

Untersuchungen zum Mechanismus  
der zellulären und zellfreien DNA-Schädigung  
durch photosensibilisierende Arzneistoffe

Dissertation  
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

vorgelegt von  
Cynthia Hertel  
geboren in München

Mainz, 2006



Meinem Großvater Dr. Harald Hertel



Auch das Denken schadet  
bisweilen der Gesundheit!

*Aristoteles*



# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies	3
1.2	Photosensibilisierung	6
1.3	In-vitro-Tests zur Photogenotoxizitätsprüfung als Ersatz von Photokanzerogenitätsstudien an Nagern	10
1.3.1	Bedeutung der Photogenotoxizitätsprüfung von Arzneistoffen	10
1.3.2	Prüfung auf Phototoxizität und Photogenotoxizität	12
1.3.3	Aufbau, Inhalt und Ziel der Studie	14
1.3.4	Zusatzuntersuchungen in Verbindung mit der Ringstudie	17
1.3.4.1	Testsubstanzen	18
1.4	DNA-Schäden	25
1.4.1	Direkt, durch UV-Strahlung, induzierte Basenmodifikationen	25
1.4.2	Indirekte, durch ROS induzierte Basenmodifikationen	26
1.5	DNA-Reparatur	27
2	ZIELSETZUNG .....	30
3	MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1	Material	31
3.1.1	Geräte	31
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	34
3.1.4	Enzyme	36
3.1.5	DNA	36
3.1.6	Zellen	37
3.1.7	Puffer, Lösungen, Medien	37
3.1.7.1	Zellkultur	37
3.1.7.2	Comet-Assay	37
3.1.7.3	Mikrokerntest	38
3.1.7.4	Alkalische Elution	39
3.1.7.5	DNA-Relaxationsassay	40

3.1.7.6	Modifikation von PM2-DNA mit Osmiumtetroxidlösung	41
3.1.7.7	Dünnschichtchromatographie	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Zellkultur	42
3.2.1.1	Allgemeine Zellpflege	42
3.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	42
3.2.2	Bestrahlung mit dem Solarsimulator	43
3.2.2.1	Gerätaufbau	43
3.2.2.2	Bestrahlungsbedingungen	44
3.2.3	Abwiegen der Substanzen	45
3.2.4	Comet Assay	45
3.2.4.1	Prinzip	45
3.2.4.2	Vorbereitung	46
3.2.4.3	Schädigung der Zellen	46
3.2.4.4	Toxizitätstest	47
3.2.4.5	Elektrophorese	47
3.2.4.6	Auswertung der Kometen	48
3.2.5	Mikrokerntest	49
3.2.5.1	Prinzip	49
3.2.5.2	Vorbereitung	49
3.2.5.3	Schädigung der Zellen	49
3.2.5.4	Fixierung der Zellen	50
3.2.5.5	Färbung der Zellen	50
3.2.5.6	Auszählen der Mikrokerne und Bestimmung der Toxizität	50
3.2.6	Alkalische Elution	52
3.2.6.1	Prinzip	52
3.2.6.2	Versuchsaufbau	53
3.2.6.3	Schädigung der Zellen	54
3.2.6.3.1	Bestrahlung mit dem Solarsimulator	54
3.2.6.3.2	Bestrahlung mit der Halogenlampe	55
3.2.6.4	Auswertung der Alkalischen Elution	55
3.2.7	PM2-DNA-Relaxationsassay	56
3.2.7.1	Prinzip	56
3.2.7.2	Schädigung der DNA	57
3.2.7.3	Agarose-Gelelektrophorese	57
3.2.7.4	Auswertung des Agarose Gels	57



