehr wahrscheinlich zu einer vollständigen Entmetallierung beider UPP-Komponenten kam.

## 4 ABSCHLIEßENDE DISKUSSION

### Etablierung von Methoden zur Fraktionierung von humanem Blutplasma

In einem Vorversuch wurde festgestellt, dass sich der Photosensibilisator Pd-BPheid a in humanem Blut vor allem in der Blutplasmafraktion anreichert, die im Wesentlichen die Lipoproteine und eine Reihe von wasserlöslichen Proteinen (z. B. Albumin) enthält. Die große Bedeutung von Lipoproteinen als Transportvehikel von Photosensibilisatoren im Blut ist bereits seit langem bekannt (Reyftmann *et al.*, 1984; Jori *et al.*, 1984; Jori und Reddi, 1993). Aus diesem Grund wurde der Fokus der Pigmentbindungsstudien weg von der Verteilung in humanem Vollblut, hin zur Verteilung in Blutplasma verlegt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Methoden zur Fraktionierung von humanem Blutplasma etabliert werden. Beide machen sich die unterschiedlichen Dichte-Bereiche der verschiedenen Lipoproteinfraktionen zunutze.

Die erste, die auch als die klassische Methode bezeichnet werden kann, da sie seit über 50 Jahren zur Standarddiagnostik in der klinischen Chemie eingesetzt wird, ist die Blutplasmafraktionierung mittels sequentieller Dichtezentrifugation (SDZ).

Die zweite, die erst seit ~10 Jahren zur Analyse von Blutplasmafraktionen und -subfraktionen verwendet wird, ist die Zentrifugation in selbstgenerierenden Iodixanol-Gradienten (IGZ). Für letztere wurde mittels eines selbstkonstruierten Scanner-Systems eine Methode zur spektroskopischen Erfassung dieser Gradienten entwickelt, das innerhalb von ~2,5 Minuten die Messung eines 3D-Densitogramms des kompletten UZ-Röhrchens mit einer Ortsauflösung von 3 Absorptionsspektren pro mm entlang der Längsachse ermöglichte.

Beide Methoden lieferten im Rahmen der Messgenauigkeit identische Ergebnisse bezüglich der Pigmentverteilung, d. h. es kann als bewiesen angesehen werden, dass keine der beiden Fraktionierungsmethoden die Verteilung durch die Bildung von Artefakten beeinflusst. Dies ist nicht selbstverständlich, da die SDZ mit stark hyperosmotischen Salzlösungen arbeitet, die IGZ dagegen mit durchgehend isoosmotischen Lösungen. Auch für methodisch ähnliche Fraktionierungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die dabei verwendeten hohen Salz-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Lipoprotein-Verteilung der Pigmente besitzen (Woodburn und Kessel, 1995). Der bei der SDZ ausgelöste Wasserverlust der Lipoproteine führt lediglich im Vergleich zur IGZ zu geringfügig höheren Dichtebereichen für die einzelnen Lipoproteinklassen.

Die SDZ wurde überwiegend für die Präparation von Proben für die Belichtungsversuche verwendet, die IGZ für Analysen der Pigmentverteilung.

### Studien zur Pigmentverteilung auf die Fraktionen humanen Blutplasmas

Bereits in den ersten Studien zur Pigmentverteilung (Vergleich Pd-BPheid *a* – Zn-BPheid *a*) zeigten sich deutliche Unterschiede der Verteilung selbst bei sehr nahe miteinander verwandten Pigmenten. Da die IGZ-Fraktionierungsmethode pro Analyse nur relativ geringe Pigmentmengen ( $\sim 2 \text{ OD} \cdot \text{ml}_{\text{Ether}}$ ) benötigt, konnte die Pigmentverteilung von insgesamt 22 Pigmenten auf die Blutplasmafraktionen ermittelt werden.

Zur großen Überraschung zeigte sich, dass die Grundstruktur des Tetrapyrrols (Chlorin oder Bakteriochlorin) einen wesentlichen Einfluss auf die Verteilung hat. So binden die Bakteriochlorophyll-Derivate im Vergleich zu den entsprechenden Chlorophyll-Derivaten bevorzugt an LDL, was durch Experimente mit 3Ac-Chl *a* und 3Vi-BChl *a* eindeutig belegt werden konnte. Dieser Effekt ist allerdings auf die Pigmente mit einem Phytolrest beschränkt, bei den entsprechenden Derivaten ohne Phytolrest war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Unklar bleibt, ob dieser Effekt durch den geringeren Ringstrom (= Aromatizität), oder die größere Raumbeanspruchung der beiden C7/C8-Substituenten der Bakteriochlorin-Derivate zustande kommt ( $\text{sp}^3$ -Hybridisierung der C-Atome).

Die Art des C3-Substituenten (Acetyl- oder Vinyl-Gruppe) beeinflusste die Pigmentbindung erstaunlicherweise nur sehr gering. Ein C3-Vinylrest führt tendenziell zu einer minimalen Erhöhung des Pigmentanteils in der LDL-Fraktion.

Der Phytolrest scheint die Pigmentbindung an LDL zu erleichtern. Dieser Effekt machte sich besonders bei den Bakteriochlorin-Derivaten bemerkbar, bei den Chlorin-Derivaten war dagegen nur ein deutlich geringerer Unterschied zwischen den entsprechenden Chlorophyll- und Chlorophyllid-Derivaten feststellbar. Der erhöhte Effekt bei den Bakteriochlorinen kann jedoch im Wesentlichen mit dem Einfluss der Tetrapyrrol-Grundstruktur auf die Pigmentverteilung begründet werden (siehe oben).

Die chemische Zusammensetzung der Lipoprotein-Oberfläche könnte diese Ergebnisse erklären. Die Oberfläche der Lipoproteine setzt sich vor allem aus Phospholipiden (PL) und freiem Cholesterin (FC) zusammen (vgl. Abb. 1-14). Das PL/FC-Verhältnis der LDL beträgt  $\sim 1$ , das der HDL dagegen  $\sim 3,5$  (Tab. 4-1). Da  $\sim 95\%$  aller Phospholipide Cholin als Kopfgruppe enthalten (siehe Kap. 3.5.1), besitzen die Lipoproteine eine mit vielen positiven Ladungen versehene Oberfläche, während Cholesterin ungeladen ist. Deshalb muss bei einer nativen Gelelektrophorese der Laufpuffer einen relativ hohen pH-Wert (8,6) aufweisen, um eine Wanderung zur Anode zu bewerkstelligen. Die HDL besitzen daher im Vergleich zu den LDL pro Oberflächeneinheit eine größere positive Ladungsdichte.



Tab. 4-1: Durchschnittliche (gerundete) Molekülzahl der vier niedermolekularen Verbindungsklassen in verschiedenen Lipoproteinen. Die hochmolekularen Proteine wurden nicht berücksichtigt. Als Berechnungsgrundlage wurde das MW der Lipoproteine aus Tab. 1-2, sowie die chemische Zusammensetzung der Lipoproteine aus Tab. 1-3 herangezogen. Das Molekulargewicht aller Verbindungen mit gebundenen Fettsäuren (FS) wurde für die jeweiligen Stearinsäure-Derivate berechnet (PL: 2 FS; FC: 0 FS; CE: 1 FS; TG: 3 FS).

Lipoprotein	PL	FC	CE	TG
LDL	664	771	1569	112
HDL <sub>2</sub>	159	47	72	20
HDL <sub>3</sub>	58	16	46	7

MW [Da]	790,15	386,65	653,12	891,48
---------	--------	--------	--------	--------

Alle Pigmente ohne einen Phytolrest besitzen eine freie Carbonsäure, und damit eine negative Ladung an Position C17<sup>3</sup>, die wahrscheinlich durch Wechselwirkung mit den positiv geladenen Cholinresten ein Eindringen in tiefere Schichten der Membran verhindert. So ist in Liposomen auch das mit drei negativen Ladungen im Bereich der Ringe C und D versehene Bakteriochlorin *a* in der Nähe der Membranoberfläche lokalisiert (Hoebeke, 2000). Falls die Bindung auf der gegenüberliegenden Seite des Moleküls, den Ringen A und B erfolgen sollte, so besitzen die Bakteriochlorophyllid-Derivate zwar an Position C3 einen im Vergleich zu den Chlorophyllid-Derivaten etwas polarerer Substituenten, dieser Effekt könnte jedoch durch den geringeren Ringstrom der Bakteriochlorophyllid-Derivate wieder ausgeglichen werden. Dies würde das ähnliche Verhalten aller Pigmente ohne Phytolrest erklären. Alle Pigmente mit Phytolrest können sich wahrscheinlich mit dieser sehr langen, ungeladenen Kohlenwasserstoffkette tief in der Membran verankern, was durch eine weniger geladene Membran erleichtert würde. Die Bakteriochlorophyllid-Derivate werden dabei möglicherweise aufgrund ihres geringeren Ringstromes noch tiefer in der Membran verankert. Die größere Raumbeanspruchung der C7/C8-Substituenten hätte nach diesem Modell keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften. Auch die Art des C3-Substituenten besäße nur einen minimalen Effekt. Die Tendenz geht hierbei in die richtige Richtung: Der unpolare Vinyl-Substituent fördert geringfügig die Inkorporation in LDL.

Die Interaktion von Pigmenten mit den Lipiden der Lipoproteine kann als Phasenverteilung zwischen einer Wasser- und einer Lipid-Phase interpretiert werden (Beltramini *et al.*, 1987). Die gebräuchlichen Konstanten zur Quantifizierung der Lipophilie von Pigmenten (z. B.  $\log P$  oder  $\log D$ ) korrelieren oft relativ wenig mit den gemessenen Bindungskonstanten dieser Pigmente an Membranen oder Liposomen (Kępczyński *et al.*, 2002).

Die obige Theorie wird unterstützt durch die Beobachtung, dass sich die beiden getesteten besonders polaren Photosensibilisatoren (WST11 und HpD) stark in der HDL-Fraktion anreicherten, und in der LDL-Fraktion z. T. kaum noch nachweisbar waren. Im Gegensatz zu den eher unpolaren Pigmenten waren diese polaren Photosensibilisatoren auch in größeren Mengen in den jeweiligen HDP-Fractionen zu finden, d. h. bei den Proteinen, die nicht zu den Lipoproteinen gehören. Es ist unklar, ob die HDP, unter denen vor allen das Albumin zu erwähnen ist, polare Pigmente bevorzugt binden, oder ob ihnen lediglich eine größere Pigmentmenge zur Bindung aufgrund einer herabgesetzten Pigmentaffinität der Lipoproteine zur Verfügung steht. Da die Pigmentbindung der HDP bei der IGZ-Fraktionierung besonders hoch war, scheinen unnatürlich hohe Salzkonzentration, wie sie bei der SDZ-Fraktionierung verwendet werden, die Pigmentaffinität der HDP herabzusetzen.

Auch  $3^1\text{OH-Pd-BPheid } a$ , das eine eher intermediäre Polarität aufweist, unterstützt mit einer LDL/HDL/HDP-Verteilung von  $\sim 1:2:1$  dieser Theorie. Es nimmt damit auch bezüglich seiner Pigmentverteilung eine mittlere Position zwischen den getesteten polaren und unpolaren Tetrapyrrolen ein. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Pigmentverteilung zwischen den Lipoprotein-Fractionen und der HDP-Fraktion stark von der chemischen Struktur des Photosensibilisators abhängig ist, und mit zunehmender Polarität des Photosensibilisators sich ein immer größerer Anteil des Pigments in der HDP-Fraktion findet (Kongshaug *et al.*, 1989; Jori und Reddi, 1993). Für die Bindung an LDL ist es wohl grundsätzlich von Vorteil, wenn das Pigment eine amphiphile Struktur aufweist, d. h. sowohl einen hydrophilen, als auch einen hydrophoben Strukturbereich aufweist. Dies gilt z. B. für ein Tetraphenylporphin-Derivat mit zwei benachbarten Sulfonaten (Kessel *et al.*, 1987).

Hinsichtlich des Einflusses der Zentralmetalle zeigten vor allem die Zink-Derivate eine ungewöhnliche Verteilung. Vieles deutet auf eine spezifische Bindung dieser Pigmente an HDL hin, wobei als Bindungspartner natürlich vor allem die HDL-spezifischen Apolipoproteine in Frage kommen. Diese besondere Bindungsstruktur der Zink-Derivate an HDL kommt auch durch stark bathochrome Verschiebungen der  $Q_y$ -Absorptionsmaxima der Zn-Derivate in HDL im Vergleich zur Situation in LDL zum Ausdruck. Dieser Effekt nimmt mit dem relativen Anteil HDL-gebundenen Pigments zu. Doch selbst bei dem Zink-Derivat mit der größten Anreicherung in HDL (Zn-BPheid *a*) war ein rascher Interlipoprotein-Transfer zu beobachten, selbst von pigmentbeladenen HDL hin zu unbeladenen LDL. Dies unterstreicht die enorme Dynamik dieses Systems. Es wird jedoch berichtet, dass es bei sehr unpolaren Pigmenten zu keinem nachweisbaren Austausch mehr zwischen den Lipoproteinen kommt. So werden im Gegensatz zum Xanthophyll Lutein die Carotine  $\beta$ -Carotin und Lycopin nicht mehr ausgetauscht (Tyssandier *et al.*, 2002).

Auch der geringere Pigmentverlust von Zn-BPheid *a* im Vergleich zu Pd-BPheid *a* während längerer Lagerung, sowie die bathochromen Verschiebungen der Q<sub>x</sub>-Absorptionsmaxima bei beiden Zink-Bakteriochlorin-Derivaten deuten auf eine stärkere, folglich spezifische Bindung der Zink-Derivate an HDL hin. Das Zink wird dabei offenbar durch eine Base gebunden, möglicherweise durch die Imidazol-Gruppe eines Histidins. Diese Schlussfolgerung kann aus der Bildung von photoinduzierten Reduktionsprodukten des Krasnovskii-Typs gezogen werden, die bei beiden untersuchten Zink-Chlorin-Derivaten auftrat. Diese spezielle Reduktion (vgl. Abb. 3-42) ist nicht zu verwechseln mit der bei Porphyrinen mit Vinylresten (z. B. Protoporphyrin) zu beobachtenden O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)-induzierten Bildung von scheinbaren Reduktionsprodukten. So werden im Falle des Protoporphyrins bei Belichtung neben geringen Mengen der beiden Monoformyl-monovinyl-deuteroporphyrine und des Diformyl-deuteroporphyrins vor allem die beiden sog. *Photoporphyrine* gebildet, bei denen es sich um Hydroxyaldehyde eines „Pseudo-Chlorin-Typs“ mit fehlenden C2-C3- und C7-C8-Doppelbindungen handelt, die durch eine (4+2)-Cycloaddition des O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) entstehen (Cox und Whitten, 1982; Cox *et al.*, 1982). Die zweite Vinyl-Gruppe der Photoporphyrine kann zusätzlich noch in eine Formyl-Gruppe umgewandelt werden (Cox *et al.*, 1982). Die Formyl-Gruppen entstehen durch eine (2+2)-Cycloaddition des O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) mit anschließender Abspaltung von Formaldehyd aus der intermediären Dioxetan-Struktur.

Pro LDL-Partikel werden sowohl von Pd-, als auch von Zn-BPheid *a* ~3,5 Pigment-Moleküle gebunden. Dies zeigt, dass die Pigmentbindung an LDL unabhängig vom verwendeten Zentralmetall ist. Dagegen bindet HDL nahezu 3-mal mehr Zn-BPheid *a* als Pd-BPheid *a*. Dies unterstützt die oben gezogene Schlussfolgerung, dass eine spezifische Bindung zwischen Zn-BPheid *a* und HDL besteht. Im Falle des Pd-BPheid *a* bindet jedes LDL-Partikel rund 5,5-mal mehr Pigment als jedes HDL-Partikel (vgl. Tab. 3-5).

Da jedes LDL-Partikel etwa 11-mal mehr Phospholipide und freies Cholesterin als jedes HDL-Partikel enthält (vgl. Tab. 4-1), werden pro Oberflächeneinheit in den LDL nur etwa halb so viele Pigmente gebunden wie in einer vergleichbar großen Oberflächeneinheit in den HDL. Dieser Unterschied könnte durch den höheren Cholesterin-Anteil in den LDL bedingt sein, der zu einer dichteren Packung der Lipid-Moleküle führt (Williamson *et al.*, 1983; Gross *et al.*, 1987; Ehrenberg und Gross, 1988). Dies würde eine Abnahme der Viskosität bzw. eine Verfestigung der Membran bewirken, die den Pigmenten die Bindung erschweren kann.

Auch das verwendete Insertionssystem, mit dem die Pigmente dem Blutplasma zugesetzt werden, kann die Pigmentverteilung beeinflussen. Wird Cremophor<sup>®</sup> EL verwendet, so kommt es im Vergleich zu DMSO oder Phosphatpuffer zu einer Anreicherung des Pigments in der LDL-Fraktion, besonders in einer LDL-Subfraktion niedriger Dichte.

Dieser Effekt war in allen untersuchten Blutplasma-Chargen erkennbar. Möglicherweise deshalb, weil sich die relativen Häufigkeiten der LDL-Subfraktionen, die sich von Mensch zu Mensch stark unterscheiden können, selbst bei gekühlter Lagerung bereits innerhalb weniger Tage nivellieren (Griffin *et al.*, 1990). Die chemische Zusammensetzung der Lipoprotein-Fractionen war stets unabhängig vom Pigmentzusatz an sich, sowie von der Art des verwendeten Insertionssystems.

Zwischen der HDL<sub>2</sub>- und HDL<sub>3</sub>-Subfraktion scheint es keine Unterschiede bezüglich der Pigmentaffinität in Abhängigkeit vom verwendeten Pigment zu geben. Die beobachteten Unterschiede lassen darauf schließen, dass sich die Anzahl der gebundenen Pigmente in den HDL-Subfraktionen im Wesentlichen nach deren Oberfläche richtet.

Die Verteilung ist auch stark vom pH-Wert abhängig, in deren Umgebung sich der Photosensibilisator befindet. So führt eine Absenkung des pH-Werts von 7,4 auf 6,5 zu einer Änderung der Pigmentverteilung von Chlorin e6 (Ce6) zwischen Lipoproteinen und Albumin von ~1:9 auf ~1:2 (Čunderlíková *et al.*, 2000). Dies unterstreicht die Notwendigkeit, bei Studien zur Pigmentverteilung stets mit ausreichend pH-gepufferten Systemen zu arbeiten.

Die Verteilung ist ebenfalls abhängig von der Spezies, der das Blutplasma oder Blutserum entnommen wurde. Aufgrund einer etwas anderen chemischen Zusammensetzung der Lipoproteine kommt es bei Verwendung von Rinderserum (FCS) im Vergleich zu humanem Serum (oder Plasma) zu einer deutlich höheren Pigmentanreicherung in der HDL-Fraktion.

### Pigment-Aggregation in Blutplasma-Fractionen

In der HDP-Fraktion kommt es bei den unpolareneren Pigmenten oft zur Ausbildung von zwei Arten von Pigmentaggregaten, bei denen es sich wahrscheinlich um Dimere und Oligomere handelt. Zusätzlich scheint es auch mindestens zwei monomere Bindungsarten zu geben, da von Pd-BPheid *a* in HDP zwei Pigmentfraktionen mit sehr unterschiedlicher Photostabilität beobachtet werden konnten. Die eine bleichte während Belichtung langsam aus, die andere jedoch wies eine vollständige Bleichungsresistenz auf. Es könnte sich dabei um Pigmentmoleküle handeln, die in monomerer Form von zwei in ihrer Art unterschiedlichen Proteinen der HDP-Fraktion gebunden wurden. Da jedoch das Mengenverhältnis der beiden Formen nahe 1:1 lag, und Albumin einen Massenanteil von weit über 50% an den HDP besitzt, ist es wahrscheinlicher, dass es sich in beiden Fällen um eine Bindung an Albumin handelte.

Da Albumin eine Reihe von Bindungstaschen für unpolare Pigmente aufweist, von denen besonders zwei (*site I* und *site II*) oft für die Bindung von Tetrapyrrolen verantwortlich sind, könnte die unterschiedliche Photostabilität der beiden monomeren Formen u. U. durch die Bindung an *site I* und *site II* hervorgerufen worden sein. Die dimere(n) und polymere(n) Form(en) sind dagegen vollständig inert gegenüber photoinduzierter Bleichung. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer viel niedrigeren  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quantenausbeute der Aggregate im Vergleich zu den Monomeren. Dies konnte bereits bei anderen Photosensibilisatoren durch die direkte Messung der  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quantenausbeuten (Hp: Tanielian und Heinrich, 1995; HpD: Tanielian *et al.*, 2001) oder des Sauerstoffverbrauchs bei Belichtung (BCA: Damoiseau *et al.*, 2001) gemessen werden. Im Falle des BCA scheinen die Aggregate keine  $^3Sens^*$ -Zustände zu erzeugen (Damoiseau *et al.*, 2002). Durch Inkorporation des BCA in Liposomen kann daher durch Pigment-Monomerisierung die  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quantenausbeute erheblich gesteigert werden (Hoebeke *et al.*, 1999; Hoebeke und Damoiseau, 2002). Auch bei Pd-Porphyrinen reduziert sich in wässrigen Lösungen unabhängig von ihrer peripheren Struktur die relative  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quantenausbeute von  $\sim 0,9$  bei Monomeren auf  $\sim 0,2$  bei Dimeren (Borisov *et al.*, 2002).

Absorptionsspektroskopisch ähnliche monomere und dimere Formen von Pd-BPheid *a* konnten auch in FSM in Anhängigkeit von deren Porendurchmesser (20 Å, 45 Å, 83 Å) erzeugt werden. Dies ist möglich, da der Durchmesser des eigentlichen Tetrapyrrols ohne Seitenketten lediglich  $\sim 12$  Å, die maximale Ausdehnung mit den Seitenketten im Falle eines Porphyrins nur  $\sim 14$  Å beträgt (Maman und Brault, 1988). So lagen in den 20 Å-FSM überwiegend monomere Formen, in den 45 Å-FSM mono- und dimere Formen, und in den 83 Å-FSM überwiegend dimere Formen von inkorporiertem Pd-BPheid *a* vor. Bislang wurde in der Literatur noch von keinen vergleichbaren Experimenten mit Bakteriochlorophyll-Derivaten berichtet, jedoch gelang die Inkorporation des kompletten Lichtsammelkomplexes (LH2; Ø: 73 Å) eines photosynthetischen Purpurbakteriums in die Poren eines 79 Å-FSM (Oda *et al.*, 2006).

Chlorophyll kann in FSM eine Pheophytinisierung erfahren, da Mg von Silanol-Gruppen, die als Brønsted-Säuren (Protonen-Donoren) agieren, gebunden wird. Durch Modifikation der Silanol-Gruppen mit 1,4-Butandiol kann dieser Effekt verhindert werden, wobei beide Alkohol-Gruppen des Diols reagieren können (Murata *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurden auch wiederholt Zn-Derivate verwendet, da diese nicht so leicht entmetalliert werden (Furukawa *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit bei den FSM-Experimenten verwendeten Pigmente mit Pd als Zentralmetall zeichnen sich durch eine noch geringe Neigung zur Entmetallierung aus.

### Untersuchungen zur Photostabilität der Photosensibilisatoren

Die Photostabilität der Pigmente in Lipoproteinen bzw. der an Lipoproteine gebundenen Pigmente war in allen Fällen deutlich höher als in anderen Lösungen, in denen das Pigment monomer gelöst vorlag (CES bei WST09; H<sub>2</sub>O bei WST11). Dies kann nur teilweise mit dem in den Lipoproteinen vorhandenen Antioxidantien begründet werden, da deren Konzentration viel zu gering für einen derart großen Effekt ist. In Kombination verabreichte Antioxidantien (z. B.  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol) wirken oft in synergistischer Weise, d. h. gemeinsam sind sie effektiver in der Entgiftung von ROS als die Summe ihrer allein erzielten Wirkungen (Palozza und Krinsky, 1992; Milde *et al.*, 2007). Doch selbst ein derartiger Effekt kann nicht wesentlich zu der beobachteten Photostabilität beigetragen haben.

Wahrscheinlicher werden die Pigmente dadurch vor Bleichung geschützt, dass die photoinduzierten ROS sehr schnell von den Bestandteilen der Lipoproteine gequenchet werden. Neben Cholesterin und dessen Estern sind vor allem die ungesättigten Fettsäuren, sowie eine Reihe von Aminosäuren (Methionin, Cystein, Histidin, Tryptophan, Tyrosin) in der Lage, mit O<sub>2</sub>(<sup>1</sup> $\Delta$ <sub>g</sub>) chemisch zu reagieren. Unterstützt wird diese Annahme durch den Sauerstoffverbrauch bei Belichtung von verdünnten Lipoproteinproben mit inkorporierten Pigmenten. In diesen trat ein deutlich schnellerer Rückgang der Sauerstoffkonzentration auf, wenn die Probe mit Lipoproteinen (ozP) verdünnt wurde, als wenn die Verdünnung mit H<sub>2</sub>O erfolgte.