3.2.8	Modifikation von PM2-DNA mit Osmiumtetroxid	58
3.2.8.1	Oxidation der DNA	58
3.2.8.2	Reinigung der modifizierten DNA	59
3.2.8.3	Prüfung auf Aktivität der Endonuklease III	59
3.2.9	Dünnschichtchromatographie	60
3.2.9.1	Prinzip	60
3.2.9.2	Vorbereitung der Proben	60
3.2.9.3	Durchführung der DC	60
3.2.9.4	Auswertung der DC	61
4	ERGEBNISSE .....	62
4.1	Hintergrundspiegel der DNA-Modifikationen in V79-Zellen	62
4.2	Induktion von DNA-Modifikationen in V79-Zellen durch Sonnenlicht	64
4.2.1	Einfluss von D <sub>2</sub> O auf die oxidativen DNA-Modifikationen in V79-Zellen	66
4.3	Quantifizierung von DNA-Modifikationen verursacht durch Photosensibilisatoren in Zellen mittels alkalischer Elution und zellfrei im DNA- Relaxationsassay	67
4.3.1	Chlorpromazin und Metabolite	68
4.3.1.1	Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Chlorpromazin und Sonnenlicht	68
4.3.1.1.1	Einfluss von Chlorpromazin auf die oxidative DNA-Schädigung durch Licht > 400 nm	69
4.3.1.1.2	Bedeutung des endogenen Chromophors in V79-Zellen für den oxidativen DNA-Schaden durch Chlorpromazin und Sonnenlicht	70
4.3.1.1.3	Einfluss von Chlorpromazin auf die Induktion oxidativer Basenmodifikationen durch Ro 19-8022 und Sonnenlicht	71
4.3.1.1.4	Bedeutung von Protein-cross-links für den Schaden durch Chlorpromazin und Sonnenlicht.	72
4.3.1.1.5	Dünnschichtchromatographie: Nachweis des Zerfalls von Chlorpromazin durch Sonnenlicht	73
4.3.1.1.6	Nachweis der entstandenen Hauptmetabolite von Chlorpromazin durch Sonnenlicht	74
4.3.1.1.7	Induktion von DNA-Modifikationen in V79-Zellen durch Chlorpromazinsulfoxid bzw. 2-Hydroxypropromazin und Sonnenlicht	76

4.3.1.1.8	Einfluss von Chlorpromazinsulfoxid bzw. 2-Hydroxypromazin auf die oxidative DNA-Schädigung durch Licht > 400 nm in Zellen	78
4.3.1.1.9	Reparatur der durch CPZ und Sonnenlicht induzierten Einzelstrangbrüche in V79-Zellen	80
4.3.1.2	Charakterisierung des durch Chlorpromazin und Sonnenlicht in zellfreier DNA induzierten Schadens	81
4.3.1.2.1	Einfluss der Vorbestrahlung von Chlorpromazin auf den zellfreien DNA-Schaden	83
4.3.1.2.2	Induktion zellfreier DNA-Modifikationen durch Chlorpromazinsulfoxid bzw. 2-Hydroxypromazin und Sonnenlicht	84
4.3.1.2.3	Induktion thermolabiler DNA-Modifikationen durch Chlorpromazin und Sonnenlicht	86
4.3.2	Promazin	87
4.3.2.1	Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Promazin und Sonnenlicht	87
4.3.2.2	Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Promazin und Sonnenlicht	89
4.3.2.2.1	Induktion thermolabiler DNA-Modifikationen durch Promazin und Sonnenlicht	91
4.3.3	Lomefloxacin	92
4.3.3.1	Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Lomefloxacin und Sonnenlicht	92
4.3.3.2	Charakterisierung des Schadens durch Lomefloxacin und Sonnenlicht an zellfreier DNA	93
4.3.4	Ciprofloxacin	95
4.3.4.1	Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Ciprofloxacin und Sonnenlicht	95
4.3.4.2	Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Ciprofloxacin und Sonnenlicht	96
4.3.5	Doxycyclin	98
4.3.5.1	Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Doxycyclin und Sonnenlicht	98
4.3.5.2	Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Doxycyclin und Sonnenlicht	100
4.3.6	Methylenblau	102
4.3.6.1	Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Methylenblau und Sonnenlicht	102

4.3.6.2	Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Methylenblau und Sonnenlicht	104
4.4	Einfluss von verschiedenen Zusätzen im PM2-Assay auf den zellfreien DNA-Schaden verursacht durch die Photosensibilisatoren und Sonnenlicht	106
4.5	Nachweis der Photogenotoxizität mit Hilfe des Comet Assays und des Mikrokerntests (Ringstudie)	108
4.5.1	Untersuchungen zur Cytotoxizität photoaktivierter Photosensibilisatoren (Trypanblaufärbung)	108
4.5.2	Kometenbildung bei V79-Zellen nach Behandlung mit Photosensibilisatoren und Sonnenlicht	110
4.5.3	Mikrokerne in V79-Zellen nach Behandlung mit Photosensibilisatoren und Sonnenlicht	110
4.6	Korrelationen der Ergebnisse von Comet Assay, Mikrokerntest und Cytotoxizitätstest mit Art und Ausmaß der DNA-Schädigung	113
4.6.1	Korrelation der Ergebnisse des Comet Assays mit dem Ausmaß der DNA-Schäden	114
4.6.2	Korrelation der Ergebnisse des Mikrokerntests mit Art und Ausmaß der DNA-Schäden	114
4.6.3	Korrelation Phototoxizität mit Photogenotoxizität	114
5	DISKUSSION.....	118
5.1	Hintergrundspiegel von DNA-Schäden und Schäden durch Sonnenlicht allein in V79-Zellen	118
5.2	DNA-Schäden durch Photosensibilisatoren	119
5.2.1	Phenothiazine: Chlorpromazin, Promazin, Chlorpromazin-sulfoxid, 2-Hydroxypromazin	119
5.2.1.1	DNA-Schädigung durch Chlorpromazin	119
5.2.1.2	DNA-Schädigung durch Promazin	125
5.2.1.3	DNA-Schädigung durch Chlorpromazinsulfoxid und 2-Hydroxypromazin	127
5.2.1.3.1	Vergleich der DNA-Schadensspektren der photoaktivierten Phenothiazinderivate	128
5.2.2	Fluorochinolone: Lomefloxacin und Ciprofloxacin	131
5.2.2.1	DNA-Schädigung durch Fluorochinolone	131

5.2.3	Doxycyclin	134
5.2.3.1	DNA-Schädigung durch Doxycyclin	134
5.2.4	Methylenblau	135
5.2.4.1	DNA-Schädigung durch Methylenblau	135
5.2.5	Quantitativer Vergleich zellfreier und zelluläre DNA-Schäden durch Photosensibilisatoren	137
5.3	Vergleich der DNA-Schadensprofile	138
5.4	Korrelationen der Ringstudienergebnisse mit Daten der zellulären DNA-Schädigung durch Photosensibilisatoren	140
5.4.1	Korrelation Alkalische Elution-Comet Assay	140
5.4.2	Korrelation Alkalische Elution-Mikrokerntest	140
5.4.3	Korrelation Phototoxizität-Photogenotoxizität	141
5.5	Zusammenfassung	142
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	144

## Abkürzungen

AP-Läsion	apurinische/apyrimidinische Stelle in der DNA
BER	Basenexzisionsreparatur
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BmBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin
CIF	Ciprofloxacin
COLIPA	<i>European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association</i>
CPZ	Chlorpromazin
CPZSO	Chlorpromazinsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DXC	Doxycyclin
ECVAM	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo III (E III)	Endonuklease III
Endo IV (E IV)	Endonuklease IV
FCS	fetales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidinglycosylase
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
2HPZ	2-Hydroxypromazin
IR	Infrarotstrahlung
LMA	<i>low-melting-agarose</i>
LOF	Lomefloxacin
MMR	<i>mismatch-repair</i>
MTB	Methylenblau
MN (MK)	Mikrokerne
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PZ	Promazin