In allen Fällen war die Photostabilität der Zn-Derivate weitaus geringer als die der Pd-Derivate, jedoch etwas höher als die der natürlichen Mg-Derivate. Dies deckt sich mit früheren Befunden, dass in Lösung die Photostabilität von Bakteriochlorinen in der Reihe ihrer Zentralmetalle Pd >> Zn > Mg abnimmt (Limantara *et al.*, 2006). Die äußerst große Photostabilität von Pd-BPheid *a* liegt an dessen relativ hohem Oxidationspotential, das um 0,23 V höher als das von Zn-BPheid *a*, und um 0,34 V höher als das von BChl *a* ist (Noy *et al.*, 1998). Auch der etwas höhere Absorptionsrückgang von Zn-BPheid *a* im Vergleich zu Pd-BPheid *a* während längerer Lagerung weist auf eine geringere chemische Stabilität der Zink-Derivate hin. Allerdings konnten keine Oxidationsprodukte mit Absorption im VIS/NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums nachgewiesen werden.

Das Pd-Derivat von BChl *a* (Pd-BPhe *a*) ist daher aufgrund seiner <sup>3</sup>Sens\*-Quantenausbeute von über 99% (Musewald *et al.*, 1998) nicht nur ein sehr effizienter Photosensibilisator, sondern auch sehr stabil gegenüber ROS-induzierter Oxidation (Fiedor *et al.*, 2002). Die hohe <sup>3</sup>Sens\*-Quantenausbeute ist durch einen Pd-induzierten Schweratomeffekt bedingt, der im Vergleich zu Zn-BPhe *a* zu einer viel geringeren Fluoreszenz, und damit einer viel höheren ISC- und O<sub>2</sub>(<sup>1</sup> $\Delta$ <sub>g</sub>)-Quantenausbeute führt (Teuchner *et al.*, 1997; Musewald *et al.*, 1998; Stiel *et al.*, private Mitteilung).

Die entsprechenden Bakteriochlorophyllid-Derivate (Pd- und Zn-BPheid a) verhalten sich in dieser Beziehung wie erwartet identisch. Ähnliche Auswirkungen des Schweratomeffekts auf die Fluoreszenz, sowie die ISC- und  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quantenausbeute sind auch beim Vergleich der beiden ebenfalls verwendeten Farbstoffe Bengalrosa und DCF feststellbar.

Völlig überraschend waren jedoch die Auswirkungen einer Dialyse von HDL gegen  $D_2O$  auf die Photostabilität der inkorporierten Pigmente. In gegen  $H_2O$  dialysierten Proben war eine geringfügige Erniedrigung der Photostabilität der Pigmente festzustellen, die wohl durch die Entfernung löslicher Antioxidantien erklärbar ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei relativ lichtempfindlichen Pigmenten (z. B. Zn-BPheid a) nur in undialysierten HDL zu Beginn der Belichtung ein Schutz vor Bleichung besteht. Dies bestätigt die Vermutung, dass dieser Effekt durch einen sich schnell erschöpfenden Vorrat an löslichen Antioxidantien hervorgerufen wird.

In gegen  $D_2O$  dialysierten HDL wurden dagegen über 80% des Pd-BPheid a (WST09) vollständig vor Bleichung geschützt. Dabei kam es nur in den ersten Minuten der Belichtung zu einer erhöhten Photobleichung, die jedoch im Einklang mit der längeren  $O_2(^1\Delta_g)$ -Lebenszeit in deuterierten Lösungsmitteln steht. Dadurch kommt es zu einem schnelleren Verbrauch von Sauerstoff, der mittels einer Clark-Elektrode gemessen werden konnte.

Dieser Effekt ist jedoch nicht auf eine spezifische Eigenschaft der HDL zurückzuführen, sondern trat auch in etwas geringerem Ausmaß bei einer Pigmentlösung in CES auf, die mit  $D_2O$  anstelle von  $H_2O$  bereitet wurde. Der ungewöhnliche Schutz der Pigmente vor Photobleichung tritt also nur in  $D_2O$  und einer gleichzeitig nahezu sauerstofffreien Umgebung ein. Ein kinetischer Isotopeneffekt kann ziemlich sicher aufgrund des vollständigen Schutzeffekts ausgeschlossen werden. Bei WST11 in HDL kam es zwar ebenfalls zu einem Schutz vor Bleichung, allerdings betraf er hier nur rund 20% des Pigments. Die Ursache für diesen Effekt ist daher eher in der Struktur der Lipidmembran zu suchen, da bei einem unpolaren Pigment ein deutlich größerer Prozentsatz der Moleküle vor Photobleichung geschützt ist.

#### Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von Photosensibilisatoren

Bezüglich der mechanistischen Typen von Photoreaktionen existieren zwei unterschiedliche Definitionen. In der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Definition werden Elektronenübertragungen, die in radikalischen Mechanismen enden, als Reaktionen des Typs I, und Energieübertragungen, vorzugsweise auf Sauerstoff, als Reaktionen des Typs II bezeichnet (vgl. Abb. 1-4; Bonnett, 2000). Andere Autoren zählen alle Reaktionen mit Beteiligung von Sauerstoff zum Typ II, z. B. die auch Bildung von Superoxid-Radikalanionen (Foote, 1991).

Durch vollständige Sauerstoff-Entfernung mittels Dithionit konnte bewiesen werden, dass ein Großteil der Photobleichung, die als Maßstab für die ROS-Erzeugung angesehen werden kann, Sauerstoff benötigt. In Lipoproteinen mit Pd-BPheid *a* war in einer sauerstofffreien Umgebung ein vollständiger Schutz vor Photobleichung feststellbar. Erst in einem vergleichbaren Ansatz mit Zn-BPheid *a* konnte auch ein Bleichungstyp erkannt werden, der offenbar sauerstoffunabhängig ist, und folglich wahrscheinlich auf einem radikalischen Reaktionschema beruht. Durch Begasung einer Lösung von WST11 in Phosphatpuffer mit Argon oder Sauerstoff konnte die große Bedeutung der Sauerstoff-Konzentration sowohl für die Photobleichung des Pigments, wie auch für die Oxidation von Zielmolekülen nochmals illustriert werden.

Ähnliches konnte bereits bei Zellversuchen beobachtet werden. Durch eine normobare Hyperoxygenierung (vollständiger Ersatz der Atemluft durch reinen Sauerstoff) lässt sich die PDT-Effizienz steigern, sowohl durch Oxygenierung bereits hypoxischer Zellen, als auch durch die teilweise Kompensation der PDT-induzierten Sauerstoff-Verarmung des Gewebes (Chen *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite verringert sich die PDT-Effizienz um ~50%, wenn der Sauerstoff-Anteil der Luft auf 1% verringert wird (Moan und Sommer, 1985). Aus diesem Grund wird die Sauerstoff-Sättigung des zu bestrahlenden Gewebes immer öfter mittels verschiedenster Methoden während der PDT überwacht (Woodhams *et al.*, 2007).

Durch Messung der Sauerstoff-Konzentration verschiedener Lösungen bei Belichtung mittels einer Clark-Elektrode konnte nachgewiesen werden, dass die Photobleichung nicht nur Sauerstoff benötigt, sondern auch in großen Mengen verbraucht. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Ascorbat die Photobleichung verhindert, indem es mit angeregtem Sauerstoff (höchstwahrscheinlich  $O_2(^1\Delta_g)$ ) reagiert, wodurch es zu einem äußerst schnellen Verbrauch von gelöstem Sauerstoff kommt (~10  $\mu\text{M/s}$ ). Auch *in vivo* kann die  $O_2$ -Sättigung eines Tumors innerhalb weniger Minuten um mehr als 50% abfallen, und sich bei lang anhaltender Belichtung sogar zu einer vollständigen Anoxie ausweiten (Kelleher *et al.*, 2004).

Alle Ergebnisse der Experimente, bei denen Lipoproteine mit Quenchern für Photoreaktionen des Typs I oder des Typs II versetzt wurden, deuten darauf hin, dass in Lipoproteinen vor allem Photoreaktionen des Typs II stattfinden. Kein einziger Quencher für Photoreaktionen des Typs I (Mannitol, Saccharose, Glycerin, DMSO) bewirkte eine signifikante Erhöhung der Photostabilität des Pigments, bei den Quenchern für Photoreaktionen des Typs II gelang dies jedoch einigen Aminosäuren (Cystein, Histidin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin), sowie  $\beta$ -Carotin und in geringem Ausmaß auch DABCO. Prolin als cyclisches sekundäres Amin besitzt ebenfalls die Fähigkeit, unter bestimmten Umständen  $O_2(^1\Delta_g)$  durch einen ähnlichen Mechanismus wie DABCO quenchen zu können (Alia *et al.*, 2001).



Es konnte im vorliegenden Fall nur eine minimale Erhöhung der Photostabilität des Pigments festgestellt werden, die jedoch nicht als signifikant eingestuft werden kann. Der  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quencher Azid ergab dagegen keinen Effekt, was an der hohen Polarität dieses Moleküls liegen könnte. So sind viele der häufig in wässrigen Lösungen verwendeten ROS-Quencher (z. B. Azid, Mannitol) deutlich zu polar, um mit Membranen (und den darin verankerten Pigmenten) interagieren zu können (Girotti, 1992). Dies gilt möglicherweise auch für einige der anderen bisher erwähnten Quencher, die keinen Effekt zeigten. Der Zusatz von Ascorbat bewirkte einen fast vollständigen Schutz der Pigmente gegenüber Photobleichung, jedoch reagiert Ascorbat als höchst effektiver Quencher aller Arten von ROS, und kann somit nicht zur Aufklärung des Reaktionstyps verwendet werden. Es sollte immer berücksichtigt werden, dass die Tetrapyrrole selbst (z. B. Chl *a* oder BChl *a*) ebenfalls höchst effektive (chemische) Quencher von  $O_2(^1\Delta_g)$  darstellen (Krasnovsky, 1979).

Ein besonders elegantes System zur Untersuchung des Reaktionstyps ist die Analyse der Cholesterin-Oxidationsprodukte. Cholesterin kann aufgrund seiner in Abhängigkeit von der Art der reagierenden ROS unterschiedlichen Oxidationsprodukte als Sonde zur Aufklärung des photodynamischen Reaktionstyps benutzt werden (Bachowski *et al.*, 1991; Girotti, 1992). Im Gegensatz zu allen anderen Methoden, bei denen durch den Zusatz einer Substanz stets nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese das System in irgendeiner Form verändert, liegt hier die molekulare Sonde (Cholesterin) endogen in ausreichenden Mengen in den Lipoproteinen vor.

Es konnte in allen Fällen als Haupt-Oxidationsprodukt nur das  $5\alpha$ -OOH-Chol nachgewiesen werden, das ausschließlich durch Photoreaktionen des Typs II entsteht. Die ebenfalls vorhandenen Spuren des  $7\alpha$ -OOH-Chol entstanden eindeutig durch allylische Umlagerung aus  $5\alpha$ -OOH-Chol, da gleichzeitig kein  $7\beta$ -OOH-Chol auftrat. Bei radikalischen Photoreaktionen des Typs I entsteht stets etwa doppelt so viel  $7\beta$ -OOH-Chol wie  $7\alpha$ -OOH-Chol. Auch die Oxidationsprodukte der Carotinoide deuten auf eine Photoreaktion des Typs II hin (siehe Seite 224).

Jedoch kann der Reaktionsmechanismus u. U. sowohl von der Pigment-, als auch von der Sauerstoff-Konzentration abhängig sein. So überwiegen bei niedrigen Hp-Konzentrationen ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) Photoreaktionen des Typs II, bei hohen Hp-Konzentrationen ( $\sim 15 \mu\text{M}$ ) dagegen Photoreaktionen des Typs I, wahrscheinlich bedingt durch einen höheren Aggregationsgrad des Pigments (Grossweiner *et al.*, 1982). Bei niedrigen  $O_2$ -Konzentrationen kann es zu einer Bevorzugung von Photoreaktionen des Typs I kommen, da die Energie von  $^3\text{Sens}^*$  mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auf andere Moleküle als Sauerstoff übertragen wird (Kunz und MacRobert, 2002).

Die Wirksamkeit von Photosensibilisatoren lässt sich jedoch durch Experimente *in vitro* nur abschätzen. So ist die  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quantenausbeute eines Pigments in Lösung kein Maß für die photodynamische Effektivität desselben, da diese auch durch spezifische Interaktionen des Pigments mit Membranbestandteilen, und den damit bedingten Auswirkungen auf zum Teil lediglich einzelne Membranfunktionen, mitbestimmt wird (Kochevar *et al.*, 1994).

### Identifizierung und Quantifizierung photoinduzierter Modifikationen

Bei der Bleichung von Bakteriochlorophyllid-Derivaten (Pd-BPheid *a*, Zn-BPheid *a*) in Lipoproteinen werden als Oxidationsprodukte mit Absorption im VIS/NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums überwiegend die entsprechenden Chlorin-Derivate gebildet. Das im Falle des BChl *a* entstehende 3-Acetyl-3-devinyl-Chlorophyll *a* wurde schon vor über 50 Jahren als ein grünes Pigment beschrieben, das bereits als Verunreinigung in isoliertem BChl *a* enthalten ist (Holt und Jacobs, 1954), oder bei Belichtung aus BChl *a* entsteht (Goedheer, 1958; Kim, 1966; Lindsay-Smith und Calvin, 1966). Jedoch kommt es bei über 50% des vorliegenden Pigments zu einer vollständigen Bleichung, d. h. die Produkte der Photoreaktion weisen keine (nennenswerte) Absorption im VIS/NIR auf.

In einem künstlichen System mit in Detergens (CES) gelösten Pd-BPheid *a* wurde jedoch das Pigment auch in das entsprechende Porphyrin-Derivat umgewandelt. Dies steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Experimenten, bei denen in einer Detergens-Umgebung die Bildung des Chlorin- und Porphyrin-Derivats beobachtet wurde, bei Zusatz des  $O_2(^1\Delta_g)$ -Quenchers Azid jedoch der gebildete Chlorin-Derivat-Anteil zunahm, während der gebildete Porphyrin-Derivat-Anteil abnahm (Vakrat-Haglili *et al.*, 2005). Es wird daher vermutet, dass das Chlorin-Derivat (überwiegend) durch eine Photoreaktion des Typs I, das Porphyrin-Derivat (überwiegend) durch eine Photoreaktion des Typs II erzeugt wird. Für erstere wurde bereits ein Reaktionsmechanismus postuliert, für letztere jedoch noch nicht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es in Detergens zu Photoreaktionen beider Typen mit dem Pigment kommt. Über das Verhältnis der beiden Reaktionstypen kann keine Aussage getroffen werden, da zwar vergleichbar viel der beiden Produkte gebildet werden, der radikalische Reaktionstyp jedoch weitaus effektiver sein könnte. In einer Umgebung, die  $O_2(^1\Delta_g)$  schnell verbraucht (Lipoprotein oder Azid) wird möglicherweise das Gleichgewicht der beiden Reaktionen verschoben, da es viel seltener zu einem Angriff von  $O_2(^1\Delta_g)$  auf das Pigment kommt. Dadurch würde nicht nur weniger vom Porphyrin-Derivat gebildet, es würde auch insgesamt mehr vom Chlorin-Derivat erzeugt werden, da die Pigment-Lebenszeit bis zur Bleichung zunimmt. Diese Vermutung wird durch die deutlich längere Lebenszeit des Pigments in Lipoproteinen im Vergleich zur Situation in Detergens-Umgebung untermauert.

Durch die Belichtung kommt es auch zu einer insgesamt negativeren Oberflächenladung der Lipoproteine im Vergleich zu ihrem unbelichteten Zustand. Dieser Effekt, der in ähnlicher Form auch bei der chemischen Oxidationen von LDL durch Kupfersalze beobachtet wurde, kann entweder durch eine Zunahme negativer, oder durch eine Abnahme positiver Ladungen zustande kommen. Negative Ladungen können z. B. durch die Freisetzung von Fettsäuren entstehen, positive Ladungen können z. B. durch die Reaktion von Lysin-Aminogruppen mit photoinduzierten Aldehyden (MDA oder HNE) neutralisiert werden. Auch kam es photoinduziert sowohl zu Quervernetzungen, als auch zu Fragmentierungen der Apolipoproteine der HDL, vor allem des Apolipoproteins A-I.

Die photodynamische Wirkung von Pigmenten führt oft zur Bildung reaktiver Peroxide, die eine Zelle erheblich schädigen können. Während eine niedrige Peroxidierung meist durch die verschiedenen Entgiftungsmechanismen einer Zelle behoben werden kann, führt eine hohe Peroxidierung oft zur Einleitung der Apoptose, eine sehr hohe Peroxidierung u. U. sogar zur Nekrose einer Zelle (Girotti, 1998).

Die Oxidation von Bestandteilen der Lipoproteine zu Peroxiden konnte mittels zweier unterschiedlicher Testverfahren exakt quantifiziert werden. Das erste, der DCF-Test, erlaubt die Messung sämtlicher entstandener Hydroperoxide (ROOH). Es zeigte sich, dass in den LDL unabhängig vom verwendeten Pigment deutlich mehr ROOH als in den HDL gebildet werden, was wahrscheinlich durch die größere Anzahl an oxidierbaren Zielmolekülen in den LDL erklärbar ist. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass die LDL auch mehr zur Autoxidation neigen als die HDL, was durch die bereits vor Belichtung ~9-mal höhere ROOH-Konzentration der LDL im Vergleich zu den HDL zum Ausdruck kam.

Das zweite Testverfahren, der TBARS-Test, misst die Konzentration des MDA, das bei Hitze aus TBARS, vor allem photoinduzierten Endoperoxiden (ROOR') entsteht. Wie von den ROOH, wurden auch von den ROOR' mehr in den LDL als in den HDL gebildet. Die ROOR'-Bildung war jedoch in den LDL nur geringfügig höher als in den HDL. Auch der Unterschied an vor Belichtung vorhandenen TBARS war viel geringer als bei den ROOH. Im Gegensatz zur ROOH-Bildung war die ROOR'-Bildung erstaunlicherweise nahezu unabhängig vom verwendeten Pigment (Zn-BPheid a, Pd-BPheid a). Dies lässt sich möglicherweise durch eine sehr geringe Anzahl an Zielmolekülen für die Bildung von Endoperoxiden erklären, die auch durch schnell ausbleichende Pigmente (z. B. Zn-BPheid a) noch vollständig oxidiert werden können.

Während es im letzteren Fall lediglich zu einer photoinduzierten Verdreifachung der TBARS kam, erhöhte sich die ROOH-Konzentration bei Belichtung um das ~10-fache in LDL, und das ~30-fache in HDL. Der höhere Wert für HDL kommt zustande, dass in den LDL bereits eine ~10-mal höhere ROOH-Anfangskonzentration vorhanden war.

Auch die Lipide Porphyrin-beladener LDL werden bei Belichtung schnell und effizient zu Peroxiden modifiziert (Candide *et al.*, 1988). Die allgemeine Oxidierbarkeit von Plasma ist allerdings erheblich von den Konzentrationen der darin enthaltenen Bestandteile abhängig, so dass bereits eine Reihe von positiven und negativen Korrelationen definiert werden konnten (Spranger *et al.*, 1998). Auch alle membrangebundenen Photosensibilisatoren können räumlich weit entfernte Zellkomponenten durch die Bildung langlebiger, sekundärer Oxidationsprodukte, die aus kurzlebigen, primären Lipid-Oxidationsprodukten entstehen, erheblich schädigen (Ouédraogo und Redmond, 2003).

Auch von den endogen in den Lipoprotein vorhandenen Carotinoiden konnten photo-induzierte Oxidationsprodukte nachgewiesen werden. Von  $\beta$ -Carotin konnte als Oxidationsprodukt das 5,8-Endoperoxy-5,8-dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin nachgewiesen werden, das typisch für eine Photoreaktion des Typs II ist. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass  $O_2(^1\Delta_g)$  als kleines, ungeladenes Molekül praktisch ohne Einschränkungen in allen flüssigen Phasen diffundieren kann, da es von geladenen Wasser-Lipid-Grenzschichten (z. B. Membranen) kaum aufgehalten wird (Lee und Rodgers, 1983).

Drei weitere Oxidationsprodukte traten in viel geringeren Konzentrationen auf. Das erste war ein Produkt mit einem dem 5,8-Endoperoxy-5,8-dihydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin ähnlichen Spektrum, aber deutlich polarerem Charakter. Beim zweiten Produkt handelte es wohl ebenfalls um ein Derivat des  $\beta$ -Carotins, nämlich das 5,8,5',8'-Diendoperoxy-5,8,5',8'-tetrahydro- $\beta$ - $\beta$ -Carotin. Das dritte Produkt wies ein identisches Absorptionsspektrum wie das Lycopin auf, bei dem es sich wahrscheinlich um ein an der Peripherie oxidiertes Lycopin-Derivat handelte. Obwohl mittlerweile für viele Moleküle bzw. reaktive Gruppen der  $O_2(^1\Delta_g)$ -Reaktionsmechanismus aufgeklärt wurde (Clennan und Pace, 2005), konnten nicht allen Oxidationsprodukten gesicherte chemische Strukturen zugewiesen werden.

### Vergleichende Studien in organischen Lösungsmitteln

Die Stabilität von BChl *a* in Lösungsmitteln ist extrem abhängig von der Art des verwendeten Lösungsmittels. Es konnte jedoch kein Zusammenhang der Photostabilität des Pigments mit irgendeiner physiko-chemischen Eigenschaft des Lösungsmittels gefunden werden, d. h. es handelt sich folglich sehr wahrscheinlich um eine Kombination mehrerer Effekte. Die Photostabilität von Tetrapyrrolen nimmt in der Reihe Porphyrin > Chlorin > Bakteriochlorin ab, wobei es im Falle der Porphyrin-Derivate meist lediglich zu Photomodifikationen kommt (Bonnett *et al.*, 1999b).

Am bemerkenswertesten ist die enorme Photostabilität des BChl *a* in Diethylether. Da dies auch für andere Pigmente gilt, ist dies eine sehr praktische Eigenschaft, da die Portionierung aller Pigmente in Diethylether (DE) erfolgte. Damit existiert ein Lösungsmittel, das nicht nur auf Grund seines niedrigen Siedepunktes bzw. seines hohen Dampfdrucks leicht wieder entferbar ist, sondern in dem auch nur eine sehr geringe Gefahr der Pigmentoxidation besteht. DE sollte daher für derartige Arbeiten unbedingt anderen Lösungsmitteln mit einem vergleichbar niedrigen Siedepunkt (z. B. Methylenchlorid) vorgezogen werden.

Die Belichtung von BChl *a* in Aceton erzeugte neben mehreren bekannten (u. a. 3Ac-Chl *a*; Lindsay-Smith und Calvin, 1966) auch einige unbekannte Oxidationsprodukte, von denen zwei näher charakterisiert wurden. Das eine besaß ein für Tetrapyrrole eher untypisches Absorptionsspektrum, und entstand im Wesentlichen durch Aufnahme zweier O-Atome aus BChl *a*. Aufgrund des von BChl *a* deutlich unterschiedlichen Spektrums ist anzunehmen, dass diese O-Atome die Konjugation des  $\pi$ -Elektronensystems unterbrochen haben. Das zweite der näher charakterisierten Oxidationsprodukte besaß ein Absorptionsspektrum, das eine sehr große Ähnlichkeit zu dem des Phycoviolobilins aufwies, einem Bilin-Farbstoff mit sieben konjugierten Doppelbindungen. Aus dem Massenspektrum dieser Verbindung geht klar hervor, dass ein Molekül des Lösungsmittels Aceton photoinduziert an BChl *a* gebunden worden ist. Eine mögliche chemische Struktur kann jedoch aus den vorhandenen Daten noch nicht abgeleitet werden. Das in beiden Fällen weiterhin als Zentralmetall vorhandene Mg legt nahe, dass es durch die Sauerstoff-Insertion zu keiner Ringöffnung des Tetrapyrrol-Makrocyclus gekommen ist. Für weiterführende NMR-spektroskopische Untersuchungen reichten die aufgereinigten Stoffmengen beider Verbindungen leider bei weitem nicht aus.

Die Bestimmung des Typs der in organischen Lösungsmitteln stattfindenden Photoreaktion war nicht eindeutig. Zwar bewirkte DABCO, ein Quencher für Photoreaktionen des Typs II, eine deutliche Erhöhung der Pigmentstabilität bei Belichtung, allerdings konnte gleiches in viel geringerem Ausmaß bei Zusatz von BHT, einem Quencher für Photoreaktionen des Typs I, beobachtet werden. Da jedoch BHT auch mit  $O_2(^1\Delta_g)$  reagieren kann, muss es nicht unbedingt zu radikalischen Reaktionen gekommen sein.

Wurde Pd-BPheid *a* zusammen mit Cholesterin in verschiedenen Lösungsmitteln belichtet, so konnte in fast allen Fällen nur 5 $\alpha$ -OOH-Chol, das Oxidationsprodukt eines  $O_2(^1\Delta_g)$ -Angriffs auf Cholesterin nachgewiesen werden. In einigen Fällen kam es offenbar zu Reaktionen der Oxidationsprodukte mit dem Lösungsmittel, jedoch konnte in keinem Fall das für einen radikalischen Angriff auf Cholesterin typische Epimerenpaar des 7 $\alpha\beta$ -OOH-Chol gefunden werden.

In Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden keine Oxidationsprodukte gefunden, jedoch ist DMSO nicht nur ein effektiver Quencher von Hydroxylradikalen (Steiner und Babbs, 1990), sondern kann auch mit  $O_2(^1\Delta_g)$  zu Dimethylsulfon ( $DMSO_2$ ) reagieren (Schenck und Krauch, 1963; Mali *et al.*, 1994).

Bei Belichtung von verschiedenen Bakteriochlorinen in Lösungsmitteln konnte somit kein eindeutiger Hinweis auf eine Induktion einer Photoreaktion des Typs I erbracht werden. Falls es radikalische Reaktionen geben sollte, so müssten sie um ein vielfaches seltener als  $O_2(^1\Delta_g)$ -Reaktionen sein. Nur so wären ihre generierten Oxidationsprodukte unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenzen aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Detektionssysteme. Die Unterscheidung, ob der erste Schritt einer Photoreaktion eine Typ-I oder Typ-II-Reaktion darstellt, wird häufig durch konkurrierende oder nachfolgende radikalische Reaktionen der in beiden Reaktionstypen entstehenden Peroxide erschwert (Tanielian *et al.*, 2000).

### Ausblick

Die Wirkungsweise der PDT auf molekularer Ebene ist noch immer recht unvollständig aufgeklärt. So ist z. B. bis heute unklar, ob eine Anreicherung des Photosensibilisators in Lipoproteinen grundsätzlich die PDT-Effizienz steigert. Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass bereits geringe Veränderungen der chemischen Struktur des Photosensibilisators dessen Verteilung auf die wesentlichen Blutplasma-Bestandteile deutlich verändern können. Da die zellulären Interaktionen der Blutplasma-Frakturen sehr unterschiedlich sein können, sollte die Pigmentverteilung bei der Evaluierung der PDT-Effizienz und der gezielten Synthese von neuartigen Photosensibilisatoren für eine hochselektive Krebstherapie in Zukunft stärker berücksichtigt werden.

Im Rahmen der PDT-Forschung sollte ebenfalls ein größeres Augenmerk auf die auftretenden photoinduzierten Derivate der Photosensibilisatoren und der endogenen Moleküle gelegt werden, die bisher nur sehr unzureichend auf mögliche Nebenwirkungen untersucht wurden. Auch die deutliche Steigerung der PDT-Effizienz durch eine Hyperoxygenierung des Gewebes wurde trotz relativ einfachen technischen Voraussetzungen bisher nur unzureichend auf eine Anwendbarkeit im Rahmen der PDT getestet.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die photodynamische Krebstherapie (PDT) hat sich in den letzten Jahren zu einer etablierten Routinebehandlung im klinischen Alltag entwickelt. Die wichtigste Komponente der PDT ist der dabei verwendete Photosensibilisator, dessen physiko-chemische Eigenschaften den Erfolg der Therapie maßgeblich bestimmen. Die detaillierte Kenntnis der in einem natürlichen System auftretenden Wechselwirkungen und Reaktionen zwischen dem Photosensibilisator und biologischen Molekülen ist daher ein wichtiger Schritt in Richtung einer effektiveren und sichereren Anwendung der PDT. Ausgehend von der Entwicklung neuartiger, BChl-basierter PDT-Sensibilisatoren wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Es wurden zwei Methoden zur Fraktionierung von humanem Blutplasma etabliert, mittels derer umfangreiche Studien zur Pigmentverteilung von Tetrapyrrolen auf die wichtigsten Blutplasma-Fractionen durchgeführt werden konnten.

Die Pigmentverteilung konnte mit einer Reihe von chemischen Eigenschaften dieser Pigmente korreliert werden. Die hier vorliegende Studie mit insgesamt 22 untersuchten Pigmenten ist die erste systematische Arbeit zu diesem Thema, das für die PDT von zentraler Bedeutung ist. Die Stabilität und Art der Pigmentbindung an die Lipoproteine, sowie diesbezügliche Veränderungen über die Zeit wurden näher charakterisiert. Ebenso konnte die Aggregation und Deaggregation von Pigmenten in Blutplasma, in Detergens-Umgebung, und in FSM verfolgt werden.

Die Photostabilität von Tetrapyrrolen in Lipoproteinen, in Detergentien, und in wässrigen Lösungen wurde bestimmt, besonders in Abhängigkeit von der vorherrschenden Sauerstoff-Konzentration. Der bei Belichtung feststellbare Sauerstoff-Verbrauch konnte mittels einer Clark-Elektrode quantifiziert werden.

Durch Verwendung von ROS-Quenchern konnte gezeigt werden, dass in Lipoproteinen und in organischen Lösungsmitteln überwiegend Photoreaktionen des *Typs II*, d. h. unter Beteiligung von  $O_2(^1\Delta_g)$  stattfinden. Dies konnte in den Lipoproteinen durch HPTLC-Analysen der Oxidationsprodukte des endogenen Cholesterins der Lipoproteine verifiziert werden, in organischen Lösungsmitteln durch Zugabe von Cholesterin.

Es konnten photoinduzierte Veränderungen der Oberflächenladung von Lipoproteinen, sowie photoinduzierte Quervernetzungen und Fragmentierungen des Apolipoproteins A-I nachgewiesen werden.

Die photoinduzierten Hydro- und Endoperoxide wurden durch zwei fluoreszenzspektroskopische Testverfahren quantifiziert. Durch HPLC-Analysen belichteter Lipoproteine konnten sowohl Oxidationsprodukten der ROS-generierenden Tetrapyrrole selbst, als auch der endogenen Carotinoide der Lipoproteine identifiziert werden.

Vergleichende Studien in organischen Lösungsmitteln zeigten eine zum Teil unerklärliche Abhängigkeit der Photostabilität der Tetrapyrrole von der Art des verwendeten Lösungsmittels. Es konnte erstmals ein Photoprodukt isoliert und spektroskopisch charakterisiert werden, bei dem es photoinduziert zu einer kovalenten Bindung eines Lösungsmittelmoleküls (Aceton) an ein Tetrapyrrolmolekül (BChl *a*) kam.



## 6 ABSTRACT

The *Photodynamic Therapy (PDT)* of cancer has evolved into an established treatment in clinical routine. Key component of PDT is the photosensitizer; its physical, chemical and physiological properties strongly influence the success of the therapy. Detailed knowledge of the interactions and reactions between the photosensitizer and biological molecules in the native environment are important steps towards a more effective and reliable application of PDT. The following investigations have been made based on the development of new photosensitizers derived from bacteriochlorophyll.

Two methods for the fractionation of human blood plasma have been established, which allowed comprehensive studies concerning the distribution of tetrapyrroles on the major fractions of blood plasma, and their exchange dynamics.

The tetrapyrrole distribution has been correlated with several chemical properties of these pigments. The survey of 22 bacteriochlorophyllous pigments represents the first systematic work on this subject, which is of central importance for PDT. The stability and nature of pigment binding, as well as structure-related variations have been characterized over time. The aggregation and de-aggregation of pigments in blood plasma, in detergent environment, and in FSM (folded-sheet mesoporous materials) have been followed spectroscopically.

The photostability of tetrapyrroles has been determined in lipoproteins, in detergents, and in aqueous solutions, especially in relation to oxygen concentration. The photo-induced oxygen consumption has been quantified via a Clark-type electrode.

The usage of selective quenchers of reactive oxygen species (ROS) indicated a predominant occurrence of *type II* photoreactions (participation of singlet oxygen) in lipoproteins and organic solvents. This finding has been verified in lipoproteins by high performance thin-layer chromatography (HPTLC) of oxidation products of endogenous cholesterol; in the case of organic solvents cholesterol has been added externally.

Photo-induced modifications of the lipoprotein surface charge, as well as photo-induced crosslinking of the apolipoprotein A-I have been detected.

Photo-induced hydro- and endoperoxides have been quantified by two fluorometric assays. Several photo-oxidation products of exogenous tetrapyrroles and endogenous lipoprotein carotenoids have been identified by high performance liquid chromatography (HPLC).

Comparative investigations in organic solvents showed a partly unexplainable dependence of tetrapyrrole photo-stability on the nature of the used solvent. A photo-product has been isolated and spectroscopically characterized, which exhibits a covalent bond between a solvent molecule (acetone) and a tetrapyrrole molecule (BChl *a*).

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abuja PM, Albertini R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 306(1-2):1-17.
- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. 2001. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 74(5):656-69.
- Afri M, Frimer AA, Cohen Y. 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem Phys Lipids* 131(1):123-33.
- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. 1991. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* 51(21):5993-6.
- Aghahosseini F, Arbabi-Kalati F, Fashtami LA, Djavid GE, Fateh M, Beitollahi JM. 2006. Methylene blue-mediated photodynamic therapy: a possible alternative treatment for oral lichen planus. *Lasers Surg Med* 38(1):33-8.
- Alia (A), Mohanty P, Matysik J. 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21(2):195-200.
- Allen MT, Lynch M, Lagos A, Redmond RW, Kochevar IE. 1991. A wavelength dependent mechanism for rose bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. *Biochimica Et Biophysica Acta, General Subjects* 1075(1):42-9.
- Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH. 2004. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1(1):27-42.
- Anderson NL, Anderson NG. 2002. The human plasma proteome. History, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics* 1(11):845-67.
- Antoniou AC, Easton DF. 2006. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25(43):5898-905.
- Arab K, Steghens J-P. 2004. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem* 325(1):158-63.
- Arellano JB, Melo TB, Borrego CM, Garcia-Gil J, Naqvi KR. 2000. Nanosecond laser photolysis studies of chlorosomes and artificial aggregates containing bacteriochlorophyll *e*: evidence for the proximity of carotenoids and bacteriochlorophyll *a* in chlorosomes from *Chlorobium phaeobacteroides* strain CL 1401. *Photochem Photobiol* 72(5):669-75.
- Arellano JB, Melo TB, Borrego CM, Naqvi KR. 2002. Bacteriochlorophyll *e* monomers, but not aggregates, sensitize singlet oxygen: implications for a self-photoprotection mechanism in chlorosomes. *Photochem Photobiol* 76(4):373-80.
- Auler H, Banzer G. 1942. Role of porphyrins in tumor-bearing patients and animals. *Zeitschrift für Krebsforschung* 53:65-8.
- Avissar YJ, Moberg PA. 1995. The common origins of the pigments of life - early steps of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 44(3):221-42.
- Bachowski GJ, Ben-Hur E, Girotti AW. 1991. Phthalocyanine-sensitized lipid peroxidation in cell membranes: use of cholesterol and azide as probes of primary photochemistry. *J Photochem Photobiol B* 9(3-4):307-21.
- Bachowski GJ, Thomas JP, Girotti AW. 1988. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 23(6):580-6.
- Baker A, Kanofsky JR. 1992. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. *Photochem Photobiol* 55(4):523-8.
- Baraldi I, Carnevali A, Ponterini G, Vanossi D. 1995. Electronic spectrum of porphyrins. CS INDO CI study. *Theochem* 333(1-2):121-33.
- Bathen TF, Krane J, Engan T, Bjerve KS, Axelson D. 2000. Quantification of plasma lipids and apolipoproteins by use of proton NMR spectroscopy, multivariate and neural network analysis. *NMR Biomed* 13(5):271-88.

- Beale SI. 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 60(1):43-73.
- Beckwith ALJ, Davies AG, Davison IGE, Maccoll A, Mruzek MH. 1988. The mechanisms of the rearrangements of allylic hydroperoxides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (7):475-6.
- Beckwith ALJ, Davies AG, Davison IGE, Maccoll A, Mruzek MH. 1989. The mechanisms of the rearrangements of allylic hydroperoxides: 5 $\alpha$ -hydroperoxy-3 $\beta$ -hydroxycholest-6-ene and 7 $\alpha$ -hydroperoxy-3 $\beta$ -hydroxy-cholest-5-ene. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry* (1972-1999) (7):815-24.
- Beltramini M, Firey PA, Ricchelli F, Rodgers MAJ, Jori G. 1987. Steady-state and time-resolved spectroscopic studies on the hematoporphyrin-lipoprotein complex. *Biochemistry (Mosc)* 26(21):6852-8.
- Benedetti CE, Arruda P. 2002. Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol* 128(4):1255-63.
- Berdugo M, Bejjani RA, Valamanesh F, Savoldelli M, Jeanny J-C, Blanc D, Ficheux H, Scherz A, Salomon Y, BenEzra David, Behar-Cohen F. 2008. Evaluation of the new photosensitizer Stakel (WST-11) for photodynamic choroidal vessel occlusion in rabbit and rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(4):1633-44.
- Bilski P, Belanger AG, Chignell CF. 2002. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. *Free Radical Biology & Medicine* 33(7):938-46.
- Bitman J, Wood DL. 1982. An improved copper reagent for quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids. *Journal of Liquid Chromatography* 5(6):1155-62.
- Blache D, Rodriguez C, Davignon J. 1995. Pro-oxidant effects of 7-hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol on the copper-initiated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett* 357(2):135-9.
- Bonnett R. 2000. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy* (Advanced Chemistry Texts Vol. 1). Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- Bonnett R, Charlesworth P, Djelal BD, Foley S, McGarvey DJ, Truscott TG. 1999a. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry* (2):325-8.
- Bonnett R, Djelal BD, Hamilton PA, Martinez G, Wierrani F. 1999b. Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study. *J Photochem Photobiol B* 53(1-3):136-43.
- Bonnett R, Martinez G. 2001. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 57(47): 9513-47.
- Bonnett R, Martinez G. 2002. Photobleaching of Compounds of the 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl) porphyrin Series (m-THPP, m-THPC, and m-THPBC). *Organic Letters* 4(12):2013-6.
- Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. 1989. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl) porphyrin series as tumor photosensitizers. *Biochem J* 261(1):277-80.
- Borisov SM, Blinova IA, Vasil'ev VV. 2002. The influence of dimerization of water-soluble metalloporphyrins as photosensitizers on the efficiency of generation of singlet oxygen. *High Energy Chemistry (Translation of Khimiya Vysokikh Energii)* 36(3):189-92.
- Bottone MG, Soldani C, Fraschini A, Alpini C, Croce AC, Bottiroli G, Pellicciari C. 2007. Enzyme-assisted photosensitization with rose Bengal acetate induces structural and functional alteration of mitochondria in HeLa cells. *Histochem Cell Biol* 127(3):263-71.
- Bourre L, Thibaut S, Briffaud A, Rousset N, Eleouet S, Lajat Y, Patrice T. 2002. Indirect detection of photosensitizer ex vivo. *J Photochem Photobiol B* 67(1):23-31.
- Brandis AS, Salomon Y, Scherz A. 2006a. Bacteriochlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol 25 - Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Eds: Grimm B, Porra R, Rüdiger W, Scheer H); Springer, Dordrecht, NL. p 485-494.

- Brandis AS, Salomon Y, Scherz A. 2006b. Chlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol 25 - Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Eds: Grimm B, Porra R, Rüdiger W, Scheer H); Springer, Dordrecht, NL. p 461-483.
- Brandis A, Mazor O, Neumark E, Rosenbach-Belkin V, Salomon Y, Scherz A. 2005. Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: Synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins. *Photochem Photobiol* 81(July/Aug.):983-93.
- Brandt R, Keston AS. 1965. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein; a stable reagent for fluorimetric analysis. *Anal Biochem* 11(1):6-9.
- Braslavsky SE, and others. 2007. Glossary of Terms Used in Photochemistry, 3rd edition (IUPAC recommendations 2006). *Pure Appl Chem* 79(3):293-465.
- Brault D. 1990. Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH. *J Photochem Photobiol B* 6(1-2):79-86.
- Brault D, Vever-Bizet C, Dellinger M. 1986. Fundamental aspects in tumor photochemotherapy: interactions of porphyrins with membrane model systems and cells. *Biochimie* 68(6):913-21.
- Brereton RG, Sanders JKM. 1983. Coordination and aggregation of bacteriochlorophyll a: an NMR and electronic absorption study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* (2):423-30.
- Brockmann HJr. 1968a. Further findings on chlorophyll and hemin. XVI. Absolute configuration of chlorophyll. *Angewandte Chemie, International Edition in English* 7(3):221-2.
- Brockmann HJr. 1968b. Further findings on chlorophyll and hemin. XVIII. Absolute configuration of bacteriochlorophyll. *Angewandte Chemie, International Edition in English* 7(3):222.
- Bronshtein I, Smith KM, Ehrenberg B. 2005. The effect of pH on the topography of porphyrins in lipid membranes. *Photochem Photobiol* 81(Mar./Apr.):446-51.
- Brun PH, DeGroot JL, Gudgin Dickson EF, Farahani M, Pottier RH. 2004. Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3(11-12):1006-10.
- Bröring M, Brandt CD. 2003. A five coordinate Pd(II) complex stable in solution and in the solid state. *Chem Commun (Camb)* (17):2156-7.
- Burkitt MJ. 2001. A Critical Overview of the Chemistry of Copper-Dependent Low Density Lipoprotein Oxidation: Roles of Lipid Hydroperoxides,  $\alpha$ -Tocopherol, Thiols, and Ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 394(1):117-35.
- Burrell JWK, Jackman LM, Weedon BCL. 1959. Stereochemistry and synthesis of phytol, geraniol, and nerol. *Proc. Chem. Soc.* 263-4.
- Callahan PM, Cotton TM. 1987. Assignment of bacteriochlorophyll a ligation state from absorption and resonance Raman spectra. *J Am Chem Soc* 109(23):7001-7.
- Candide C, Reyftmann JP, Santus R, Maziere JC, Morliere P, Goldstein S. 1988. Modification of  $\epsilon$ -amino group of lysines, cholesterol oxidation and oxidized lipid-apoprotein cross-link formation by porphyrin-photosensitized oxidation of human low density lipoproteins. *Photochem Photobiol* 48(2):137-46.
- Canoy D, Wareham N, Welch A, Bingham S, Luben R, Day N, Khaw K-T. 2005. Plasma ascorbic acid concentrations and fat distribution in 19,068 British men and women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Norfolk cohort study. *Am J Clin Nutr* 82(6):1203-9.
- Canti G, Marelli O, Ricci L, Nicolini A. 1981. Hematoporphyrin-treated murine lymphocytes: in vitro inhibition of DNA synthesis and light-mediated inactivation of cells responsible for graft vs. host reaction. *Photochem Photobiol* 34(5):589-94.
- Carlson LA. 1985. Extraction of lipids from human whole serum and lipoproteins and from rat liver tissue with methylene chloride-methanol: a comparison with extraction with chloroform-methanol. *Clin Chim Acta* 149(1):89-93.

- Carotenoids Handbook. 2004. (Eds: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H). Birkhäuser Verlag, Basel.
- Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 134(1):111-16.
- Chang CK, Hanson LK, Richardson PF, Young R, Fajer J. 1981.  $\pi$  Cation radicals of ferrous and free base isobacteriochlorins: Models for siroheme and sirohydrochlorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(5):2652-6.
- Chen Q, Huang Z, Chen H, Shapiro H, Beckers J, Hetzel FW. 2002. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 76(2):197-203.
- Chen X, Hui L, Foster DA, Drain CM. 2004. Efficient Synthesis and Photodynamic Activity of Porphyrin-Saccharide Conjugates: Targeting and Incapacitating Cancer Cells. *Biochemistry (Mosc)* 43(34):10918-29.
- Chopra M, Fitzsimons P, Hopkins M, Thurnham DI. 2001. Dialysis and gel filtration of isolated low density lipoproteins do not cause a significant loss of low density lipoprotein tocopherol and carotenoid concentration. *Lipids* 36(2):205-9.
- Clennan EL, Noe LJ, Wen T, Szneler E. 1989. Solvent effects on the ability of amines to physically quench singlet oxygen as determined by time-resolved infrared emission studies. *J Org Chem* 54(15):3581-4.
- Clennan EL, Pace A. 2005. Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron* 61(28):6665-91.
- Colussi VC, Feyes DK, Mulvihill JW, Li Y-S, Kenney ME, Elmets CA, Oleinick NL, Mukhtar H. 1999. Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. *Photochem Photobiol* 69(2):236-41.
- Connolly JS, Samuel EB, Janzen AF. 1982. Effects of solvent on the fluorescence properties of bacteriochlorophyll *a*. *Photochem Photobiol* 36(5):565-74.
- Corey EJ, Mehrotra MM, Khan AU. 1987. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 145(2):842-6.
- Cox GS, Bobillier C, Whitten DG. 1982. Photooxidation and singlet oxygen sensitization by protoporphyrin IX and its photooxidation products. *Photochem Photobiol* 36(4):401-7.
- Cox GS, Whitten DG. 1982. Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in solution. *J Am Chem Soc* 104(2):516-21.
- Crabbe P, Djerassi C, Eisenbraun EJ, Liu S. 1959. Optical rotatory dispersion studies. XXIX. Absolute configuration of phytol. *Proc. Chem. Soc.* 264-5.
- CRC Handbook of Chemistry and Physics (88<sup>th</sup> Ed.). 2008. (Editor-in-Chief: Lide DR). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Cunderlikova B, Kongshaug M, Gangeskar L, Moan J. 2000. Increased binding of chlorin e6 to lipoproteins at low pH values. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32(7):759-68.
- Daghashtanli NA, Itri R, Baptista MS. 2008. Singlet oxygen reacts with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and contributes to the formation of 2',7'-dichlorofluorescein. *Photochem Photobiol* 84(5):1238-43.
- Damoiseau X, Tfibel F, Hoebeke M, Fontaine-Aupart M-P. 2002. Effect of aggregation on bacteriochlorin a triplet-state formation: a laser flash photolysis study. *Photochem Photobiol* 76(5):480-5.
- Darmanyan AP, Jenks WS, Jardon P. 1998. Charge-Transfer Quenching of Singlet Oxygen  $O_2(^1\Delta_g)$  by Amines and Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Physical Chemistry A* 102(38):7420-6.
- Davies IG, Graham JM, Griffin BA. 2003. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. *Clinical Chemistry (Washington, DC, United States)* 49(11):1865-72.
- Davies MJ. 2004. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3(1):17-25.
- Diamond I, Granelli S G, McDonagh A F, Nielsen S, Wilson C B, Jaenicke R. 1972. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet* 2(7788):1175-7.
- Ditson SL, Davis RC, Pearlstein RM. 1984. Relative enrichment of P-870 in photosynthetic reaction centers treated with sodium borohydride. *Biochimica Et Biophysica Acta, Bioenergetics* 766(3):623-9.

- Dougherty T J. 1974. Activated dyes as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst* 52(4):1333-6.
- Dougherty TJ. 1983. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. *Photochem Photobiol* 38(3):377-9.
- Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. 1975. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 55(1):115-21.
- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38(8):2628-35.
- Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, Goldfarb A. 1979. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 62(2):231-7.
- Dougherty Thomas J. 2002. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* 20(1):3-7.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. 1998. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90(12):889-905.
- Dubbelman TMAR, De Goeij AFPM, Van Steveninck J. 1978. Photodynamic effects of protoporphyrin on human erythrocytes. Nature of the cross-linking of membrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta, Biomembranes* 511(2):141-51.
- Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. 1997. The carotenoids as anti-oxidants – a review. *J Photochem Photobiol B* 41(3):189-200.
- Ehrenberg B, Gross E. 1988. The effect of liposomes' membrane composition on the binding of the photosensitizers HPD and Photofrin II. *Photochem Photobiol* 48(4):461-6.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology & Medicine* 13(4):341-90.
- Evans TA, Katz JJ. 1975. Evidence for 5- and 6-coordinated magnesium in bacteriochlorophyll a from visible absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta, Bioenergetics* 396(3):414-26.
- Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P. 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* 57(12):787-96.
- Fenton C, Perry CM. 2006. Verteporfin. A review of its use in the management of subfoveal choroidal neovascularization. *Drugs & Aging* 23(5):421-45.
- Fiedor J, Fiedor L, Haeßner R, Scheer H. 2005. Cyclic endoperoxides of  $\beta$ -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochimica Et Biophysica Acta, Bioenergetics* 1709(1):1-4.
- Fiedor J, Fiedor L, Kammhuber N, Scherz A, Scheer H. 2002. Photodynamics of the bacteriochlorophyll-carotenoid system. 2. Influence of central metal, solvent and  $\beta$ -carotene on photobleaching of bacteriochlorophyll derivatives. *Photochem Photobiol* 76(2):145-52.
- Fiedor J, Fiedor L, Winkler J, Scherz A, Scheer H. 2001. Photodynamics of the bacteriochlorophyll-carotenoid system. 1. Bacteriochlorophyll-photosensitized oxygenation of  $\beta$ -carotene in acetone. *Photochem Photobiol* 74(1):64-71.
- Fiedor L, Stasiek M, Mysliwa-Kurczel B, Strzalka K. 2003. Phytol as one of the determinants of chlorophyll interactions in solution. *Photosynthesis Research* 78(1):47-57.
- Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ. 1948. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 68:640-41.
- Fingar V H. 1996. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 14(5):323-8.
- Fischer BB, Krieger-Liszkay A, Eggen RIL. 2004. Photosensitizers Neutral Red (Type I) and Rose Bengal (Type II) Cause Light-Dependent Toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii* and Induce the *Gpxh* Gene via Increased Singlet Oxygen Formation. *Environmental Science and Technology* 38(23):6307-13.
- Fischer BB, Krieger-Liszkay A, Eggen RIL. 2005. Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 168(3):747-59.