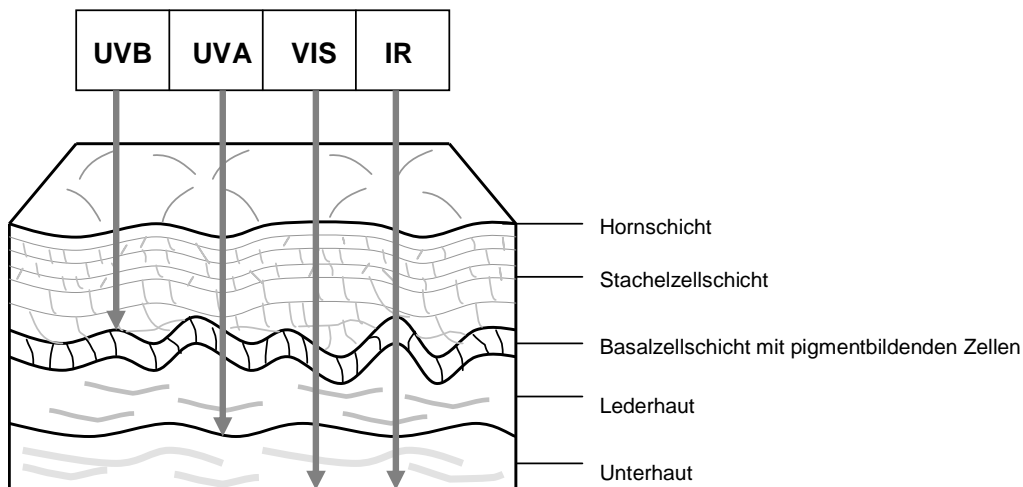
Ro 19-8022	[R]-1-(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SOP	<i>Standard Operation Protocol</i>
SS	Solarsimulator
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
T4-Endo-V	T4 Endonuklease V
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UVA	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 320-400 nm
UVB	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 280-320 nm
UVC	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 200-280 nm
VIS	sichtbares Licht der Wellenlänge 400-800 nm
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

# 1 Einleitung

Zahlreiche Erkrankungen werden direkt oder indirekt durch die Sonnenstrahlung hervorgerufen. Akute und chronische Hautreaktionen, die mit der Sonnenstrahlung zusammenhängen, reichen vom akuten Sonnenbrand über phototoxische und photoallergische Erkrankungen bis hin zu malignen chronischen Tumoren der Haut (Karzinome und Melanome).

Das Sonnenlichtspektrum umfasst verschiedene Bereiche der elektromagnetischen Strahlung. Diese sind die ultraviolette Strahlung (UV; 200-400 nm; 3,9 % UVA und 0,4 % UVB), das sichtbare Licht (VIS; 400-800 nm; 51,8 %) und die Infrarotstrahlung (IR; über 800 nm; 43,9 %) (Beckmann, 2003). Die Anteile der unterschiedlichen Strahlungsarten am Sonnenlichtspektrum sind von der geographischen Breite, jahreszeitlichem Sonnenstand, Tageszeit und Bewölkungsverhältnissen abhängig (Barth, 1987; Hölzle, 2003). Die UV-Strahlung wird weiter in drei Bereiche unterteilt: den UVA- (320-400 nm), UVB- (280-320 nm) und den UVC-Bereich (200-280 nm).

Auf Grund der verschiedenen Wellenlängen vermögen die Strahlungsarten unterschiedlich tief in die menschliche Haut einzudringen (**Abb. 1.1**). Die Eindringtiefe nimmt mit zunehmendem Energiegehalt ab. Energiearmes, langwelliges UVA-Licht kann in tiefere Hautschichten gelangen und erreicht sogar subkutanes Gewebe.



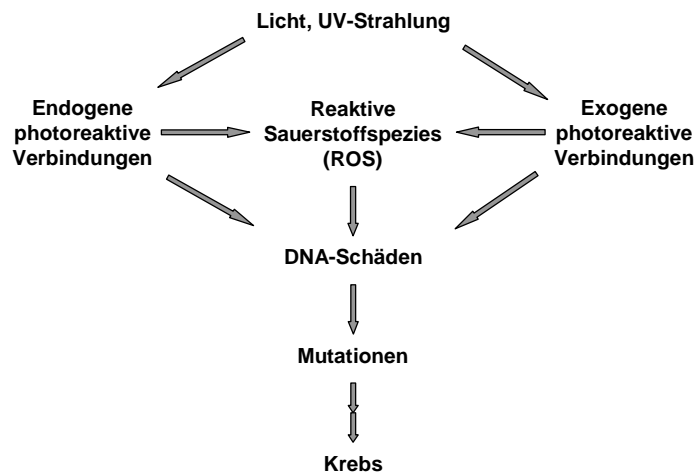
**Abb. 1.1** Strahlungsarten des Sonnenspektrums und deren Eindringtiefe in die menschliche Haut, nach Beckmann, modifiziert (Beckmann, 2003).

Je nach Energie und Wellenlänge wird die UV-Strahlung auch unterschiedlich stark von den verschiedenen Bestandteilen einer Zelle absorbiert. Die meisten Biomoleküle absorbieren vor allem UVB- und kaum UVA-Strahlung. Letztere kann jedoch indirekt über so genannte Photosensibilisatoren schädigend wirken. Man unterscheidet hierbei endogene, physiologisch in einer Zelle vorkommende Moleküle, wie Porphyrine oder Flavine, und exogene Substanzen wie Arzneistoffe. Viele dieser photoreaktiven Verbindungen sind in der Lage, direkt DNA-Veränderungen hervorzurufen oder reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, welche die DNA-Basen oxidieren können (Epe et al., 1993).

DNA-Modifikationen und die daraus resultierenden Mutationen durch kurzwelliges UV-Licht (UVB und UVC) sind relativ gut untersucht (Cleaver et al., 1988; Brenneisen et al., 1998). Die schädigende Wirkung von UVA-Strahlung in Verbindung mit exogenen Photosensibilisatoren rückte in den vergangenen Jahren immer mehr in den Vordergrund. Strahlendosen, die bei normaler Lichtempfindlichkeit der Haut reaktionslos toleriert werden, können in Verbindung mit bestimmten Stoffen zu entzündlichen, sonnenbrandähnlichen Hautreaktionen führen (Ferguson, 2002). Solche Substanzen sind häufig Arzneistoffe, deren lokaler oder systemischer Einsatz zu solchen unerwünschten Nebenwirkungen führen kann.

Eine echte phototoxische Reaktion der Haut ist zu unterscheiden von photoallergischen Erkrankungen. Während letztere auf einer immunologischen Grundlage basiert, fehlt diese bei der phototoxischen Hautreaktion völlig (Lehmann, 2004). Phototoxizität wird als toxische Reaktion definiert, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten Chemikalien bei nachfolgender Lichtexposition entsteht oder auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffes induziert wird. Mit Photogenotoxizität einer Substanz ist die schädigende Wirkung des Photosensibilisators auf die DNA gemeint. Phototoxische Substanzen sind meist auch photogenotoxisch. Die Schädigung der DNA einer menschlichen Zelle kann zu Mutationen führen. Ein Photosensibilisator ist somit potentiell kanzerogen und kann die Entstehung von UV-bedingten Hauttumoren fördern (**Abb. 1.2**). Befindet sich ein Arzneistoff in der Entwicklung, so beinhalten die verschiedenen Prüfungen auf Unbedenklichkeit des Pharmakons auch Tests auf eine mögliche Phototoxizität bzw. Photogenotoxizität.





**Abb. 1.2** Entstehung und Folgen oxidativer DNA-Schäden

## 1.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind verschiedene radikalische und nicht-radikalische Sauerstoffabkömmlinge, deren wichtigste Vertreter in **Tab. 1.1** aufgelistet sind.

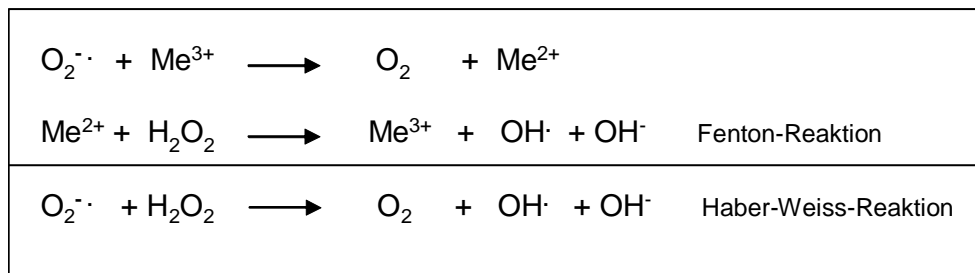
**Tab. 1.1** Reaktive Sauerstoffspezies (Markant et al., 1995)

Formel	Bezeichnung
$\text{HO}^\bullet$	Hydroxylradikal
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxidanionradikal
$\text{RO}^\bullet$	Alkoxyradikal
$\text{ROO}^\bullet$	Peroxyradikal
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid
$\text{NO}^\bullet$	Stickstoffmonoxid