- Fleming I. 1967. Absolute configuration and the structure of chlorophyll. *Nature* (London, United Kingdom) 216(5111):151-2.
- Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. 1987. Nonenzymic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res* 28(12):1466-77.
- Foote CS. 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54(5):659.
- Foote CS, Denny RW. 1968. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. *J Am Chem Soc* 90(22):6233-5.
- Ford T, Graham J, Rickwood D. 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* 220(2):360-6.
- Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 2006. 5-aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol* 82(4):994-1015.
- Furukawa H, Kuroda K, Watanabe T. 2000. Adsorption of zinc-metalated chlorophyllous pigments on FSM-type mesoporous silica. *Chemistry Letters* (11):1256-7.
- Furukawa H, Watanabe T, Kuroda K. 2001. Immobilization of chlorophyll derivatives into mesoporous silica and energy transfer between the chromophores in mesopores. *Chemical Communications* (Cambridge, United Kingdom) (19):2002-3.
- Gaetke LM, Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189(1-2):147-63.
- Garbo GM. 1990. The use of liposomes, emulsions or inclusion complexes may potentiate in vivo effects of SnET2. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* 1203(Proc. Photodyn. Ther.: Mech. 2, 1990):118-25.
- Geiger PG, Korytowski W, Lin F, Girotti AW. 1997. Lipid peroxidation in photodynamically stressed mammalian cells: use of cholesterol hydroperoxides as mechanistic reporters. *Free Radical Biology & Medicine* 23(1):57-68.
- Geskes C, Hartwich G, Scheer H, Mäntele W, Heinze J. 1995. Electrochemical and spectroelectrochemical investigation of metal-substituted bacteriochlorophyll a. *J Am Chem Soc* 117(29):7776-83.
- Girotti AW. 1992. Photosensitized oxidation of cholesterol in biological systems: reaction pathways, cytotoxic effects and defense mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 13(2):105-18.
- Girotti AW. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39(8):1529-42.
- Girotti AW. 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 63(1-3):103-13.
- Girotti AW, Bachowski GJ, Jordan JE. 1987. Lipid peroxidation in erythrocyte membranes: cholesterol product analysis in photosensitized and xanthine oxidase-catalyzed reactions. *Lipids* 22(6):401-8.
- Girotti AW, Thomas JP, Jordan JE. 1985. Prooxidant and antioxidant effects of ascorbate on photosensitized peroxidation of lipids in erythrocyte membranes. *Photochem Photobiol* 41(3):267-76.
- Goedheer JC. 1958. Investigations on bacteriochlorophyll in organic solutions. *Biochim Biophys Acta* 27(3):478-90.
- Gold MH. 2006. Aminolevulinic acid photodynamic therapy: medical evidence for its expanded use. *Expert Review of Medical Devices* 3(3):357-71.
- Gottstein J, Scheer H. 1983. Long-wavelength-absorbing forms of bacteriochlorophyll a in solutions of Triton X-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8):2231-4.
- Gouterman M. 1961. Spectra of porphyrins. *J Mol Spectrosc* 6:138-63.
- Gouterman M, Wagniere G, Snyder LC. 1963. Spectra of porphyrins. II. Four-orbital model. *J Mol Spectrosc* 11(2):108-27.
- Graham J. 2001. *Biological Centrifugation*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.



- Graham JM, Higgins JA, Gillott T, Taylor T, Wilkinson J, Ford T, Billington D. 1996. A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. *Atherosclerosis (Shannon, Ireland)* 124(1):125-35.
- Greenspan P, Mao F, Ryu B-H, Gutman RL. 1995. Advances in agarose gel electrophoresis of serum lipoproteins. *J Chromatogr A* 698(1 + 2):333-9.
- Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. 1990. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis (Shannon, Ireland)* 83(1):59-67.
- Gross E, Malik Z, Ehrenberg B. 1987. Effects of membrane physical parameters on hematoporphyrin-derivative binding to liposomes: a spectroscopic study. *J Membr Biol* 97(3):215-21.
- Grossweiner LI, Patel AS, Grossweiner JB. 1982. Type I and Type II mechanisms in the photosensitized lysis of phosphatidylcholine liposomes by hematoporphyrin. *Photochem Photobiol* 36(2):159-67.
- Guzman-Chozas M, Vicario-Romero IM, Guillen-Sans R. 1998. 2-Thiobarbituric acid test for lipid oxidation in food: synthesis and spectroscopic study of 2-thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct. *J Am Oil Chem Soc* 75(12):1711-5.
- Haberland ME, Olch CL, Folgelman AM. 1984. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 259(18):11305-11.
- Hanson LK. 1991. Molecular orbital theory of monomer pigments. In: *Chlorophylls* (Ed: Scheer H), CRC Press, Boca Raton. p 993-1014.
- Hartwich G, Fiedor L, Simonin I, Cmiel E, Schäfer W, Noy D, Scherz A, Scheer H. 1998. Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 1. Preparation and Influence of Metal and Coordination on Spectra. *J Am Chem Soc* 120(15):3675-83.
- Hausmann W. 1911. The Sensitizing Action of Hematoporphyrin. *Biochem Z* 30:276-317.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. 1955. Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34:1345-53.
- Haylett AK, Moore JV. 2002. Comparative analysis of fetal calf and human low density lipoprotein: relevance for pharmacodynamics of photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 66(3):171-8.
- He XM, Carter DC. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature (London, United Kingdom)* 358(6383):209-15.
- Henderson BW, Dougherty TJ. 1992. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 55(1):145-57.
- Henderson BW, Dougherty TJ, Malone PB. 1984. Studies on the mechanism of tumor destruction by photoradiation therapy. *Prog Clin Biol Res* 170(Porphyrin Localization Treat. Tumors):601-12.
- Henderson BW, Waldow SM, Mang TS, Potter WR, Malone PB, Dougherty TJ. 1985. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res* 45(2):572-6.
- Hendry GAF, Houghton JD, Brown SB. 1987. Tansley review no. 11. The degradation of chlorophyll - a biological enigma. *New Phytologist* 107(2):255-302.
- Hockberger PE. 2002. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem Photobiol* 76(6):561-79.
- Hoebeke M, Damoiseau X, Schuitmaker HJ, Van de Vorst A. 1999. Fluorescence, absorption and electron spin resonance study of bacteriochlorin a incorporation into membrane models. *Biochimica Et Biophysica Acta, Biomembranes* 1420(1-2):73-85.
- Hoebeke M. 2000. ESR associated to spin label method in the study of photosensitization in liposomal solution. *Bulletin De La Societe Royale Des Sciences De Liege* 69(2-3):103-10.
- Hoebeke M, Damoiseau X. 2002. Determination of the singlet oxygen quantum yield of bacteriochlorin a: a comparative study in phosphate buffer and aqueous dispersion of dimiristoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholine liposomes. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1(4):283-7.

- Hoff HF, O'Neil J. 1993. Structural and functional changes in LDL after modification with both 4-hydroxynonenal and malondialdehyde. *J Lipid Res* 34(7):1209-17.
- Hoff HF, Whitaker TE, O'Neil J. 1992. Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. *J Biol Chem* 267(1):602-9.
- Holt AS, Jacobs EE. 1954. Spectroscopy of plant pigments. II. Methyl bacteriochlorophyllide and bacteriochlorophyll. *Am J Bot* 41:718-22.
- Holt AS. 1959. Reduction of chlorophyllides, chlorophylls, and chlorophyll derivatives by sodium borohydride. *Plant Physiol* 34:310-14.
- Hopkinson HJ, Vernon DI, Brown SB. 1999. Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma. *Photochem Photobiol* 69(4):482-8.
- Hoppe-Seyler F. 1871. Das Hämatin. *Tübinger Med-Chem Untersuchungen* 4:523-33.
- Howard JA, Ingold KU. 1968. Self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. *J Am Chem Soc* 90(4):1056-8.
- Hynninen PH, Lotjonen S. 1985. Steric interaction between the peripheral substituents of 10(S)-chlorophyll derivatives and its conformational consequences: a proton magnetic resonance study. *Magnetic Resonance in Chemistry* 23(8):605-15.
- IARC Monographs Database on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (<http://monographs.iarc.fr>)
- Inagaki S, Fukushima Y, Kuroda K. 1993. Synthesis of highly ordered mesoporous materials from a layered polysilicate. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (8):680-2.
- Inagaki S, Fukushima Y, Okada A, Fukumoto K, Kuroda K (inventors). 1995. (Toyota Motor Corp. J, assignee. 19950117). Heat-resistant, layered porous silica, and its manufacture. US A 5382558.
- Inagaki S, Fukushima Y, Okada A, Kato C, Kuroda K (inventors). 1998. (Kabushiki Kaisha Toyota Chuo Kenkyusho J, assignee. 19980113). Manufacture of porous material composed of layered silica and metal oxide. US A 5707598.
- Iturraspe J, Gossauer A. 1991. Dependence of the regioselectivity of photo-oxidative ring opening of the chlorophyll macrocycle on the complexed metal ion. *Helv Chim Acta* 74(8):1713-17.
- Jacob SW, Herschler R. 1986. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 23(1):14-27.
- Jahn D. 1992. Complex formation between glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase during the tRNA-dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 314(1):77-80.
- James DA, Swamy N, Paz N, Hanson RN, Ray R. 1999. Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9(16):2379-84.
- James RW, Hochstrasser D, Tissot JD, Funk M, Appel R, Barja F, Pellegrini C, Muller AF, Pometta D. 1988. Protein heterogeneity of lipoprotein particles containing apolipoprotein A-I without apolipoprotein A-II and apolipoprotein A-I with apolipoprotein A-II isolated from human plasma. *J Lipid Res* 29(12):1557-71.
- Jauhiainen M, Huuskonen J, Baumann M, Metso J, Oka T, Egashira T, Hattori H, Olkkonen VM, Ehnholm C. 1999. Phospholipid transfer protein (PLTP) causes proteolytic cleavage of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 40(4):654-64.
- Jayaraman S, Gantz DL, Gursky O. 2007. Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein. *Biochemistry (Mosc)* 46(19):5790-7.
- Jesionek A., von Tappeiner H. 1905. Zur Behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden Stoffen. *Dtsch Arch Klin Med* 85:223-9.
- Jori G, Beltramini M, Reddi E, Salvato B, Pagnan A, Ziron L, Tomio L, Tsanov T. 1984. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Letters (Shannon, Ireland)* 24(3):291-7.
- Jori G, Reddi E. 1993. The role of lipoproteins in the delivery of tumor-targeting photosensitizers. *Int J Biochem* 25(10):1369-75.

- Jyothish K, Avirah RR, Ramaiah D. 2006. Synthesis of new cholesterol- and sugar-anchored squaraine dyes: Further evidence of how electronic factors influence dye formation. *Organic Letters* 8(1):111-4.
- Kania A, Fiedor L. 2006. Steric Control of Bacteriochlorophyll Ligation. *J Am Chem Soc* 128(2):454-8.
- Kanofsky JR. 1990. Quenching of singlet oxygen by human plasma. *Photochem Photobiol* 51(3):299-303.
- Katritzky AR, Fara DC, Yang H, Tämm K, Tamm T, Karelson M. 2004. Quantitative Measures of Solvent Polarity. *Chemical Reviews* (Washington, DC, United States) 104(1):175-98.
- Kattermann R, Jaworek D, Moeller G, Assmann G, Bjoerkhem I, Svensson L, Borner K, Boerma G, Leijnse B, et al. 1984. Multicenter study of a new enzymic method of cholesterol determination. *J Clin Chem Clin Biochem* 22(3):245-51.
- Katz JJ, Norman GD, Svec WA, Strain HH. 1968. Chlorophyll diastereoisomers. Nature of chlorophylls *a'* and *b'* and evidence for bacteriochlorophyll epimers from proton magnetic resonance studies. *J Am Chem Soc* 90(24):6841-5.
- Kelleher DK, Thews O, Scherz A, Salomon Y, Vaupel P. 2004. Perfusion, oxygenation status and growth of experimental tumors upon photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide. *Int J Oncol* 24(6):1505-11.
- Kelly JF, Snell ME. 1976. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol* 115(2):150-1.
- Kennedy TA, Liebler DC. 1992. Peroxyl radical scavenging by  $\beta$ -carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J Biol Chem* 267(7):4658-63.
- Kepczynski M, Pandian RP, Smith KM, Ehrenberg B. 2002. Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? *Photochem Photobiol* 76(2):127-34.
- Kessel D. 1992. Properties of Cremophor EL micelles probed by fluorescence. *Photochem Photobiol* 56(4):447-51.
- Kessel D, Garbo GM, Hampton J. 1993. The role of lipoproteins in the distribution of tin etiopurpurin (SnET2) in the tumor-bearing rat. *Photochem Photobiol* 57(2):298-301.
- Kessel D, Luo Y. 1998. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B* 42(2):89-95.
- Kessel D, Morgan A, Garbo GM. 1991. Sites and efficacy of photodamage by tin etiopurpurin in vitro using different delivery systems. *Photochem Photobiol* 54(2):193-6.
- Kessel D, Thompson P, Saatio K, Nantwi KD. 1987. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem Photobiol* 45(6):787-90.
- Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JCJ. 1992. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem* 64(18):2111-22.
- Khachik F, Spangler CJ, Smith JCJr, Canfield LM. 1997. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem* 69(10):1873-81.
- Kim WS. 1966. Complete fractionation of bacteriochlorophyll and its degradation products. *Biochimica Et Biophysica Acta, Biophysics Including Photosynthesis* 112(3):392-402.
- Klein G, Michaelis J, Spix C, Wibbing R, Eggers G, Ritter J, Kaatsch P. 2003. Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer. *Eur J Cancer* 39(6):808-17.
- Klonis N, Sawyer WH. 2000. Effect of solvent-water mixtures on the prototropic equilibria of fluorescein and on the spectral properties of the monoanion. *Photochem Photobiol* 72(2):179-85.
- Kochevar IE, Bouvier J, Lynch M, Lin C-W. 1994. Influence of dye and protein location on photosensitization of the plasma membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta, Biomembranes* 1196(2):172-80.
- Kongshaug M, Moan J, Brown SB. 1989. The distribution of porphyrins with different tumor localizing ability among human plasma proteins. *Br J Cancer* 59(2):184-8.

- Kongshaug M. 1992. Distribution of tetrapyrrole photosensitizers among human plasma proteins. *Int J Biochem* 24(8):1239-65.
- Kongshaug M, Cheng LS, Moan J, Rimington C. 1991. Interaction of Cremophor EL with human plasma. *Int J Biochem* 23(4):473-8.
- Kongshaug M, Moan J, Cheng LS, Garbo GM, Kolboe S, Morgan AR, Rimington C. 1993. Binding of drugs to human plasma proteins, exemplified by tin(IV)-etiopurpurin dichloride delivered in Cremophor and DMSO. *Int J Biochem* 25(5):739-60.
- Kontush A, Meyer S, Finckh B, Kohlschütter A, Beisiegel U. 1996.  $\alpha$ -tocopherol as a reductant for Cu(II) in human lipoproteins. Triggering role in the initiation of lipoprotein oxidation. *J Biol Chem* 271(19):11106-12.
- Korbelik M. 1996. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 14(5):329-34.
- Korytowski W, Bachowski GJ, Girotti AW. 1991. Chromatographic separation and electrochemical determination of cholesterol hydroperoxides generated by photodynamic action. *Anal Biochem* 197(1):149-56.
- Kostner GM, März W. 2001. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen* (2. Auflage) (Eds.: Schwandt, P; Richter, WO; Parhofer KG). F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart. p 1-57.
- Koyama Y, Limantara L. 1998. Effects of singlet and triplet excitation, oxidation and axial coordination on the bond orders in the macrocycle of bacteriochlorophyll *a* as revealed by resonance Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 54A(9):1127-39.
- Kramarenko GG, Hummel SG, Martin SM, Buettner GR. 2006. Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol* 82(6):1634-7.
- Krasnovskii AA. 1948. Reversible photochemical reduction of chlorophyll by ascorbic acid. *Dokl Akad Nauk SSSR* 60:421-4.
- Krasnovsky AAJ. 1979. Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions. *Photochem Photobiol* 29(1):29-36.
- Krasnovsky AAJr, Cheng P, Blankenship RE, Moore TA, Gust D. 1993. The photophysics of monomeric bacteriochlorophylls *c* and *d* and their derivatives: properties of the triplet state and singlet oxygen photo-generation and quenching. *Photochem Photobiol* 57(2):324-30.
- Krasnovsky AAJr, Lopez J, Cheng P, Liddell PA, Blankenship RE, Moore TA, Gust D. 1994. Generation and quenching of singlet molecular oxygen by aggregated bacteriochlorophyll *d* in model systems and chlorosomes. *Photosynthesis Research* 40(2):191-8.
- Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. 2008. Robert Koch-Institut (Hrsg) und Die Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin.
- Krieg M, Whitten DG. 1984a. Self-sensitized photo-oxidation of protoporphyrin IX and related porphyrins in erythrocyte ghosts and microemulsions: a novel photo-oxidation pathway involving singlet oxygen. *Journal of Photochemistry* 25(2-4):235-52.
- Krieg M, Whitten DG. 1984b. Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX and related free-base porphyrins in natural and model membrane systems. Evidence for novel photooxidation pathways involving amino acids. *J Am Chem Soc* 106(8):2477-9.
- Kriska T, Girotti AW. 2004. Separation and quantitation of peroxidized phospholipids using high-performance thin-layer chromatography with tetramethyl-*p*-phenylenediamine detection. *Anal Biochem* 327(1):97-106.
- Kruse E, Mock H-P, Grimm B. 1995. Reduction of coproporphyrinogen oxidase level by antisense RNA synthesis leads to deregulated gene expression of plastid proteins and affects the oxidative defense system. *EMBO J* 14(15):3712-20.
- Kräutler B, Hörtensteiner S. 2006. Chlorophyll catabolites and the biochemistry of chlorophyll breakdown. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol 25 - Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Eds: Grimm B, Porra R, Rüdiger W, Scheer H); Springer, Dordrecht, NL. p 237-260.

- Kräutler B, Jaun B, Bortlik K, Schellenberg M, Matile P. 1991. The riddle of chlorophyll decomposition: constitution of a secoporphinoid catabolite. *Angewandte Chemie* 103(10):1354-7 (See also *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, (30)10, 1315-18).
- Kräutler B, Matile P. 1999. Solving the Riddle of Chlorophyll Breakdown. *Accounts of Chemical Research* 32(1): 35-43.
- Kunz L, MacRobert AJ. 2002. Intracellular photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (Foscan) exhibits a complex dependence on oxygen level and fluence rate. *Photochem Photobiol* 75(1):28-35.
- Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Miyazaki S, Shintani K, Seto M, Matsumine A, Hosoi H, Sugimoto T, Uchida A. 2005. Clinical outcome of a novel photodynamic therapy technique using acridine orange for synovial sarcomas. *Photochem Photobiol* 81(May/June):705-9.
- Körbler J. 1931. Untersuchung von Krebsgewebe im fluoreszenzerregenden Licht. *Strahlentherapie* 41:510-8.
- Lambert CR, Stiel H, Leupold D, Lynch MC, Kochevar IE. 1996a. Intensity-dependent enzyme photosensitization using 532 nm nanosecond laser pulses. *Photochem Photobiol* 63(2):154-60.
- Lambert CR, Black HS, Truscott TG. 1996b. Reactivity of butylated hydroxytoluene. *Free Radical Biology & Medicine* 21(3):395-400.
- Lassalle H-P, Bezdetsnaya L, Iani V, Juzeniene A, Guillemin F, Moan J. 2004. Photodegradation and phototransformation of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC) in solution. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3(11-12):999-1005.
- Lee PC, Rodgers MAJ. 1983. Singlet molecular oxygen in micellar systems. 1. Distribution equilibria between hydrophobic and hydrophilic compartments. *J Phys Chem* 87(24):4894-8.
- Limantara L, Koehler P, Wilhelm B, Porra RJ, Scheer H. 2006. Photostability of bacteriochlorophyll *a* and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy. *Photochem Photobiol* 82(3):770-80.
- Limantara L, Sakamoto S, Koyama Y, Nagae H. 1997. Effects of nonpolar and polar solvents on the  $Q_x$  and  $Q_y$  energies of bacteriochlorophyll *a* and bacteriopheophytin *a*. *Photochem Photobiol* 65(2):330-7.
- Lindsay Smith JR, Calvin M. 1966. Chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll. *J Am Chem Soc* 88(19):4500-6.
- Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. 1961. Use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal of the National Cancer Institute (1940-1978)* 26:1-12.
- Llewellyn CA, Fauzi R, Mantoura C, Brereton RG. 1990. Products of chlorophyll Photodegradation – 2. Structural identification. *Photochem Photobiol* 52(5):1043-7.
- Lykkesfeldt J. 2007. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 380(1-2):50-8.
- Lynch SM, Frei B. 1993. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J Lipid Res* 34(10):1745-53.
- Lynch SM, Frei B. 1995. Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein (LDL). Implications for metal ion-dependent oxidative modification of LDL. *J Biol Chem* 270(10):5158-63.
- Lämmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London, United Kingdom)* 227(5259):680-5.
- Mali SL, VAidya V, Pitliya RL, Vaidya VK, Ameta SC. 1994. Photochemical oxidation of dimethyl sulfoxide by singlet oxygen. *Asian Journal of Chemistry* 6(4):796-800.
- Maman N, Brault D. 1998. Kinetics of the interactions of a dicarboxylic porphyrin with unilamellar lipidic vesicles: interplay between bilayer thickness and pH in rate control. *Biochimica Et Biophysica Acta, Biomembranes* 1414(1-2):31-42.
- Marsh DF, Mink LM. 1996. Microscale synthesis and electronic absorption spectroscopy of tetraphenylporphyrin  $H_2(TPP)$  and metalloporphyrins  $Zn^{II}(TPP)$  and  $Ni^{II}(TPP)$ . *J Chem Educ* 73(12):1188-90.
- Marsh KL, Connolly JS. 1984. Effects of solvent on the rate of bacteriochlorophyll *a* photo-oxidation. *Journal of Photochemistry* 25(2-4):183-95.

- Matile P, Hortensteiner S, Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:67-95.
- Mazaki H, Watanabe T. 1990. Self-catalyzed epimerization of chlorophyll *a/a'* in organic solvents. *Biochimica Et Biophysica Acta, Bioenergetics* 1016(2):190-6.
- Mazaki H, Watanabe T, Takahashi T, Struck A, Scheer H. 1992. Epimerization of chlorophyll derivatives. V. Effects of the central magnesium and ring substituents on the epimerization of chlorophyll derivatives. *Bull Chem Soc Jpn* 65(11):3080-7.
- Merkel PB, Kearns DR. 1972. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J Am Chem Soc* 94(21):7244-53.
- Meyer-Betz F. 1913. Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Hematoporphyrins und anderer Derivative des Blut- und Gallenfarbstoffs. *Dtsch Arch Klin Med* 112:476-503.
- Michaeli A, Feitelson J. 1994. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem Photobiol* 59(3):284-9.
- Milde J, Elstner EF, Grassmann J. 2007. Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(8):956-61.
- Moan J, Peng Q. 2003. An outline of the history of PDT. *Comprehensive Series in Photochemistry & Photobiology* 2(Photodynamic Therapy):1, 3-17.
- Moan J. 1986. Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem Photobiol* 43(6):681-90.
- Moan J, Berg K. 1992. Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem Photobiol* 55(6):931-48.
- Moan J, Sommer S. 1983. Uptake of the components of hematoporphyrin derivative by cells and tumors. *Cancer Letters (Shannon, Ireland)* 21(2):167-74.
- Moan J, Sommer S. 1985. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res* 45(4):1608-10.
- Mock H-P, Grimm B. 1997. Reduction of uroporphyrinogen decarboxylase by antisense RNA expression affects activities of other enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis and leads to light-dependent necrosis. *Plant Physiol* 113(4):1101-12.
- Monroe BM. 1977. Quenching of singlet oxygen by aliphatic amines. *J Phys Chem* 81(19):1861-4.
- Montenegro MA, Nazareno MA, Durantini EN, Borsarelli CD. 2002. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. *Photochem Photobiol* 75(4):353-61.
- Moor ACE. 2000. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 57(1):1-13.
- Moss GP. 1988. Nomenclature of tetrapyrroles. Recommendations 1986. *Eur J Biochem* 178(2):277-328.
- Murata S, Furukawa H, Kuroda K. 2001. Effective Inclusion of Chlorophyllous Pigments into Mesoporous Silica Modified with  $\alpha,\omega$ -Diols. *Chemistry of Materials* 13(8):2722-9.
- Murata S, Hata H, Kimura T, Sugahara Y, Kuroda K. 2000. Effective Adsorption of Chlorophyll *a* by FSM-Type Mesoporous Silica Modified with 1,4-Butanediol. *Langmuir* 16(18):7106-8.
- Musewald C, Hartwich G, Pöllinger-Dammer F, Lossau H, Scheer H, Michel-Beyerle ME. 1998. Time-Resolved Spectral Investigation of Bacteriochlorophyll *a* and Its Transmetalated Derivatives [Zn]-Bacteriochlorophyll *a* and [Pd]-Bacteriochlorophyll *a*. *Journal of Physical Chemistry B* 102(42):8336-42.
- Nair V, Turner GA. 1984. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids* 19(10):804-5.
- Nambisan R N, Karakousis C P, Holyoke E D, Dougherty T J. 1988. Intraoperative photodynamic therapy for retroperitoneal sarcomas. *Cancer* 61(6):1248-52.
- Nijsten TEC, Stern RS. 2003. The increased risk of skin cancer is persistent after discontinuation of psoralen + ultraviolet A: A cohort study. *J Invest Dermatol* 121(2):252-8.
- Noble RP. 1968. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 9(6):693-700.

- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KLE, Wolff SP. 1996. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J* 313(3):781-6.
- Noy D, Fiedor L, Hartwich G, Scheer H, Scherz A. 1998. Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 2. Changes in Redox Potentials and Electronic Transition Energies Are Dominated by Intramolecular Electrostatic Interactions. *J Am Chem Soc* 120(15):3684-93.
- Oda I, Hirata K, Watanabe S, Shibata Y, Kajino T, Fukushima Y, Iwai S, Itoh S. 2006. Function of Membrane Protein in Silica Nanopores: Incorporation of Photosynthetic Light-Harvesting Protein LH2 into FSM. *Journal of Physical Chemistry B* 110(3):1114-20.
- Oettl K, Stauber RE. 2007. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 151(5):580-90.
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I and others. 2003. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(10):2320-32.
- Ouannes C, Wilson T. 1968. Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines. Effect of DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane). *J Am Chem Soc* 90(23):6527-8.
- Ouedraogo GD, Redmond RW. 2003. Secondary reactive oxygen species extend the range of photosensitization effects in cells: DNA damage produced via initial membrane photosensitization. *Photochem Photobiol* 77(2):192-203.
- Palozza P, Krinsky NI. 1992.  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 297(1):184-7.
- Pandey RK, Constantine S, Tsuchida T, Zheng G, Medforth CJ, Aoudia M, Kozyrev AN, Rodgers MAJ, Kato H, Smith KM and others. 1997. Synthesis, photophysical properties, *in vivo* photosensitizing efficacy, and human serum albumin binding properties of some novel bacteriochlorins. *J Med Chem* 40(17):2770-9.
- Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. 1974. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N Engl J Med* 291(23):1207-11.
- Patel RP, Diczfalusy U, Dzeletovic S, Wilson MT, Darley-Usmar VM. 1996. Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. *J Lipid Res* 37(11):2361-71.
- Patsch W, Schonfeld G, Gotto AM Jr, Patsch JR. 1980. Characterization of human high density lipoproteins by zonal ultracentrifugation. *J Biol Chem* 255(7):3178-85.
- Policard A. 1924. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *C. R. Soc. Biol.* 91:1423-8.
- Polo L, Reddi E, Garbo GM, Morgan AR, Jori G. 1992. The distribution of the tumor photosensitizers zinc(II)-phthalocyanine and tin (IV)-etiopurpurin among rabbit plasma proteins. *Cancer Letters (Shannon, Ireland)* 66(3):217-23.
- Polo L, Bianco G, Reddi E, Jori G. 1995. The effect of different liposomal formulations on the interaction of Zn(II)-phthalocyanine with isolated low and high density lipoproteins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27(12):1249-55.
- Porra RJ. 1997. Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Photochem Photobiol* 65(3):492-516.
- Priebe H, Aukrust A, Bjorsvik HR, Tonseth CP, Wiggen UN. 1999. Stability of the X-ray contrast agent iodixanol = 3,3',5,5'-tetrakis(2,3-dihydroxypropylcarbonyl)-2,2',4,4',6,6'-hexaiodo-N,N'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)diacetanilide towards acid, base, oxygen, heat and light. *J Clin Pharm Ther* 24(3):227-35.
- Pruzinska A, Tanner G, Anders I, Roca M, Hörtensteiner S. 2003. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):15259-64.
- Pryor WA, Stanley JP. 1975. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 40(24):3615-7.

- Pryor WA, Stanley JP, Blair E. 1976. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11(5):370-9.
- Raab O. 1900. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol* 39:524-46.
- Ramaiah D, Joy A, Chandrasekhar N, Eldho NV, Das S, George MV. 1997. Halogenated squaraine dyes as potential photochemotherapeutic agents. Synthesis and study of photophysical properties and quantum efficiencies of singlet oxygen generation. *Photochem Photobiol* 65(5):783-90.
- Reed MWR, Wieman TJ, Schuschke DA, Tseng MT, Miller FN. 1989. A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. *Radiat Res* 119(3):542-52.
- Rehm H. 2000. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (3., überarb. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin.
- Reichardt C. 1965. Empirical parameters of solvent polarity. *Angew. Chem.* 77(1):29-40.
- Reichardt C. 1994. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chemical Reviews* (Washington, DC, United States) 94(8):2319-58.
- Reichardt C. 2007. Solvents and Solvent Effects: An Introduction. *Organic Process Research & Development* 11(1):105-13.
- Reyftmann JP, Morliere P, Goldstein S, Santus R, Dubertret L, Lagrange D. 1984. Interaction of human serum low density lipoproteins with porphyrins: a spectroscopic and photochemical study. *Photochem Photobiol* 40(6):721-9.
- PhotochemCAD Spectra. (<http://omlc.cgi.edu/spectra/PhotochemCAD/html>).
- Rodgers MAJ, Snowden PT. 1982. Lifetime of oxygen ( $O_2(^1\Delta_g)$ ) in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *J Am Chem Soc* 104(20):5541-3.
- Romanchik JE, Morel DW, Harrison EH. 1995. Distributions of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. *J Nutr* 125(10):2610-17.
- Rouquerol J, Avnir D, Fairbridge CW, Everett DH, Haynes JH, Pernicone N, Ramsay JDF, Sing KSW, Unger KK. 1994. Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure Appl Chem* 66(8):1739-58.
- Santos AE, Laranjinha JAN, Almeida LM. 1998. Sulfonated chloroaluminum phthalocyanine incorporates into human plasma lipoproteins: photooxidation of low-density lipoproteins. *Photochem Photobiol* 67(4):378-85.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65(7):1035-41.
- Scheer H. 2006. An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol 25 - Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Eds: Grimm B, Porra R, Rüdiger W, Scheer H); Springer, Dordrecht, NL. p 1-26.
- Scheer H. 2003. The pigments. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration 13 (Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis)* (Eds: Green BR, Parsons WW); Kluwer Academic Publ., Dordrecht, NL. p 29-81.
- Scheer H, Katz JJ. 1974. Structure of the Krasnovskii photoreduction product of chlorophyll a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(5):1626-9.
- Schenck GO, Krauch CH. 1963. Sulfones by photosensitized oxygen transfer to sulfoxides. *Chem Ber* 96:517-19.
- Scherer H. 1841. Chemisch-physiologische Untersuchungen. *Ann. D. Chem. Pharm.* 40:1-64.
- Scherz A, Brandis A, Mazor O, Salomon Y, Scheer H (inventors). 2004. (Yeda Research and Development Co. Ltd. I, assignee. 20040603). Preparation of water soluble anionic bacteriochlorophyll derivatives for use as cancer photodynamic therapy and diagnostic agents. WO A2 2004045492.
- Scherz A, Salomon Y, Brandis A, Scheer H (inventors). 2005. (Yeda Research and Development Co. Ltd. I, assignee. 20000615.) Palladium-substituted bacteriochlorophyll derivatives and use thereof. WO A1 2000033833.



- Schothorst AA, Van Steveninck J, Went LN, Suurmond D. 1972. Photodynamic damage of the erythrocyte membrane caused by protoporphyrin in protoporphyria and in normal red blood cells. *Clin Chim Acta* 39(1):161-70.
- Schuh J, Fairclough GFJr, Haschemeyer RH. 1978. Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(7):3173-7.
- Schwartz SK, Absolon K., Vermund H. 1955. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. *Univ. Minn. Med. Bull.* 27:7-8.
- SeaWiFS Biosphere Globes. ([http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/cgi/biosphere\\_globes.pl](http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/cgi/biosphere_globes.pl)).
- Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. 2006. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem* 39(9):947-54.
- Shen H-R, Spikes JD, Smith CJ, Kopecek J. 2000a. Photodynamic crosslinking of proteins IV. Nature of the His-His bond(s) formed in the Rose bengal-photosensitized crosslinking of *N*-benzoyl-L-histidine. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 130(1):1-6.
- Shen H-R, Spikes JD, Smith CJ, Kopecek J. 2000b. Photodynamic crosslinking of proteins V. Nature of the tyrosine-tyrosine bonds formed in the FMN-sensitized intermolecular crosslinking of *N*-acetyl-L-tyrosine. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 133(1-2):115-22.
- Shen H-R, Spikes JD, Kopecek P. 1996a. Photodynamic crosslinking of proteins. Model studies using histidine- and lysine-containing *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. *J Photochem Photobiol B* 34(2-3):203-10.
- Shen H-R, Spikes JD, Kopeckova P, Kopecek J. 1996b. Photodynamic crosslinking of proteins. II. Photocrosslinking of a model protein-ribonuclease A. *J Photochem Photobiol B* 35(3):213-9.
- Siedel J, Hägele E O, Ziegenhorn J, Wahlefeld A W. 1983. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 29(6):1075-80.
- Siedel J, Schmuck R, Staepels J, Town MH. 1993. Long term stable, liquid ready-to-use monoreagent for the enzymatic assay of serum or plasma triglycerides (GPO-PAP-method) Volume 39. p 1127.
- Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquerol J, Siemieniowska T. 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure Appl Chem* 57(4):603-19.
- Sinnhuber RO, Yu TC. 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thio-barbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Research* 23:626-33.
- Sjöback R, Nygren J, Kubista M. 1995. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 51A(6):L7-L21.
- Skrivanova K, Skorpikova J, Svihalek J, Mornstein V, Janisch R. 2006. Photochemical properties of a potential photosensitizer indocyanine green in vitro. *J Photochem Photobiol B* 85(2):150-4.
- Södergren E, Nourooz-Zadeh J, Berglund L, Vessby B. 1998. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylene orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J Biochem Biophys Methods* 37(3):137-46.
- Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. 1988. Enzymic modification of low density lipoprotein by purified lipoxigenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. *J Lipid Res* 29(6):745-53.
- Spikes JD, Bommer JC. 1993. Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorin  $e_6$  (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol* 58(3):346-50.
- Spikes JD, MacKnight ML. 1970. Dye-sensitized photooxidation of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 171(Art. 1):149-62.
- Spikes JD, Shen H-R, Kopeckova P, Kopecek J. 1999. Photodynamic crosslinking of proteins. III. Kinetics of the FMN- and rose bengal-sensitized photooxidation and intermolecular crosslinking of model tyrosine-containing *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. *Photochem Photobiol* 70(2):130-7.
- Spranger T, Finckh B, Fingerhut R, Kohlschutter A, Beisiegel U, Kontush A. 1998. How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem Phys Lipids* 91(1):39-52.

- Star WM, Marijnissen HP, van den Berg-Blok AE, Versteeg JA, Franken KA, Reinhold HS. 1986. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res* 46(5):2532-40.
- Stehle G, Wunder A, Schrenk HH, Hartung G, Heene DL, Sinn H. 1999. Albumin-based drug carriers: comparison between serum albumins of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate. *Anti-cancer Drugs* 10(8):785-90.
- Steiner MG, Babbs CF. 1990. Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide. *Arch Biochem Biophys* 278(2):478-81.
- Steinhardt J, Krijn J, Leidy JG. 1971. Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry (Mosc)* 10(22):4005-15.
- Stobart AK, Hendry GAF. 1984. The turnover of chlorophyll in greening wheat leaves. *Phytochemistry (Elsevier)* 23(1):27-30.
- Strain HH. 1954. Oxidation and isomerization reactions of the chlorophylls in killed leaves. *J Agric Food Chem* 2:1222-6.
- Strain HH, Manning WM. 1942. Isomerization of chlorophylls *a* and *b*. *J Biol Chem* 146:275-6.
- Stratton SP, Schaefer WH, Liebler DC. 1993. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene. *Chem Res Toxicol* 6(4):542-7.
- Struck A, Cmiel E, Katheder I, Schäfer W, Scheer H. 1992. Bacteriochlorophylls modified at position C-3: long-range intramolecular interaction with position C-132. *Biochimica Et Biophysica Acta, Bioenergetics* 1101(3):321-8.
- Stylli SS, Kaye AH. 2006a. Photodynamic therapy of cerebral glioma - A review Part I - A biological basis. *Journal of Clinical Neuroscience* 13(6):615-25.
- Stylli SS, Kaye AH. 2006b. Photodynamic therapy of cerebral glioma - A review Part II - Clinical studies. *Journal of Clinical Neuroscience* 13(7):709-17.
- Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. 1975. Characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 11(6):824-32.
- Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 12(6):1052-61.
- Suttnar J, Masova L, Dyr JE. 2001. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 751(1):193-7.
- Suzuki JY, Bollivar DW, Bauer CE. 1997. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu Rev Genet* 31:61-89.
- Takaichi S, Sandmann G, Schnurr G, Satomi Y, Suzuki A, Misawa N. 1996. The carotenoid 7,8-dihydro- $\psi$  end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*. *Eur J Biochem* 241(1):291-6.
- Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I. 1977. A new enzymic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta* 79(1):93-8.
- Takeda Y, Aono R, Doukyu N. 2006. Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Extremophiles* 10(4):269-77.
- Tanielian C, Heinrich G. 1995. Effect of aggregation on the hematoporphyrin-sensitized production of singlet molecular oxygen. *Photochem Photobiol* 61(2):131-5.
- Tanielian C, Schweitzer C, Mechin R, Wolff C. 2001. Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin derivative. *Free Radical Biology & Medicine* 30(2):208-12.
- Tanielian C, Wolff C. 1988. Mechanism of physical quenching of singlet molecular oxygen by chlorophylls and related compounds of biological interest. *Photochem Photobiol* 48(3):277-80.

- Tanielian C, Mechin R, Seghrouchni R, Schweitzer C. 2000. Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochem Photobiol* 71(1):12-9.
- Teuchner K, Stiel H, Leupold D, Scherz A, Noy D, Simonin I, Hartwich G, Scheer H. 1997. Fluorescence and excited state absorption in modified pigments of bacterial photosynthesis: A comparative study of metal-substituted bacteriochlorophylls a. *Journal of Luminescence* 72-74:612-4.
- Thomas JP, Kalyanaraman B, Girotti AW. 1994. Involvement of preexisting lipid hydroperoxides in Cu<sup>2+</sup>-stimulated oxidation of low-density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys* 315(2):244-54.
- Thomas MJ, Foote CS. 1978. Chemistry of singlet oxygen. XXVI. Photooxygenation of phenols. *Photochem Photobiol* 27(6):683-93.
- Thudichum JLW. 1867. Report on researches intended to promote an improved chemical identification of disease. In: 10th Report of the Medical Officer of the Privy Council. H.M. Stationary Office, London. pp. 152-95; 200; 227-233.
- Tokutake N, Jing B, Regen SL. 2004. Probing the hydration of lipid bilayers using a solvent isotope effect on phospholipid mixing. *Langmuir* 20(21):8958-60.
- Trinder P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6(Pt. 1-2):24-7.
- Tsuchiya R, Fujisawa N. 1999. Historical survey of carcinoma of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6(2):165-70.
- Tyssandier V, Choubert G, Grolier P, Borel P. 2002. Carotenoids, mostly the xanthophylls, exchange between plasma lipoproteins. *Int J Vitam Nutr Res* 72(5):300-8.
- Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 67(5, Suppl., Genetic and Environmental Determinants of Copper Metabolism):952S-9S.
- Ueda J, Saito N, Shimazu Y, Ozawa T. 1996. A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys* 333(2):377-84.
- Vakrat-Haglilii Y, Weiner L, Brumfeld V, Brandis A, Salomon Y, McIlroy B, Wilson BC, Pawlak A, Rozanowska M, Sarna T and others. 2005. The Microenvironment Effect on the Generation of Reactive Oxygen Species by Pd-Bacteriopheophorbide. *J Am Chem Soc* 127(17):6487-97.
- van Dongen GAMS, Visser GWM, Vrouwenraets MB. 2004. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(1):31-52.
- von Liebig H. 1912. Resorcinolbenzein and Fluorescein (b). *Journal für Praktische Chemie (Leipzig)* 85:241-84.
- von Tappeiner H. 1900. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Münch. Med. Wochenschr.* 47:5-7.
- von Tappeiner H, Jesionek A. 1903. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch Med Wochenschr* 47:2042-4.
- von Tappeiner H, Jodlbauer A. 1904. Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 80:427-87.
- von Tappeiner H, Jodlbauer A. 1907. Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. *Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung.* F. C. W. Vogel, Leipzig.
- Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. 1994. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid *bis*-allylic hydrogen content. *Biochemistry (Mosc)* 33(15):4449-53.
- Watanabe T, Mazaki H, Nakazato M. 1987. Epimerization of chlorophyll derivatives. Part 3. Chlorophyll *a/a'* epimerization in organic solvents. *Biochimica Et Biophysica Acta, Bioenergetics* 892(2):197-206.
- Watanabe T, Nakazato M, Konno M, Saitoh S, Honda K. 1984. Epimerization of chlorophyll derivatives. Part 1. Epimerization in the pheophytin *a/a'* system. *Chemistry Letters* (8):1411-14.
- Webster LK, Woodcock DM, Rischin D, Millward MJ. 1997. Cremophor: pharmacological activity of an "inert" solubilizer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 3(4):186-92.

- Weersink RA, Bogaards A, Gertner M, Davidson SRH, Zhang K, Natchev G, Trachtenberg J, Wilson BC. 2005. Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: Clinical experience and practicalities. *J Photochem Photobiol B* 79(3):211-22.
- Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, Grossmann J, Mulvihill JW, Mukhtar H, Oleinick NL. 2000. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res* 6(5):2021-7.
- Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. 1995. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 24(2):663-1021.
- Williamson P, Mattocks K, Schlegel RA. 1983. Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochimica Et Biophysica Acta, Biomembranes* 732(2):387-93.
- Wolf AV, Brown MG, Prentiss PG. 1987. Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables. In: *CRC Handbook of Chemistry and Physics (67<sup>th</sup> Ed.)*. 1987. (Editor-in-Chief: Weast RC). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Woodburn K, Chang CK, Lee S, Henderson B, Kessel D. 1994. Biodistribution and PDT efficacy of a ketochlorin photosensitizer as a function of the delivery vehicle. *Photochem Photobiol* 60(2):154-9.
- Woodburn K, Kessel D. 1994. The alteration of plasma lipoproteins by Cremophor EL. *J Photochem Photobiol B* 22(3):197-201.
- Woodburn K, Kessel D. 1995. Effect of density-gradients on the binding of photosensitizing agents to plasma proteins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27(5):499-506.
- Woodhams JH, MacRobert AJ, Bown SG. 2007. The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6(12):1246-56.
- Wormald R, Evans J, Smeeth L, Henshaw K. 2007. Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* (3):CD002030.
- Yagi K. 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15(2):212-16.
- Yang T, Cui F-D, Choi M-K, Lin H, Chung S-J, Shim C-K, Kim D-D. 2007. Liposome Formulation of Paclitaxel with Enhanced Solubility and Stability. *Drug Delivery* 14(5):301-8.
- Yee MS, Pavitt DV, Tan T, Venkatesan S, Godsland IF, Richmond W, Johnston DG. 2008. Lipoprotein separation in a novel iodixanol density gradient, for composition, density, and phenotype analysis. *J Lipid Res* 49(6):1364-71.
- Yoshida T, Migita CT. 2000. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* 82(1-4):33-41.
- Young RH, Martin RH, Feriozi D, Brewer D, Kayser R. 1973. Mechanism of quenching of singlet oxygen by amines. III. Evidence for a charge-transfer-like complex. *Photochem Photobiol* 17(4):233-44.
- Zhang W, Asztalos B, Roheim PS, Wong L. 1998. Characterization of phospholipids in pre- $\alpha$  HDL: selective phospholipid efflux with apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 39(8):1601-7.
- Zonios G, Perelman L T, Backman V, Manoharan R, Fitzmaurice M, Van Dam J, Feld M S. 1999. Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps *in vivo*. *Appl Opt* 38(31):6628-37.

## Anhang A: Physiologische Funktionen und Biosynthese der Tetrapyrrole

### *Chlorophylle*

Die Hauptaufgabe der Chlorophylle ist im Gegensatz zu den meisten anderen pflanzlichen Pigmenten nicht das Anlocken von Insekten zur Bestäubung durch ihr Farbenspiel, sondern das Wahrnehmen der beiden wichtigsten Aufgaben innerhalb des Photosyntheseapparates. Zum einen sammeln sie das auftreffende Sonnenlicht und leiten es zu den zentralen Einheiten des Photosyntheseapparates, den *Reaktionszentren*, weiter. Zum anderen sind sie an der *Ladungstrennung* innerhalb der Reaktionszentren beteiligt – also jenes Prozesses, der zur Ausbildung des zur Energiegewinnung verwendeten Protonen-Gradienten führt.

In den photosynthetischen Systemen bakterieller photoautotropher Organismen finden die Bakteriochlorophylle Anwendung, die sich durch eine reduzierte C7-C8-Doppelbindung und eine 3-Acetyl-Gruppe von den entsprechenden Chlorophyllen unterscheiden.

### *Häme und Sirohäm*

Die Häme als Cofaktoren von Hämoglobin und Myoglobin sind mittels ihres zentralen Eisenatoms in der Lage, ein Sauerstoff-Molekül reversibel zu binden, und bilden damit die Grundlage für das Sauerstofftransport- und Sauerstoffspeicher-System des Körpers.

Als Cofaktoren der Cytochrome sind Häme beteiligt an den Elektronentransportketten der Atmungskette (Häm a, Häm b<sub>562</sub>, Häm b<sub>566</sub>, Häm c, und Häm c<sub>1</sub> der Komplexe III und IV) und der Photosynthese (Häm b<sub>563</sub> und Häm f des Cytochrom bf-Komplexes), wobei das Eisenatom seine Wertigkeit ändert ( $\text{Fe}^{2\oplus} \leftrightarrow \text{Fe}^{3\oplus}$ ). Auch die Nitrit-Reduktase enthält ein Häm als Cofaktor (Häm b<sub>557</sub>).

Ebenfalls kommen Häme als Redox-Cofaktoren bei Mono-Oxygenasen, z. B. bei Cytochrom P450-Systemen, und bei Peroxidasen vor. Die Cytochrom P450-Systeme spalten Sauerstoff unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten und übertragen eines der beiden Sauerstoffatome auf das Substrat, das andere wird als Wassermolekül freigesetzt. Die bekannteste Peroxidase, die Katalase, ist für die Disproportionierung von toxischem Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser verantwortlich.

Beim ebenfalls eisenhaltigen Sirohäm, einem Cofaktor sowohl der Nitrit-, wie auch der Sulfitreduktase in Pflanzen und Bakterien, handelt sich um ein Tetrapyrrol des Isobakteriochlorin-Typs, d. h. die C2-C3- und die C7-C8-Doppelbindung sind reduziert.

### *Phycobiline*

Die Phycobilisomen, die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien (früher als Blaualgen bezeichnet), Glaucocystophyceen, Cryptophyceen und Rhodophyceen (Rotalgen) enthalten verschiedene kovalent an Proteine verknüpfte Phycobiline. Diese offenkettigen und damit zentralmetallfreien Tetrapyrrole bewirken durch ihre energetische Staffelung, d. h. kurzweilig absorbierende in der Peripherie und langweilig absorbierende in unmittelbarer Umgebung des Reaktionszentrums, eine hocheffiziente Energie-Übertragung.

Auch die Phytochrome, sensorische Photorezeptoren in Pflanzen, Algen und Bakterien, verwenden Chromophore des Phycobilin-Typs. Die verschiedenen pflanzlichen Phytochrome steuern u. a. die individuelle Entwicklung des Organismus (z. B. die Samenkeimung).

### *Reduzierte Tetrapyrrole (Cobalamin, F430)*

Das Ringsystem des Cobalamins und des Cofaktors F430 ist unterbrochen, d. h. diese Verbindungen haben ihr aromatisches 18- $\pi$ -Elektronensystem verloren. Das ausschließlich von Mikroorganismen synthetisierte cobalthaltige Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) besitzt ein Corrin-Grundgerüst, das sich durch eine fehlende C20-Methinbrücke, d. h. eine direkte Verknüpfung C1-C19 auszeichnet. Ein Derivat des Cobalamins, das Coenzym B<sub>12</sub> (5'-Desoxyadenosylcobalamin) findet sich in der Methionin-Synthase und der Methylmalonyl-CoA-Mutase.