ROS entstehen im aeroben Organismus aus molekularem Sauerstoff (Triplettsauerstoff, siehe **Abb. 1.4**) durch die verschiedenen Redoxprozesse während des Zellmetabolismus. ROS erfüllen nach heutigem Wissen wichtige Funktionen innerhalb der Signaltransduktion in der Zelle (Giorgio et al., 2005). Wird die Menge an generierten ROS jedoch über ein physiologisches Maß hinaus erhöht, so spricht man von oxidativem Stress (Sies, 1993), eine Schädigung der DNA ist wahrscheinlich. Um Schäden zu verhindern, besitzen aerobe

Lebewesen Antioxidantien (Superoxiddismutase, Glutathion, Carotinoide u.a.), deren Funktion das Herunterregulieren einer zu hohen Menge an ROS in der Zelle ist (Halliwell and Arouma, 1991).

**Hydroxylradikale** entstehen endogen durch metallkatalysierte Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Fenton-Reaktion (**Abb. 1.3**). Es sind sehr kurzlebige Moleküle, die ein hohes Redoxpotential besitzen und unspezifisch mit fast jeder Molekülart reagieren. Sie stellen die reaktivste Art der ROS dar und reagieren intrazellulär mit Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten (Halliwell and Gutteridge, 1984; Southorn and Powis, 1988; Halliwell and Arouma, 1991). Die Fenton-Reaktion spielt eine zentrale Rolle für die Toxizität von Sauerstoff.



**Abb. 1.3** Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen

**Singulett-Sauerstoff** kann je nach Elektronenkonfiguration in zwei energetisch unterschiedlichen Formen vorliegen (**siehe Abb. 1.4**). Der Unterschied besteht in der Lokalisation der  $\pi^*$ -Elektronen. Sind beide in einem  $\pi^*$ -Molekülorbital platziert, so ist der Zustand energieärmer. Befinden sich die beiden  $\pi^*$ -Elektronen mit entgegengesetztem Spin in zwei  $\pi^*$ -Molekülorbitalen, erhöht sich der Energieinhalt des Singulett-Sauerstoffs. Letztgenannte Form ist jedoch zu kurzlebig, um bei der Reaktion mit Biomolekülen eine Rolle zu spielen (Davies and Truscott, 2001). Singulett-Sauerstoff besitzt eine wesentlich geringere Reaktivität als Hydroxylradikale. Es entsteht in der Zelle durch die Photoaktivierung von endogenen Stoffen (Epe, 1991) oder in geringer Menge bei Reaktionen von Peroxidasen, Cytochromen oder Lipoxygenasen. Es stellt trotz der geringen Reaktivität ein wirksames Oxidationsmittel dar und kann mit Basen der DNA direkt reagieren. In Zellen führt diese Reaktion mit der DNA zur Entstehung oxidativer Basenmodifikationen wie 8-Hydroxyguanin (Epe, 1991).