Der nickelhaltige Cofaktor F430 der Methyl-CoM-Reduktase ist direkt an der Methanbildung der methanogenen Archaeen (früher als Methanbakterien bezeichnet) beteiligt.

## **Chlorophyll-Biosynthese**

Die Biosynthese von Chlorophyll *a* lässt sich in drei klar abgegrenzte Abschnitte einteilen (Beale, 1999; Porra, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Scheer, 2003; Scheer, 2006):

- ① Synthese von 5-Aminolävulinsäure
- ② Synthese von Protoporphyrin IX aus acht Molekülen 5-Aminolävulinsäure
- ③ Synthese von Chlorophyll *a* aus Protoporphyrin IX

Die chemischen Strukturen der Intermediate dieser Synthesen, sowie die daran beteiligten Enzyme, sind den Abb. A-1, A-2 (① & ②), und A-3 (③) zu entnehmen.

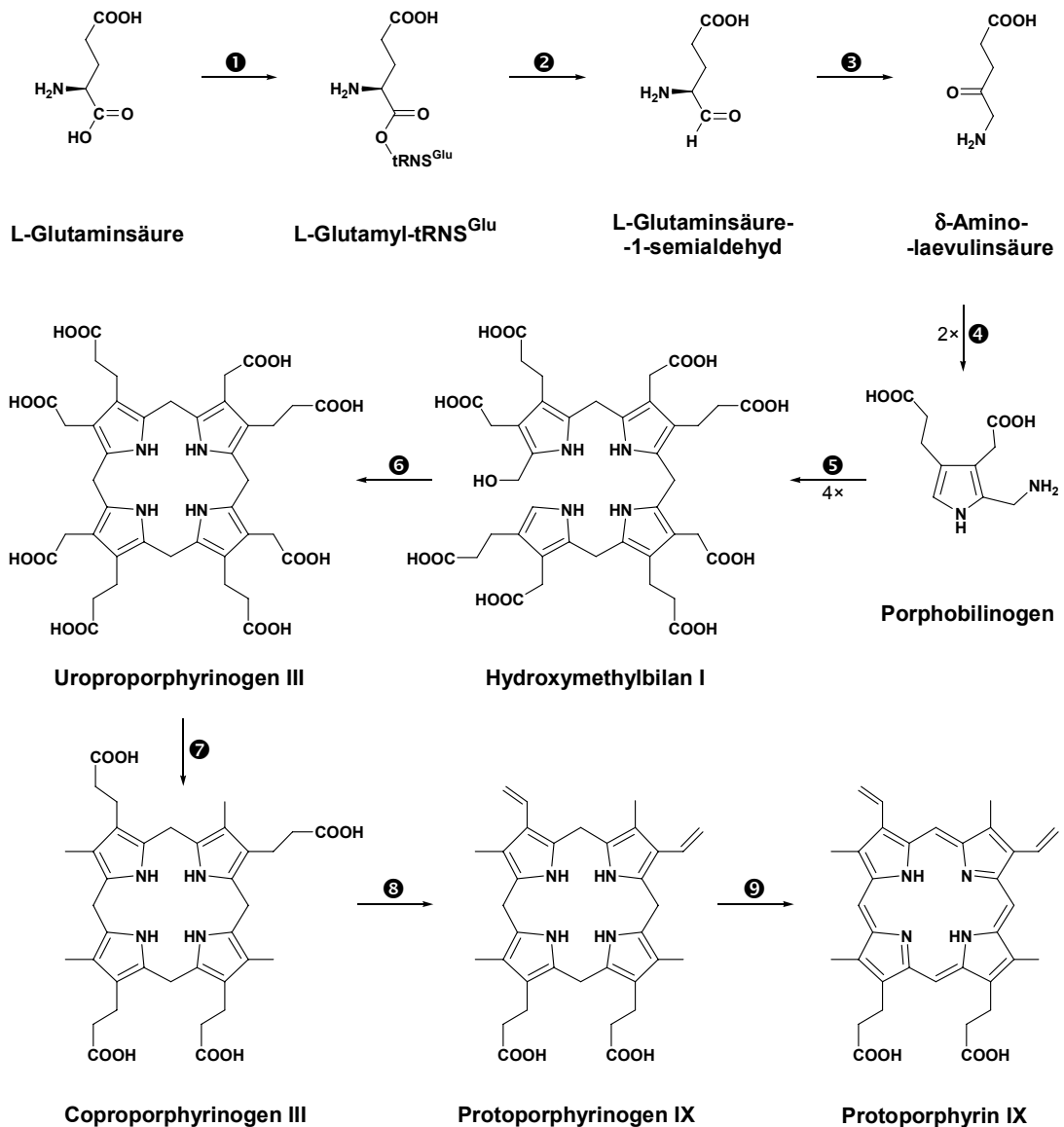


Abb. A-1: Biosynthese von Protoporphyrin IX (Proto IX) aus der Vorstufe L-Glutaminsäure (L-Glu). Die nummerierten Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert: **1** Glutamyl-tRNS-Synthetase, **2** Glutamyl-tRNS-Reduktase, **3** Glutamyl-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase **4** ALA-Dehydratase (= Porphobilinogen-Synthase) **5** Porphobilinogen-Deaminase (= Hydroxymethylbilan-Synthase) **6** Uroporphyrinogen III-Synthase, **7** Uroporphyrinogen III-Decarboxylase, **8** Coproporphyrinogen III-Oxidase, **9** Protoporphyrinogen IX-Oxidase.

In Anwesenheit von aminoacylierter tRNS<sup>Glu</sup> (L-Glutamyl-tRNS<sup>Glu</sup>) bildet sich ein Komplex aus Glutamyl-tRNS-Synthetase und Glutamyl-tRNS-Reduktase (Jahn, 1992). Auf diese Weise wird die für die Tetrapyrrol-Biosynthese erforderliche Menge an Glutamyl-tRNS<sup>Glu</sup> bereits auf der Stufe der Glutamyl-tRNS-Synthetase abgezweigt, so dass die Tetrapyrrol-Biosynthese nicht mit der Protein-Biosynthese um Glutamyl-tRNS<sup>Glu</sup> konkurrieren muss.

Der hier gezeigte C<sub>5</sub>-Weg der ALA-Synthese erfolgt in allen Pflanzen, Algen und phototrophen Bakterien, welche nicht der  $\alpha$ -Gruppe phototropher Bakterien angehören. In Tieren, Pilzen und der  $\alpha$ -Gruppe phototropher Bakterien dagegen erfolgt die Synthese der ALA über den C<sub>4+1</sub>-Weg (Shemin-Weg; Abb. A-2) (Avisar und Moberg, 1995). Dabei wird durch die ALA-Synthase ein Molekül Succinyl-CoA mit einem Molekül Glycin unter Abspaltung von Kohlendioxid und Coenzym A zu einem Molekül ALA verbunden.

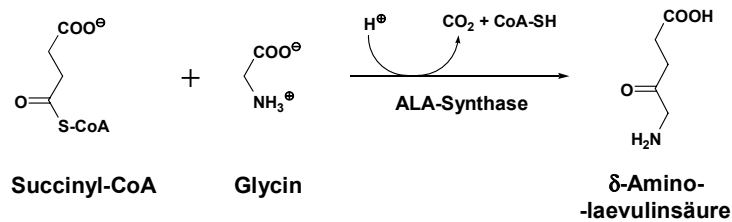


Abb. A-2: Biosynthese von ALA über den C<sub>4+1</sub>-Weg (Shemin-Weg) durch die ALA-Synthase aus Succinyl-CoA und Glycin.

Aus zwei Molekülen 5-Aminolävulinic acid (ALA) entsteht durch Kondensation das Monopyrrol Porphobilinogen (PBG), aus vier Molekülen PBG durch deaminierende Verknüpfungen das erste Tetrapyrrol des Biosyntheseweges, das offenkettige Hydroxymethylbilan (HMB). Für jedes synthetisierte Tetrapyrrol werden folglich acht Moleküle ALA benötigt.

Beim Ringschluss zum ersten geschlossenen Tetrapyrrol des Biosyntheseweges, zum Uroporphyrinogen III (Uro III), erfolgt eine Torsion des Ringes D. Dadurch kommen bei diesem Molekül die zwei Propionsäure-Seitengruppen der Ringe C und D nebeneinander zu liegen, im Gegensatz zu dem sich spontan, d. h. ohne enzymatische Mitwirkung bildenden Uroporphyrinogen I (Uro I).

Coproporphyrinogen III (Copro III) entsteht aus Uro III durch Decarboxylierung der vier Essigsäure-Seitengruppen, Protoporphyrinogen IX (Proto IX) aus diesem durch die oxidative Decarboxylierung der beiden Propionsäure-Seitengruppen der Ringe A und B. Durch die Oxidation der vier Methylen-Brücken des Proto IX wird Protoporphyrin IX (Proto IX) gebildet.

Der Chlorophyll-Biosyntheseweg führt über einige Intermediate zum Protochlorophyllid *a* (PChlid *a*), das sich vom Proto IX durch ein als Zentralmetall inseriertes Magnesium-Atom, die als Methylester vorliegende C13<sup>3</sup>-Carbonsäure, einen isocyclischen Ring E, sowie eine C8-Ethyl-Seitengruppe unterscheidet (Abb. A-3). PChlid *a* wird durch Reduktion der nicht-aromatischen C17-C18-Doppelbindung des Ringes D in Chlorophyllid *a* (Chlid *a*) überführt.



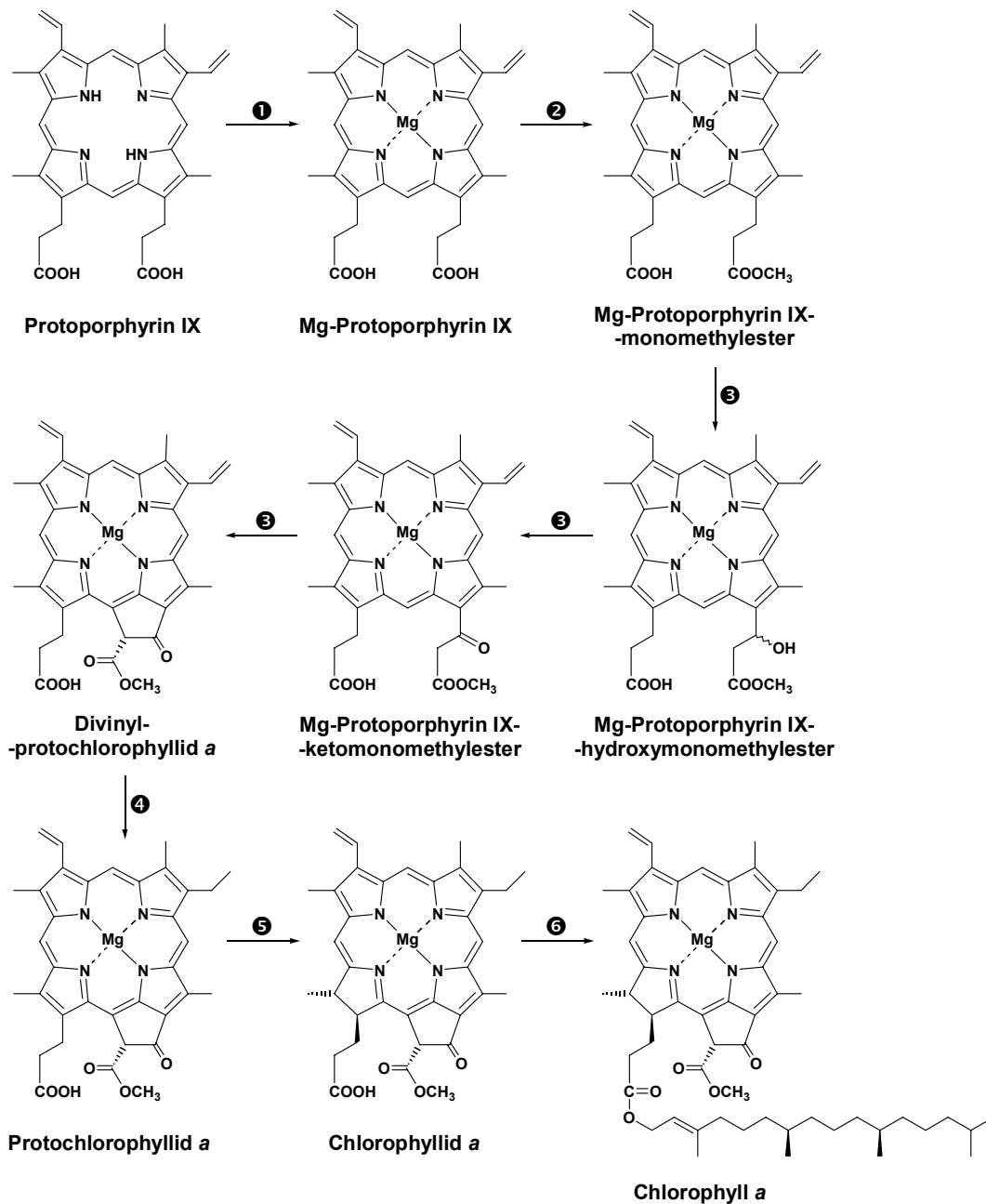


Abb. A-3: Biosynthese von Chlorophyll *a* (Chl *a*) aus der Vorstufe Protoporphyrin IX (Proto IX). Die nummerierten Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert: ❶ Mg-Protoporphyrin IX-Chelatase, ❷ S-Adenosyl-L-methionin:Mg-Protoporphyrin IX-Methyltransferase, ❸ Mg-Protoporphyrin IX-monomethylester Cyclase, ❹ Divinyl-protochlorophyllid-8-vinyl-Reduktase, ❺ licht-abhängige NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase oder lichtunabhängige Protochlorophyllid-Reduktase, ❻ Chlorophyll-Synthase.

Diese Reduktion erfolgt in den meisten Cyanobakterien, Algen, Moosen, Farnen und Gymnospermen entweder durch die lichtabhängige NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR bzw. LPOR) oder die licht-unabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (DPOR).

Angiospermen besitzen dagegen nur die lichtabhängige POR, anoxygene photosynthetische Bakterien nur die licht-unabhängige DPOR.

Aus dem Chlid *a* entsteht durch Veresterung der C17<sup>3</sup>-Carbonsäure mit Phytol (gelegentlich auch mit Geranylgeraniol) das Chlorophyll *a* (Chl *a*).

Durch zum Teil noch nicht vollständig erforschte Nebenwege gegen Ende der hier gezeigten Chlorophyll *a*-Biosynthese werden die Chlorophylle *b*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>, *c*<sub>3</sub>, sowie *d* gebildet. Allerdings weisen die Chlorophylle *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>, und *c*<sub>3</sub> kein Chlorin-, sondern ein Porphyrin-Grundgerüst auf.

### **Bakteriochlorophyll-Biosynthese**

Bakteriochlorophylle werden ausschließlich in den Lichtsammelkomplexen und Reaktionszentren photoautotropher Bakterien gefunden. Die chemischen Strukturen der Intermediate der Bakteriochlorophyll-Biosynthese, sowie die daran beteiligten Enzyme, sind der Abbildung A-4 zu entnehmen.

Durch Reduktion der nicht-aromatischen C7-C8-Doppelbindung des Ringes B, und durch Umbau der 3-Vinyl- in eine 3-Acetyl-Seitengruppe, wird Chlid *a* in Bakteriochlorophyllid *a* (BChlid *a*) umgewandelt. Es konnte bisher noch nicht völlig geklärt werden, ob die Reduktion der Doppelbindung auf der Stufe des 3-Vinyl-, 3-(1-Hydroxy)ethyl-, oder 3-Acetyl-Pigments stattfindet. Eventuell finden alle drei theoretisch möglichen Synthesewege in der Natur statt.

Aus dem BChlid *a* entsteht durch Veresterung der C17<sup>3</sup>-Carbonsäure mit verschiedenen langkettigen aliphatischen Alkoholen das Bakteriochlorophyll *a* (BChl *a*). Außer dem relativ häufig vorkommenden Phytol treten in Bakteriochlorophyllen oft Geranylgeraniol oder Farnesol auf, in seltenen Fällen auch Hexadecanol, Octadecanol, oder 2,10-Phytodienol.

Durch zum Teil noch nicht vollständig erforschte Nebenwege der hier gezeigten Bakteriochlorophyll *a*-Biosynthese werden die Bakteriochlorophylle *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, sowie *g* gebildet. Die Bakteriochlorophylle *c*, *d*, *e*, und *f* weisen jedoch kein Bakteriochlorin-, sondern ein Chlorin-Grundgerüst auf. Zusätzlich fehlt ihnen die C13<sup>3</sup>-Carbonsäuremethylester-Gruppe, d. h. es handelt sich bei diesen Pigmenten um sog. *Pyro-Verbindungen*.

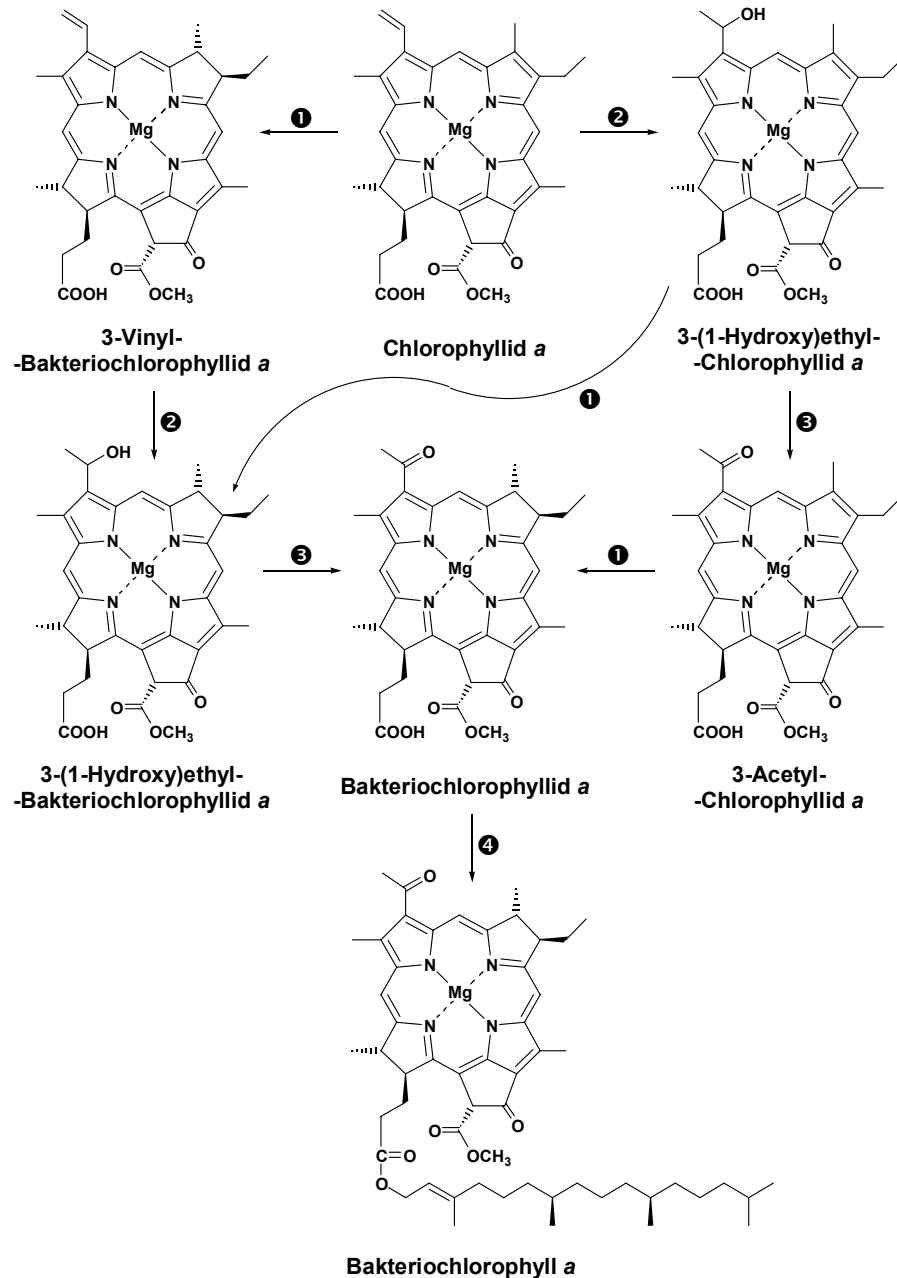


Abb. A-4: Biosynthese von Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) aus der Vorstufe Chlorophyllid *a* (Chlid *a*; oben Mitte). Es sind alle drei theoretischen Synthesewege dargestellt, die evtl. auch alle in der Natur stattfinden (①→②→③, ②→①→③, ②→③→①). Die nummerierten Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert: ① Chlorophyllid *a*-Reduktase, ② [3-Vinyl]-Bacteriochlorophyllid *a*-Hydratase, ③ [3-(1-Hydroxy)ethyl]-Bacteriochlorophyllid *a*-Dehydrogenase, ④ Bacteriochlorophyll *a*-Synthase.

Die absolute Stereochemie von Chl *a* ( $13^2R$ ,  $17S$ ,  $18S$ ) und BChl *a* ( $7R$ ,  $8R$ ,  $13^2R$ ,  $17S$ ,  $18S$ ) wurde 1967/68 aufgeklärt (Fleming, 1967; Brockmann, 1968a; Brockmann, 1968b), die des Phytols ( $2E$ ,  $7R$ ,  $11R$ ) bereits 1959 (Burrell, 1959; Crabbe, 1959).

## Stereochemie der (Bakterio)Chlorophylle an C13<sup>2</sup>

Aus sterischen Gründen sind die C13<sup>2</sup>-(S)-Epimere im Vergleich zu den C13<sup>2</sup>-(R)-Epimeren weniger bevorzugt, da bei diesen sowohl der C13<sup>2</sup>-Carbonsäuremethylester, wie auch der C17-Propionsäurephytolester (Pheophytine) oder die C17-Propionsäure (Pheophorbide) zur gleichen Seite bezüglich der Ringebene weisen (Hynninen und Lötjönen, 1985). Bei Chl *a* und BChl *a* liegen deshalb im Gleichgewicht nur ~25% der Pigmentmoleküle als C13<sup>2</sup>-(S)-Epimer vor (Mazaki *et al.*, 1992). Die beiden Formen stehen über eine gemeinsame Enolform im Gleichgewicht (Watanabe *et al.*, 1984).

Die C13<sup>2</sup>-(S)-Epimere von Chl *a* und Chl *b* wurden erstmals 1942 als in der Chromatographie auftretende Nebenbanden beschrieben, und wurden als Chl *a'* und Chl *b'* bezeichnet (Strain und Manning, 1942). Als Unterschied zwischen den beiden Formen wurde bereits 1954 ein räumlicher Austausch zwischen dem H-Atom und der Carbonsäuremethylester-Gruppe an C13<sup>2</sup> vermutet (Strain, 1954). Der Beweis für diese Hypothese konnte 1968 durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie erbracht werden (Katz *et al.*, 1968). Das zentrale Mg-Atom scheint bei der C13<sup>2</sup>-Epimerisierung eine katalytische Rolle zu spielen (Mazaki und Watanabe, 1990).

## Anhang B: Gouterman-Molekülorbitale und Konfigurationswechselwirkung

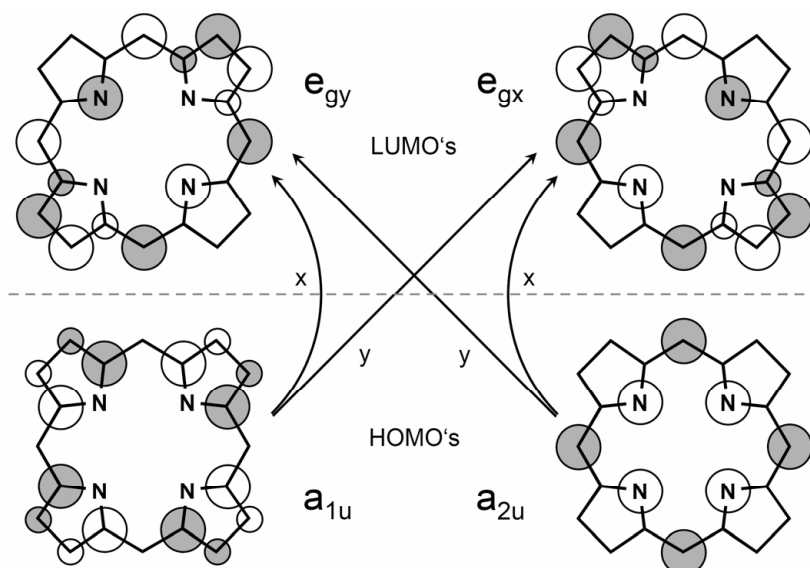


Abb. B-1: Graphische Darstellung der zur Erklärung der Absorptionsbanden relevanten Molekülorbitale eines Porphyrins (nach Gouterman, 1961). Die Größe der Kreise entspricht der räumlichen Ausdehnung, die Farbe der Kreise dem Vorzeichen der Wellenfunktion am jeweiligen C- oder N-Atom.