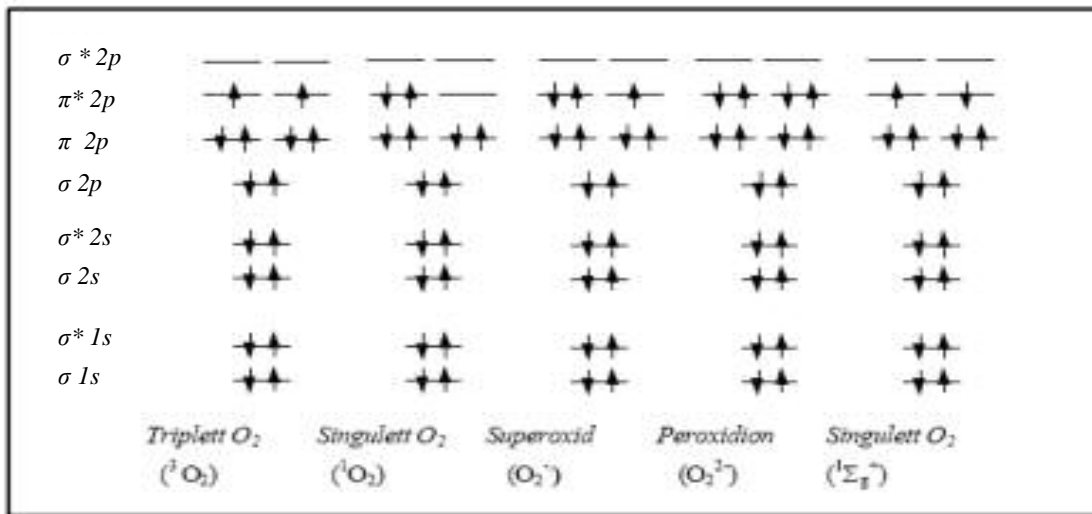


Abb. 1.4 Elektronenverteilung im Sauerstoffmolekül und in einigen ROS (Elstner, 1990)

Das **Superoxidanionradikal** wird durch die Aufnahme eines Elektrons in das antibindende  $2\pi^*$ -Molekülorbital des Triplett-Sauerstoffs gebildet. Diese Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff findet bei vielen zellulären Oxidationsreaktionen statt. Im sauren Milieu von biologischen Membranen wird das Radikal in seine protonierte Form, das Hydroperoxylradikal, überführt, welches in  $H_2O_2$  und molekularem Sauerstoff zerfällt (Abb. 1.5). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion kann durch das Enzym Superoxiddismutase um den Faktor 9 gesteigert werden (Markant et al., 1995).

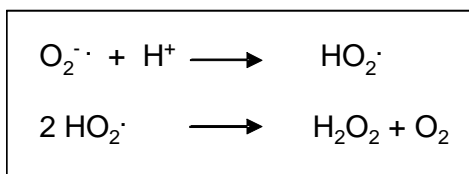


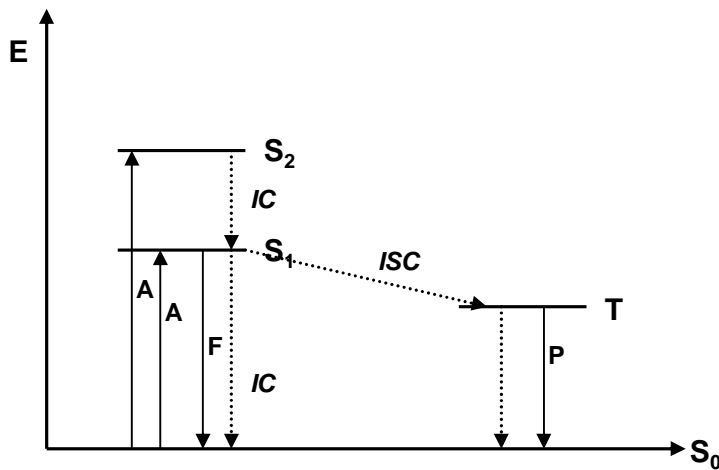
Abb. 1.5 Wasserstoffperoxidbildung durch Dismutation von Superoxid.

**Wasserstoffperoxid** ist nicht radikalisch und wird in den Zellen außer bei der Dismutation von Superoxidanionradikalen durch spezifische, peroxisomal lokalisierte Oxidasen, wie der D-Amino-, Harnsäure- und der Glykolat-Oxidase gebildet (Southorn and Powis, 1988). Es besitzt selbst nur wenig schädigendes Potential. Die schädigende Wirkung beruht vor allem auf der Umsetzung von  $H_2O_2$  zu Hydroxylradikalen (**Abb. 1.3**). Wasserstoffperoxid ist in Abwesenheit von Metallen bzw. spezifischen Enzymen (z.B. Katalase) relativ stabil und kann so über einen längeren Zeitraum intakt in der Zelle verbleiben.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen auch Produkte organischer Hydroperoxide, welche vor allem bei der Lipidperoxidation entstehen (Schieberle and Grosch, 1981; Chan, 1987). Die Moleküle sind in der Lage die DNA direkt zu schädigen. Andere Produkte, die bei der Fettoxidation anfallen, reagieren mit der DNA unter Bildung von Ethenoaddukten (Bartsch and Nair, 2000).