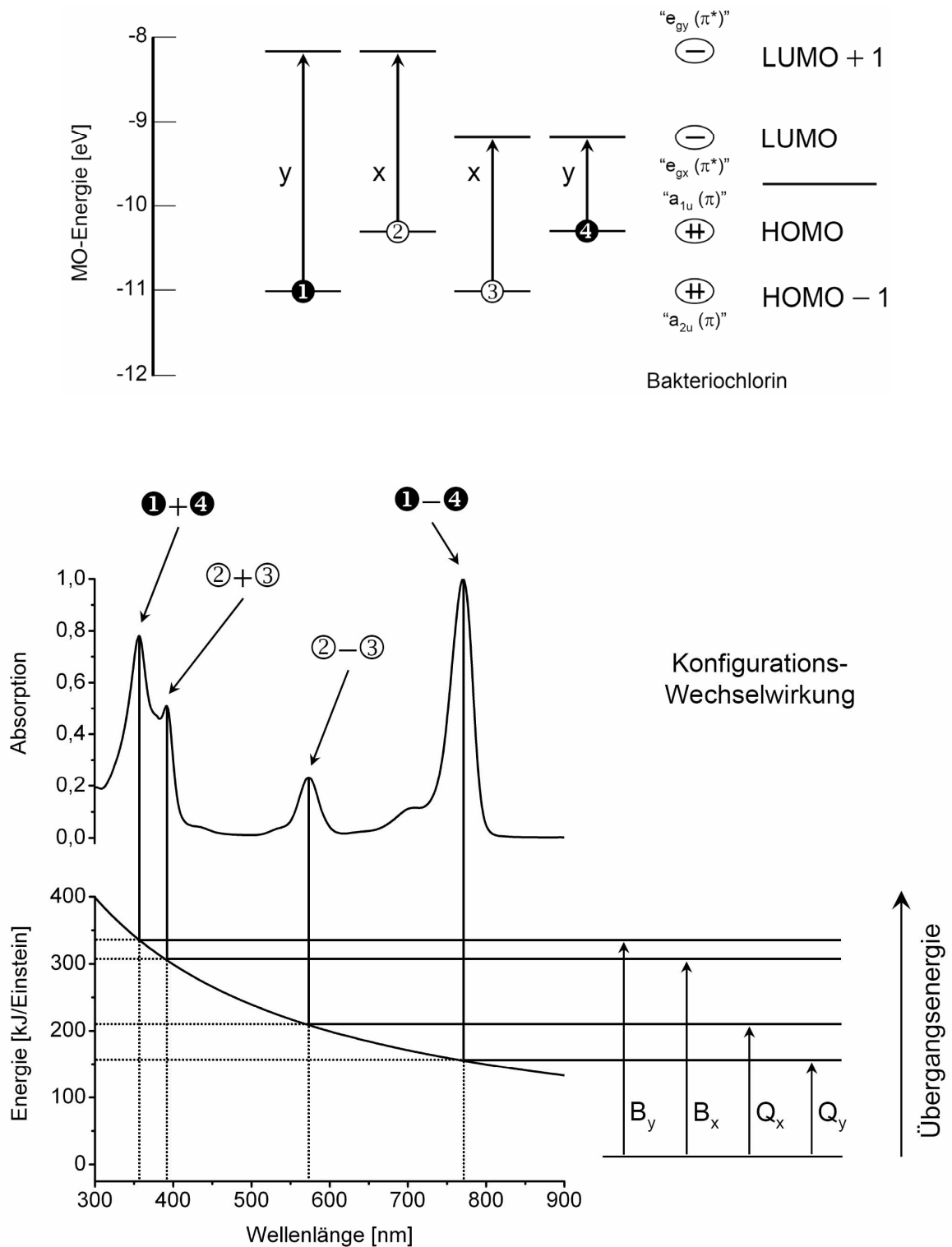


Abb. B-2: Energetische Lage und Polarisierung der MO-Übergänge eines Bakteriochlorins (oben), und Konfigurationswechselwirkung am Beispiel von BChl a (unten).

①, ④: y-polarisierte MO-Übergänge; ②, ③: x-polarisierte MO-Übergänge.

①+④, ②+③: konstruktive Kombination der y- bzw. x-polarisierten MO-Übergänge.

①-④, ②-③: destruktive Kombination der y- bzw. x-polarisierten MO-Übergänge.

Energien der Absorptionsbanden von BChl a in Diethylether: B<sub>y</sub>: 335 kJ/Einstein (357 nm), B<sub>x</sub>: 305 kJ/Einstein (392 nm), Q<sub>x</sub>: 209 kJ/Einstein (574 nm), Q<sub>y</sub>: 155 kJ/Einstein (771 nm).

## Anhang C: Enzymatischer Abbau von Chlorophyll

Die von angeregten Tetrapyrrolen auf Biomoleküle übertragene Energie führt meist zur Bildung von Peroxiden oder zur Degradation dieser Moleküle (op den Camp *et al.*, 2003), wodurch die Anhäufung von photosensibilisierenden Tetrapyrrolen oder ihrer Vorstufen bei einem gestörten Stoffwechsel für alle Lebensformen in Fauna und Flora extrem gefährlich ist (Kruse *et al.*, 1995; Mock und Grimm, 1997).

Ein Problem ergibt sich für die Pflanzen im Herbst, wenn die Proteine in den Blättern abgebaut werden, um den äußerst wertvollen Stickstoff in seiner reduzierten Form zu recyceln. Bei dieser *Remobilisierung* von Pigment-Protein-Komplexen (Pruzinska *et al.*, 2003) werden auch deren Chromophore, darunter stark photosensibilisierende Chlorophylle, freigesetzt. Deren effiziente Entgiftung erfolgt über eine schrittweise, letzten Endes völlige Zerstörung ihres ringförmigen  $\pi$ -Elektronen-Systems (Abb. C-1).

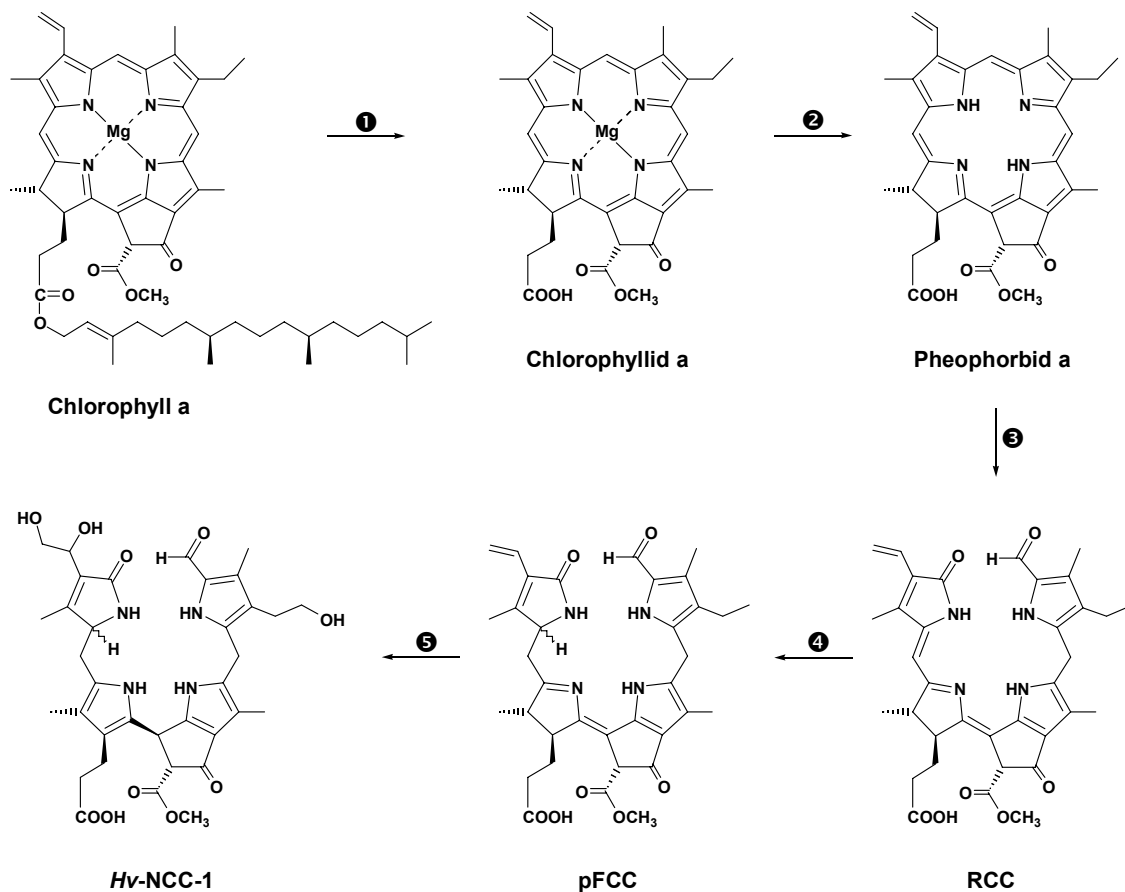


Abb. C-1: Enzymatischer Abbau von Chlorophyll. RCC: red chlorophyll catabolite; pFCC: primary fluorescent chlorophyll catabolite; NCC: non-fluorescent chlorophyll catabolite. ① Chlorophyllase; ② Mg-Dechelatase; ③ Pheophorbid a-Oxygenase; ④ RCC-Reduktase; ⑤ mehrere enzymatische und nicht-enzymatische Schritte (letztere z. T. erst in der Vakuole).

Das Hauptabbauprodukt aus Gerste (*Hordeum vulgare*), das *Hv-NCC-1*, war das erste nicht-grüne Chlorophyll-Abbauprodukt, das identifiziert werden konnte (Kräutler *et al.*, 1991). Es wird angenommen, dass der Chlorophyll-Abbau mit der Überführung von den NCCs in die Zellvakuole abgeschlossen ist. Im Gegensatz zum Stickstoff der Chromophor-bindenden Proteine wird folglich in Pflanzen der Stickstoff der Tetrapyrrole nicht zurück gewonnen. Es wurden jedoch bisher noch keine NCCs in photosynthetisch aktiven Blättern gefunden (Matile *et al.*, 1999), obwohl die Halbwertszeit von Chlorophyll unter Voraussetzung eines ständigen Chlorophyll-Umsatzes maximal einige Tage beträgt (Stobart und Hendry, 1984).

**Anhang D: Absorptionsspektren der verwendeten Pigmente in Lösungsmittel**

„Chlorophylle“ in DE: Chl <i>a</i> , Zn-Phe <i>a</i> , Pd-Phe <i>a</i> , Phe <i>a</i> .....	A-13
„Chlorophyllide“ in DE: Chlid <i>a</i> , Zn-Pheid <i>a</i> , Pd-Pheid <i>a</i> , Pheid <i>a</i> .....	A-13
„Bakteriochlorophylle“ in DE: BChl <i>a</i> , Zn-BPhe <i>a</i> , Pd-BPhe <i>a</i> , BPhe <i>a</i> .....	A-14
„Bakteriochlorophyllide“ in DE: BChlid <i>a</i> , Zn-BPheid <i>a</i> , Pd-BPheid <i>a</i> , BPheid <i>a</i> .....	A-14
3Ac-Chl <i>a</i> und 3Vi-BChl <i>a</i> in DE .....	A-15
3 <sup>1</sup> OH-Pd-BPheid <i>a</i> in DE .....	A-15
WST11 und WST11 Pd-frei in Methanol .....	A-16
Photosan <sup>®</sup> in Methanol .....	A-16
DCF und H <sub>2</sub> DCF in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 .....	A-17
Bengalrosa in Methanol .....	A-17



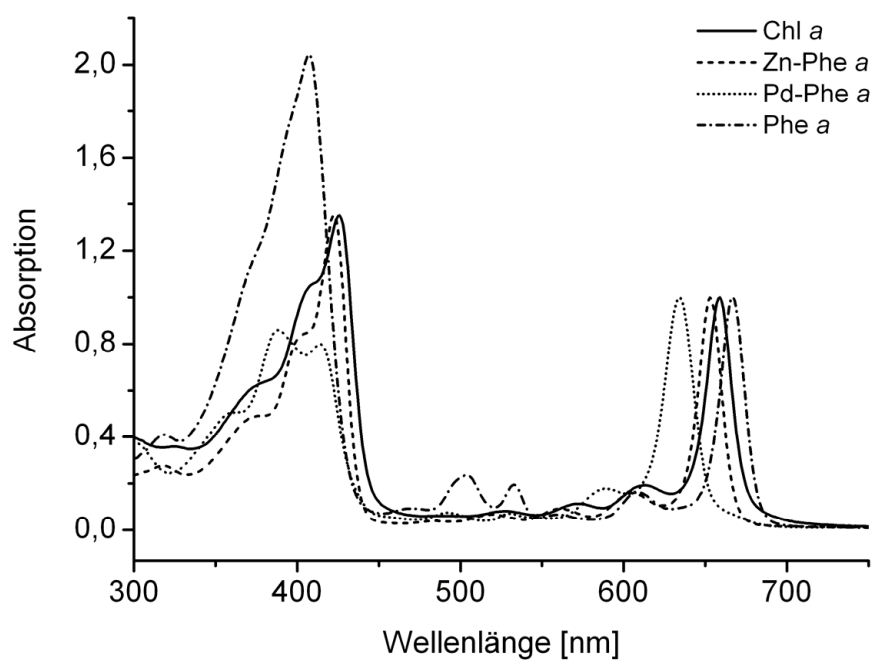


Abb. D-1: Absorptionsspektren von Chlorophyll *a* und dessen verwendeten Zentralmetall-Derivaten in gereinigtem Diethylether. Die Spektren wurden auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

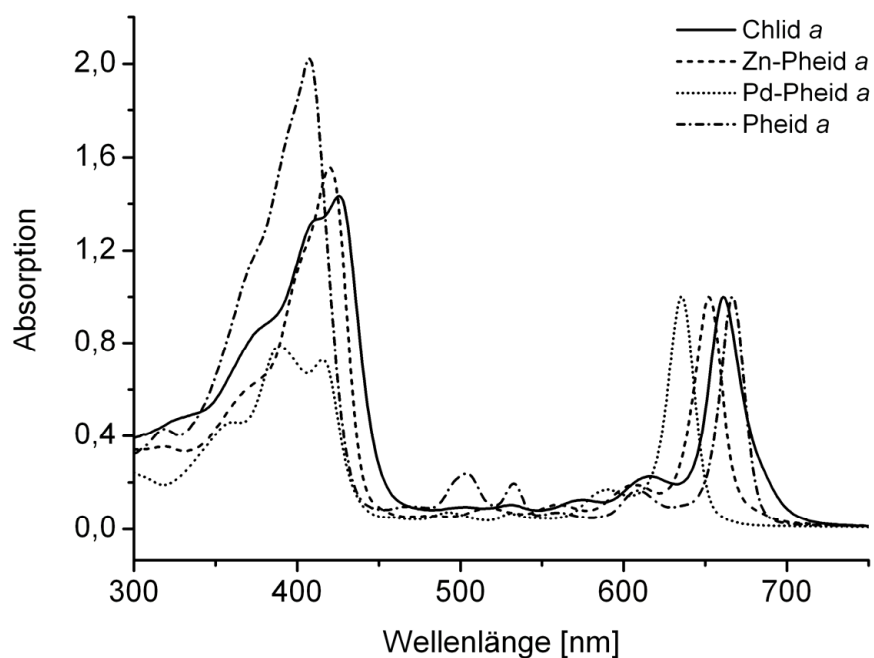


Abb. D-2: Absorptionsspektren von Chlorophyllid *a* und dessen verwendeten Zentralmetall-Derivaten in gereinigtem Diethylether. Die Spektren wurden auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

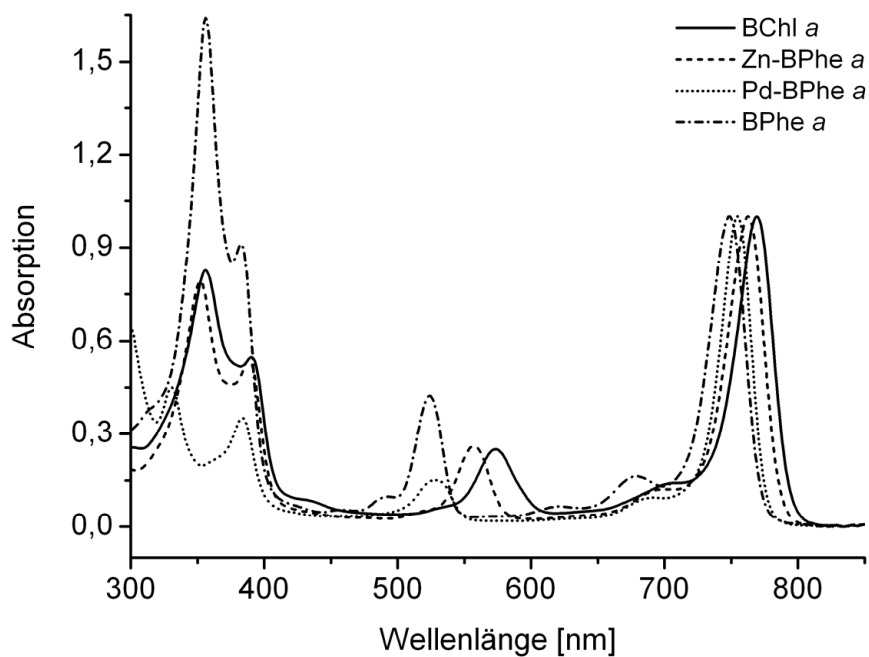


Abb. D-3: Absorptionsspektren von Bakteriochlorophyll *a* und dessen verwendeten Zentralmetall-Derivaten in gereinigtem Diethylether. Die Spektren wurden auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

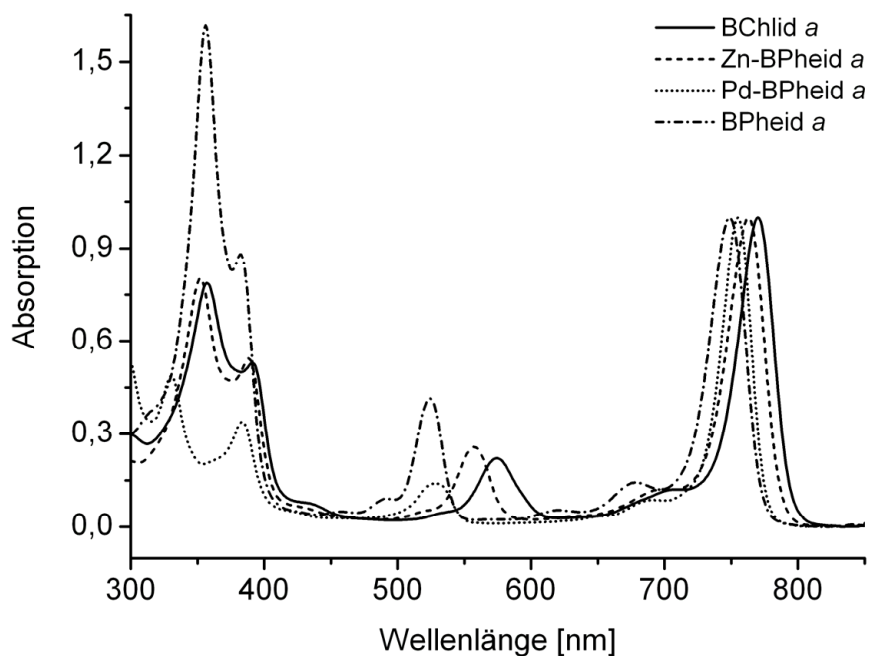


Abb. D-4: Absorptionsspektren von Bakteriochlorophyllid *a* und dessen verwendeten Zentralmetall-Derivaten in gereinigtem Diethylether. Die Spektren wurden auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

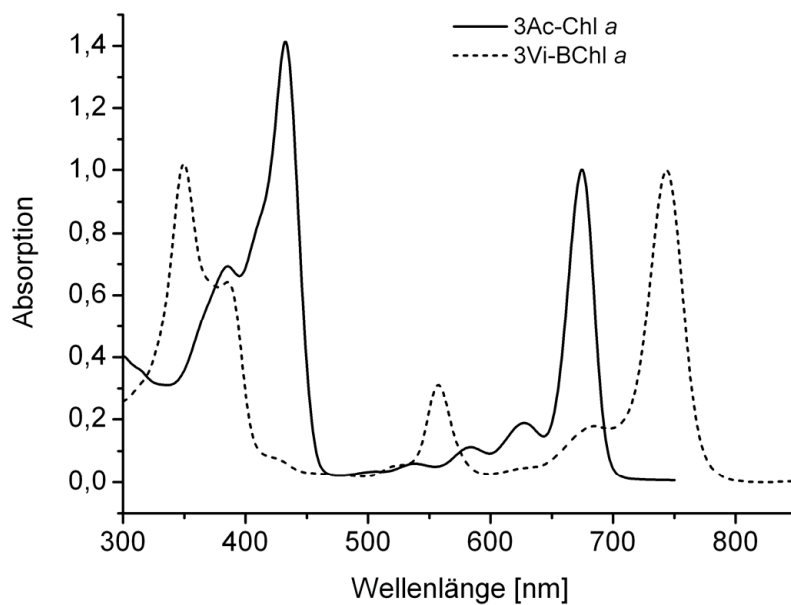


Abb. D-5: Absorptionsspektren von 3Ac-Chl a und 3Vi-BChl a in gereinigtem Diethylether. Die Spektren wurden auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

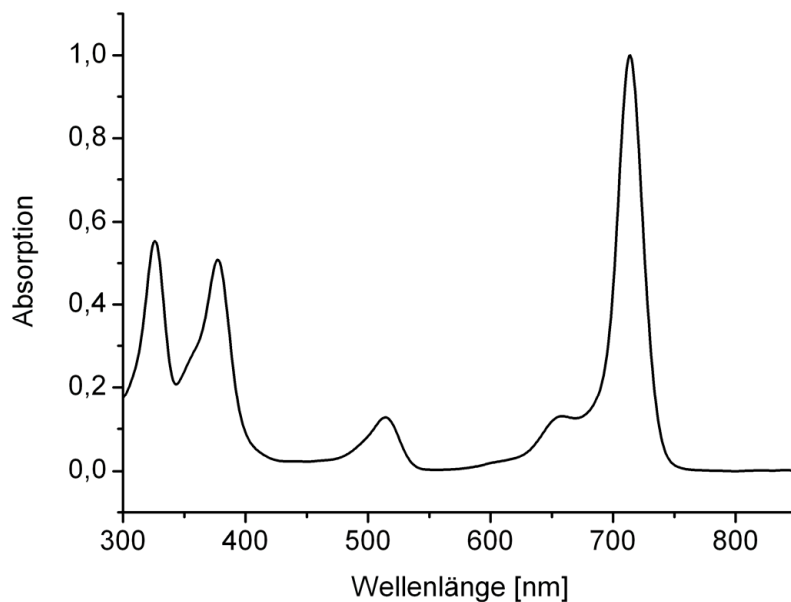


Abb. D-6: Absorptionsspektrum von 3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid a in gereinigtem Diethylether. Das Spektrum wurde auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

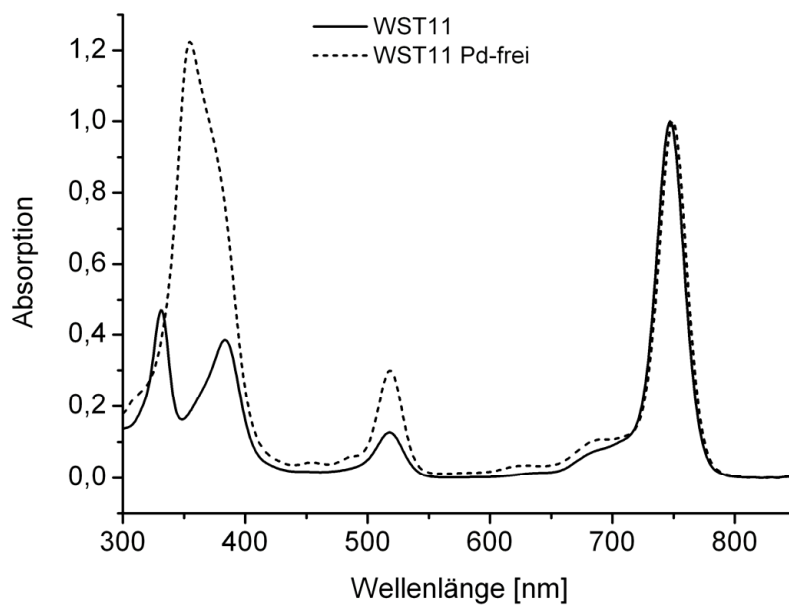


Abb. D-7: Absorptionsspektren von WST11 und dessen zentralmetallfreiem Derivat in Methanol. Die Spektren wurden auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

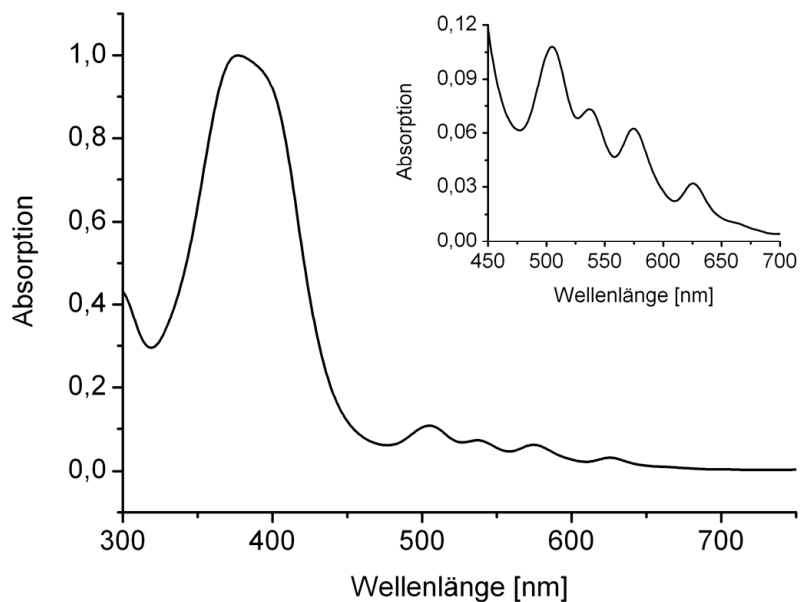


Abb. D-8: Absorptionsspektrum von Photosan® (eine Variante des HpD) in Methanol. Das Spektrum wurde auf  $A(\text{Soret}) = 1,0$  normiert.

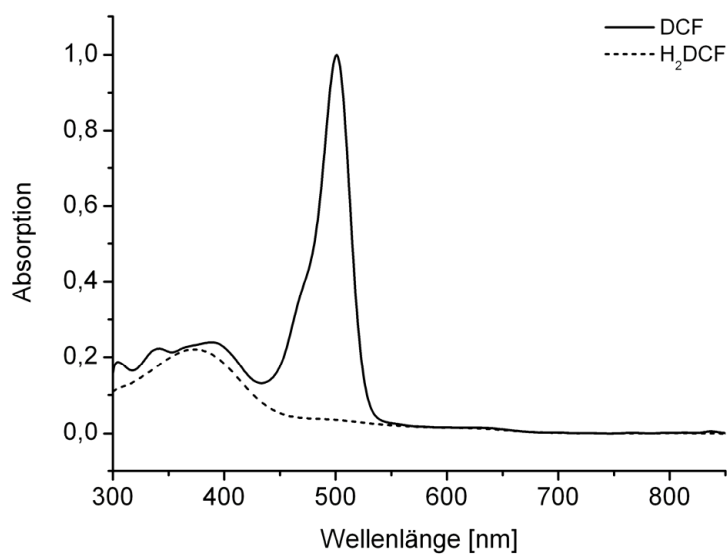


Abb. D-9: Absorptionsspektren von 2',7'-Dichloro-fluorescein (DCF) und seiner reduzierten Vorstufe 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein ( $H_2DCF$ ; 2',7'-Dichloro-fluorescin) in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,2. Das DCF-Spektrum wurde auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

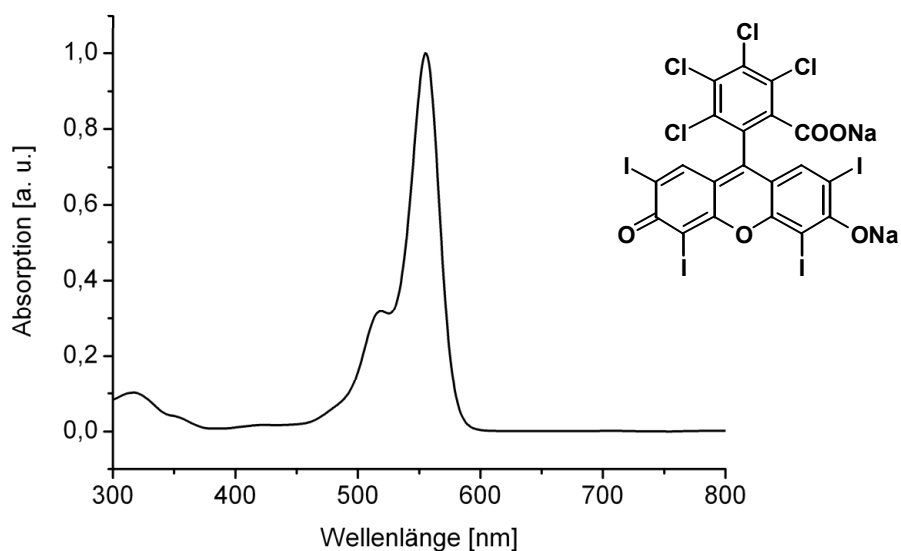


Abb. D-10: Absorptionsspektrum und chemische Struktur von Bengalrosa (Dinatrium-Salz des 4,5,6,7-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodo-fluoresceins) in Methanol. Das Spektrum wurde auf  $A(Q_y) = 1,0$  normiert.

## Anhang E: Farben der Blutplasma-Fraktionen

Die Blutplasma-Fraktionen, die nach Inkubation von Blutplasma mit Bakteriopeophorbid-Derivaten durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen wurden, waren durch die zum Teil sehr hohe Anreicherung von zugesetzten Pigmenten stark gefärbt (Tab. E-1 / Abb. E-1).

Tab. E-1: Subjektiver Farbeindruck der vier mittels sequentieller Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fraktionen (siehe auch Abb. E-1). Die ebenfalls angegebenen RGB-Farben sind die aus einem 100×100 Pixel großen Bildausschnitt gemittelten Durchschnittsfarben.

Fraktion	zugesetztes Pigment	subj. Farbeindruck	RGB-Farbe
VLDL	ozP	naturweiß	212,206,173
	Pd-BPheid <i>a</i>	rötlich naturweiß	189,168,138
	Zn-BPheid <i>a</i>	grünlich naturweiß	183,183,157
LDL	ozP	dottergelb	208,185,023
	Pd-BPheid <i>a</i>	orange	192,104,050
	Zn-BPheid <i>a</i>	moosgrün	073,104,049
HDL	ozP	bräunlich hellgelb	191,179,080
	Pd-BPheid <i>a</i>	dunkel altrosa	184,101,100
	Zn-BPheid <i>a</i>	petrolblau	022,105,096
HDP	ozP	hellgelb	225,223,066
	Pd-BPheid <i>a</i>	hellgelb	222,215,078
	Zn-BPheid <i>a</i>	gelblich oliv	171,182,113

Die naturweiße Farbe der VLDL (ozP) wurde durch die relativ geringe Anreicherung der zugesetzten Pigmente nur unwesentlich verändert. VLDL mit Pd-BPheid *a* wiesen lediglich eine leichte rötliche, VLDL mit Zn-BPheid *a* eine leichte grünliche Verfärbung auf.

Die dottergelbe Farbe der LDL (ozP) und die bräunlich hellgelbe Farbe der HDL (ozP) wurde dagegen durch die relativ hohe Anreicherung der zugesetzten Pigmente stark verändert.

Bedingt durch die hohe Konzentration an Carotinoiden wiesen LDL mit Pd-BPheid *a* eine orange, LDL mit Zn-BPheid *a* eine moosgrüne Farbe auf. Diese Farben stellten Mischfarben aus der gelben Farbe der Carotinoide und der Eigenfarbe der zugesetzten Pigmente dar.

Bei den deutlich weniger Carotinoide enthaltenden HDL dagegen überwog die Eigenfarbe der zugesetzten Pigmente. Daher wiesen HDL mit Pd-BPheid *a* eine dunkel altrosa, HDL mit Zn-BPheid *a* eine petrolblaue Farbe auf.

Die hellgelbe Farbe der HDP (ozP) wurde dagegen wiederum kaum verändert. Die HDP mit Pd-BPheid *a* wiesen keine nennenswerte Verfärbung auf, die HDP mit Zn-BPheid *a* besaßen eine gelblich olive Farbe.


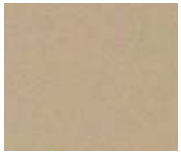
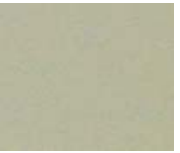

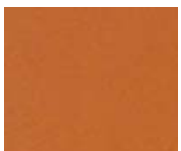




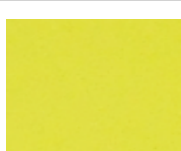

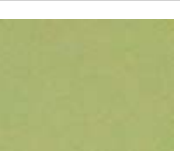
	ozP	Pd-BPheid <i>a</i>	Zn-BPheid <i>a</i>
VLDL			
LDL			
HDL			
HDP			

Abb. E-1: Darstellung der Farben der vier mittels sequentieller Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fractionen (von oben nach unten: VLDL, LDL, HDL, HDP). Dargestellt ist eine digitale Photographie der einzelnen Fractionen vor weißem Hintergrund bei einer Schichtdicke von ~27,5 mm. Die Fractionierung erfolgte ohne zugesetztes Pigment (ozP; links), sowie nach Inkubation mit Pd- oder Zn-BPheid *a* (Mitte bzw. rechts).

Es ist klar, dass diese Farbcharakterisierung nur einen Anhaltspunkt geben kann. Da die Spektren von allen Fractionen vorlagen, wurden sie nicht eingehender mit Farb-Systemen wie z. B. dem NCS (Natural Color System) charakterisiert.

## Anhang F: Pigmentverteilung von Tetrapyrrolen auf Blutplasma-Fractionen

Tab. F-1: Prozentuale Verteilung ausgewählter Tetrapyrrole auf die LDL- und HDL-Fraktion.

Pigment	LDL [%]	HDL [%]
Chl <i>a</i>	52,75 ± 1,3	47,25 ± 1,3
Zn-Phe <i>a</i>	22,10 ± 0,3	77,90 ± 0,3
Pd-Phe <i>a</i>	50,65 ± 0,5	49,35 ± 0,5
Phe <i>a</i>	54,10 ± 2,4	45,90 ± 2,4
Chlid <i>a</i>	31,95 ± 1,6	68,05 ± 1,6
Zn-Pheid <i>a</i>	20,85 ± 2,3	79,15 ± 2,3
Pd-Pheid <i>a</i>	38,20 ± 1,7	61,80 ± 1,7
Pheid <i>a</i>	38,75 ± 0,1	61,25 ± 0,1
BChl <i>a</i>	84,60 ± 1,1	15,40 ± 1,1
Zn-BPhe <i>a</i>	71,50 ± 2,4	28,50 ± 2,4
Pd-BPhe <i>a</i>	80,25 ± 0,5	19,75 ± 0,5
BPhe <i>a</i>	95,45 ± 0,2	4,55 ± 0,2
BChlid <i>a</i>	36,60 ± 0,1	63,40 ± 0,1
Zn-BPheid <i>a</i>	11,00 ± 0,3	89,00 ± 0,3
Pd-BPheid <i>a</i>	35,95 ± 1,6	64,05 ± 1,6
BPheid <i>a</i>	33,10 ± 1,0	66,90 ± 1,0
3Ac-Chl <i>a</i>	46,90 ± 1,8	53,10 ± 1,8
3Vi-BChl <i>a</i>	86,90 ± 0,9	13,10 ± 0,9



Tab. F-2: Prozentuale Verteilung von 3<sup>1</sup>OH-Pd-BPheid *a* auf die LDL-, HDL-, und HDP-Fraktion.

Insertionssystem	LDL [%]	HDL [%]	HDP [%]
CES	26,5 ± 0,8	50,5 ± 1,3	23,0 ± 1,3
DMSO	9,5 ± 1,4	55,6 ± 1,3	34,9 ± 2,3
PB	9,7 ± 2,1	56,6 ± 0,8	33,7 ± 2,3

Tab. F-3: Prozentuale Verteilung polarer Tetrapyrrole auf die LDL-, HDL-, und HDP-Fraktion. Als Vergleich ist die Verteilung eines eher unpolaren Pigments, des Pd-BPheid *a* (WST09) angegeben. IGZ: Iodixanolgradienten-Zentrifugation; SDZ: sequentielle Dichtezentrifugation.

Pigment	LDL [%]	LDL [%]	HDL [%]	HDL [%]	HDP [%]	HDP [%]
	(IGZ)	(SDZ)	(IGZ)	(SDZ)	(IGZ)	(SDZ)
WST09	31,0	33,4	55,1	58,9	13,9	7,7
WST11	5,0	16,1	14,6	45,5	80,4	38,4
WST11 Pd-frei	1,6	-	5,1	-	93,3	-
HpD	9,9	13,8	38,4	47,1	51,8	39,1

## Anhang G: Chemische Zusammensetzung der Lipoprotein-Fractionen

### a) Blutplasma-Fractionen ohne zugesetztes Pigment (ozP)

Tab. G-1: Konzentration von Protein, Phospholipiden, Cholesterin/-estern, und Triacylglycerinen in den durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fractionen einer ausgewählten Blutplasma-Charge. Jedem Mittelwert liegen drei unabhängige Messwerte zugrunde. Alle Prozentangaben beziehen auf die Gesamtmasse der Lipoproteine in der jeweiligen Fraktion, die durch Addition der Massen der einzelnen Bestandteile berechnet wurde.

Fraktion	Protein	Phospholipid	Cholesterin/-ester	Triacylglycerin
VLDL	57,3 ± 1,6 mg/dl	87,2 ± 3,4 mg/dl	78,6 ± 2,3 mg/dl	430 ± 13 mg/dl
		1,13 ± 0,04 mM	2,04 ± 0,06 mM	4,90 ± 0,15 mM
	8,8 ± 0,3 %	13,4 ± 0,6 %	12,0 ± 0,4 %	65,8 ± 2,5 %
LDL	209 ± 4 mg/dl	186 ± 11 mg/dl	378 ± 6 mg/dl	104 ± 9 mg/dl
		2,40 ± 0,14 mM	9,79 ± 0,16 mM	1,18 ± 0,11 mM
	23,9 ± 0,6 %	21,2 ± 1,3 %	43,1 ± 1,1 %	11,8 ± 1,1 %
HDL	490 ± 7 mg/dl	207 ± 9 mg/dl	124 ± 5 mg/dl	53,7 ± 4,8 mg/dl
		2,68 ± 0,12 mM	3,21 ± 0,12 mM	0,612 ± 0,055 mM
	56,0 ± 1,1 %	23,7 ± 1,1 %	14,2 ± 0,6 %	6,1 ± 0,6 %
HDP	4230 ± 50 mg/dl	10,1 ± 4,7 mg/dl	2,49 ± 0,33 mg/dl	1,15 ± 0,50 mg/dl
		0,130 ± 0,061 mM	0,065 ± 0,009 mM	0,013 ± 0,006 mM
	99,7 ± 1,6 %	0,2 ± 0,1 %	0,1 ± 0,0 %	0,0 ± 0,0 %

## b) Blutplasma-Fraktionen mit inkorporiertem Pd-BPheid a

Tab. G-2: Konzentration von Protein, Phospholipiden, Cholesterin/-estern, und Triacylglycerinen in den durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fraktionen einer ausgewählten Blutplasma-Charge. Dem Blutplasma wurde vor der Fraktionierung Pd-BPheid a mittels des CES-Insertionssystems zugegeben. Jedem Mittelwert liegen drei unabhängige Messwerte zugrunde. Alle Prozentangaben beziehen auf die Gesamtmasse der Lipoproteine in der jeweiligen Fraktion, die durch Addition der Massen der einzelnen Bestandteile berechnet wurde.

Fraktion	Protein	Phospholipid	Cholesterin/-ester	Triacylglycerin
VLDL	56,3 ± 1,7 mg/dl	86,9 ± 3,3 mg/dl	77,6 ± 4,3 mg/dl	435 ± 20 mg/dl
		1,12 ± 0,04 mM	2,01 ± 0,11 mM	4,96 ± 0,22 mM
	8,6 ± 0,4 %	13,3 ± 0,6 %	11,8 ± 0,8 %	66,3 ± 3,6 %
LDL	216 ± 5 mg/dl	190 ± 8 mg/dl	370 ± 8 mg/dl	108 ± 7 mg/dl
		2,46 ± 0,11 mM	9,59 ± 0,21 mM	1,24 ± 0,08 mM
	24,4 ± 0,7 %	21,5 ± 1,0 %	41,9 ± 1,1 %	12,3 ± 0,8 %
HDL	491 ± 6 mg/dl	204 ± 9 mg/dl	121 ± 7 mg/dl	53,1 ± 3,9 mg/dl
		2,64 ± 0,12 mM	3,13 ± 0,18 mM	0,605 ± 0,045 mM
	56,5 ± 1,1 %	23,5 ± 1,1 %	13,9 ± 0,8 %	6,1 ± 0,5 %
HDP	4190 ± 110 mg/dl	7,8 ± 2,1 mg/dl	2,88 ± 0,58 mg/dl	0,87 ± 0,02 mg/dl
		0,101 ± 0,028 mM	0,075 ± 0,015 mM	0,010 ± 0,000 mM
	99,7 ± 3,7 %	0,2 ± 0,1 %	0,1 ± 0,0 %	0,0 ± 0,0 %

## c) Blutplasma-Fraktionen mit inkorporiertem Zn-BPheid a

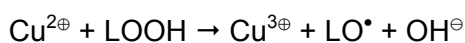
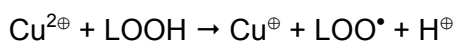
Tab. G-3: Konzentration von Protein, Phospholipiden, Cholesterin/-estern, und Triacylglycerinen in den durch sequentielle Dichtezentrifugation gewonnenen Blutplasma-Fraktionen einer ausgewählten Blutplasma-Charge. Dem Blutplasma wurde vor der Fraktionierung Zn-BPheid a mittels des CES-Insertionssystems zugegeben. Jedem Mittelwert liegen drei unabhängige Messwerte zugrunde. Alle Prozentangaben beziehen auf die Gesamtmasse der Lipoproteine in der jeweiligen Fraktion, die durch Addition der Massen der einzelnen Bestandteile berechnet wurde.

Fraktion	Protein	Phospholipid	Cholesterin/-ester	Triacylglycerin
VLDL	55,6 ± 2,0 mg/dl	88,7 ± 3,0 mg/dl	77,4 ± 3,3 mg/dl	432 ± 15 mg/dl
		1,15 ± 0,04 mM	2,01 ± 0,08 mM	4,93 ± 0,17 mM
	8,5 ± 0,4 %	13,6 ± 0,6 %	11,8 ± 0,6 %	66,1 ± 2,7 %
LDL	218 ± 5 mg/dl	191 ± 6 mg/dl	376 ± 7 mg/dl	105 ± 5 mg/dl
		2,47 ± 0,08 mM	9,74 ± 0,17 mM	1,20 ± 0,06 mM
	24,5 ± 0,7 %	21,4 ± 0,7 %	42,3 ± 0,9 %	11,8 ± 0,6 %
HDL	499 ± 14 mg/dl	204 ± 8 mg/dl	120 ± 6 mg/dl	51,9 ± 5,6 mg/dl
		2,63 ± 0,11 mM	3,10 ± 0,15 mM	0,592 ± 0,064 mM
	57,1 ± 2,0 %	23,3 ± 1,1 %	13,7 ± 0,7 %	5,9 ± 0,7 %
HDP	4310 ± 80 mg/dl	7,4 ± 2,0 mg/dl	2,49 ± 0,88 mg/dl	1,15 ± 0,50 mg/dl
		0,096 ± 0,026 mM	0,065 ± 0,023 mM	0,013 ± 0,006 mM
	99,7 ± 2,6 %	0,2 ± 0,0 %	0,1 ± 0,0 %	0,0 ± 0,0 %

## Anhang H: Kupferchemie

Kupfer ist ein lebensnotwendiges, d. h. essentielles Spurenelement. In einer Reihe von Proteinen stellt es einen unverzichtbaren Cofaktor für die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser *Cuproenzyme* dar (Uauy *et al.*, 1998). Die zellulären Effekte von Kupfer und dessen funktionelle Wechselwirkungen mit anderen Nährstoffen wurden größtenteils noch nicht völlig aufgeklärt (Gaetke und Chow, 2003).

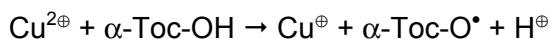
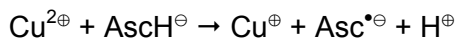
Sowohl ein-, wie auch zweiwertige Kupferionen ( $\text{Cu}^{\oplus}$  bzw.  $\text{Cu}^{2\oplus}$ ), können durch Spaltung von vorhandenen Hydroperoxiden Radikale erzeugen (Esterbauer *et al.*, 1992; Burkitt, 2001):



Die zweitgenannte dieser Reaktionen weist sehr hohe Umsatzraten auf, und ist analog zur Cu-Fenton-Reaktion ( $\text{Cu}^{\oplus} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2\oplus} + \text{HO}^{\bullet} + \text{OH}^{\ominus}$ ). Die dabei entstehenden Peroxyl- und Alkoxy-Radikale ( $\text{LOO}^{\bullet}$  bzw.  $\text{LO}^{\bullet}$ ) können weitere Peroxide durch die Initiierung von Folgereaktionen nach dem Radikalketten-Mechanismus erzeugen.

Durch die Abstraktion eines C7-H-Atoms des Cholesterins können diese Fettsäure-Radikale u. a. 7-OOH-Cholesterine als sekundäre Oxidationsprodukte generieren (Patel *et al.*, 1996). Folglich sind oxidierte LDL anfälliger gegenüber Cu-induzierter Peroxidation als peroxidfreie LDL (Thomas *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1998). Daher wird auch die Anfälligkeit von LDL gegenüber Oxidation durch die Zugabe von 7 $\alpha$ -OOH-Cholesterin gesteigert (Blache *et al.*, 1995).

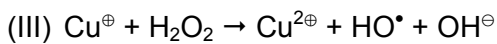
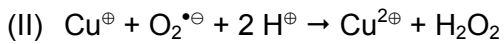
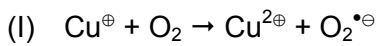
Sind zunächst keine Hydroperoxide vorhanden, so kann  $\text{Cu}^{\oplus}$  auch durch die Reaktion von  $\text{Cu}^{2\oplus}$  mit Antioxidantien, z. B. Ascorbat ( $\text{Asc}^{\bullet\ominus}$ ) oder  $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha\text{-Toc-OH}$ ), entstehen (Kontush *et al.*, 1996; Burkitt, 2001):



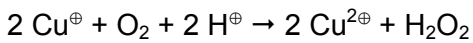
Dies bedeutet, dass manche der *in vivo* existierenden Antioxidantien in Anwesenheit von Kupferionen eine prooxidative Wirkung entfalten können (Ueda *et al.*, 1996). Oft dominiert bei sehr niedrigen Antioxidans-Konzentrationen die prooxidative, bei hohen Antioxidans-Konzentrationen dagegen die antioxidative Wirkung (Girotti *et al.*, 1985).  $\text{Cu}^{2\oplus}$  kann durch alle Lipoproteine (Chylomikronen, VLDL, LDL, HDL) unter Verbrauch von  $\alpha$ -Tocopherol zu  $\text{Cu}^{\oplus}$  reduziert werden (Kontush *et al.*, 1996).

Während folglich durch Zugabe von LDL  $\text{Cu}^{2\oplus}$  zu  $\text{Cu}^{\oplus}$  reduziert wird, kommt es nicht zur analogen Reduktion von  $\text{Fe}^{3\oplus}$  zu  $\text{Fe}^{2\oplus}$  (Lynch und Frei, 1993; Lynch und Frei, 1995).

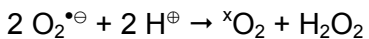
Das dabei entstehende  $\text{Cu}^{\oplus}$  kann direkt mit Sauerstoff reagieren, wodurch zunächst  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht (evtl. mit  $\text{O}_2^{\bullet\ominus}$  als Intermediat), das in einer Folgereaktion durch die bereits oben erwähnte Cu-Fenton-Reaktion Hydroxyl-Radikale bilden kann:



Auch eine Zweielektronen-Reduktion, d. h. eine Kombination der Reaktionen (I) und (II), ist bei Beteiligung bestimmter Kupferkomplexe möglich:



Ebenfalls möglich ist die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung durch zweimalige Reaktion (I) mit anschließender Disproportionierung der Superoxid-Radikalanionen:



Bei spontaner,  $\text{H}_2\text{O}$ -induzierter Disproportionierung entsteht Sauerstoff im Singulett-Zustand ( $x = 1$ ), bei enzymkatalysierter Disproportionierung durch die Superoxiddismutase befindet sich der gebildete Sauerstoff dagegen im Triplett-Zustand ( $x = 3$ ), und stellt damit keine Gefahr mehr für die Zelle dar (Corey *et al.*, 1987).

## Lebenslauf

Name	Jörg Thomas Dandler
Geburtsdatum	26.02.1976
Geburtsort	Augsburg
1982 – 1986	St.-Max-Volksschule (Grundschule), Augsburg
1986 – 1995	Holbein-Gymnasium, Augsburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1995 – 1996	Wehrdienst in Sonthofen (ABC-Abwehrlehrbataillon 210)
1996 – 2002	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss: Diplom-Biologe Univ.
2002	Beginn der Promotion am Department I (Bereich Botanik) der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Hugo Scheer





### **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 25.10.2008

JÖRG DANDLER