## **1.2 Photosensibilisierung**

Bestimmte Moleküle können Strahlung aus dem UV- und VIS-Bereich des Lichtspektrums absorbieren. Die Moleküle nehmen dabei Energie aus elektromagnetischer Strahlung auf (Absorption), wobei ein Elektron in einen höheren Energiezustand angehoben wird. Die photophysikalischen Prozesse bei Elektronen-Übergängen in einem Molekül können in einem Jablonski-Termschema (**Abb. 1.6**) vereinfacht dargestellt werden. Ein Termschema ist die Zusammenstellung aller Energieniveaus (Terme) eines Atoms, Ions oder Moleküls in übersichtlicher, zeichnerischer Darstellung. Die Energien der einzelnen Terme werden maßstäblich als waagerechte Striche so aufgetragen, dass der Strich mit der niedrigsten Energie (Grundzustand) am tiefsten liegt. Im primären Schritt gelangt das Molekül durch Absorption (A) von Strahlung vom Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Singulettzustand. Die längsten absorbierten Wellenlängen sind für den Übergang  $S_0$  nach  $S_1$  verantwortlich und die kürzerwelligen Strahlen für Übergänge aus dem Grundzustand in zunehmend höhere Singulettzustände. Im  $S_1$ -Zustand ist eine Reaktion mit anderen Molekülen unwahrscheinlich, da dieser nur von kurzer Dauer ist. Durch strahlungslose interne Konversion (IC) gelangt das Molekül unter Abgabe der überschüssigen Energie an seine Umgebung in den energetisch tiefstliegenden Singulettzustand  $S_1$ . Aus diesem metastabilen Zustand kann das Molekül auf unterschiedlichen Wegen zum Grundzustand ( $S_0$ ) zurückkehren. Den bevorzugten Weg bestimmt unter anderem die Struktur des Teilchens. Am häufigsten erfolgt der Übergang unter Spinerhalt durch strahlungslose Desaktivierung oder unter Emission von Licht. Ist Letzteres der Fall, so spricht man von Fluoreszenz (F). Aus dem angeregten Singulettzustand kann unter Spinumkehr auch der angeregte Triplettzustand (T) entstehen. Diesen strahlungslosen Übergang nennt man „intersystem crossing“ (ISC). Den Übergang vom angeregten Triplettzustand in den Grundzustand unter Lichtemission bezeichnet man als Phosphoreszenz (P).



**Abb. 1.6** Jablonski-Termschema; IC: Internal Conversion, ISC: Intersystem Crossing, A: Absorption, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz.

Im Triplettzustand (relativ langlebig) befindliche Moleküle (Photosensibilisatoren) können mit bestimmten anderen Molekülen reagieren (Photosensibilisierung). Streng genommen gilt die Bezeichnung Photosensibilisator für Stoffe, die nach der Photosensibilisierung wieder in ihre Ausgangsform zurückversetzt werden, also als Katalysatoren wirken. Wie in dieser Arbeit später deutlich wird, kann ein Photosensibilisator jedoch durchaus irreversibel verändert werden. In vielen Zellen vorkommende endogene Photosensibilisatoren sind Flavine (Eichler et al., 2005), Porphyrine (Duez et al., 2001), Melanine, Nukleoside, NADH, NADPH (Cunningham et al., 1985) und Tryptophan (Babu and Joshi, 1992).

Die schädliche Auswirkung von photosensibilisierenden Substanzen auf den Säugerzellorganismus wird in zwei Prozesse gegliedert: Die durch die Photoreaktion verursachte initiale Schädigung verschiedener Biomolekülverbindungen (DNA, Proteine, Membrane u.a.) und die darauf folgende biologische Reaktion (Zelltod, Mutationen).

Viele Photosensibilisatoren reagieren zusammen mit Licht mit mehr als einer Zielstruktur im biologischen System. Als Reaktionspartner dienen DNA, RNA, Proteine oder Zellmembrane (Kochevar, 1981).

Photoaktivierte Substanzen können über drei verschiedene Wege eine *direkte* Modifikation der DNA verursachen:

### 1. Energietransfer

Der angeregte Photosensibilisator (Sens\*) überträgt seine Energie auf ein Akzeptormolekül (A).



### 2. Ein-Elektronen- oder Wasserstoff-Transfer

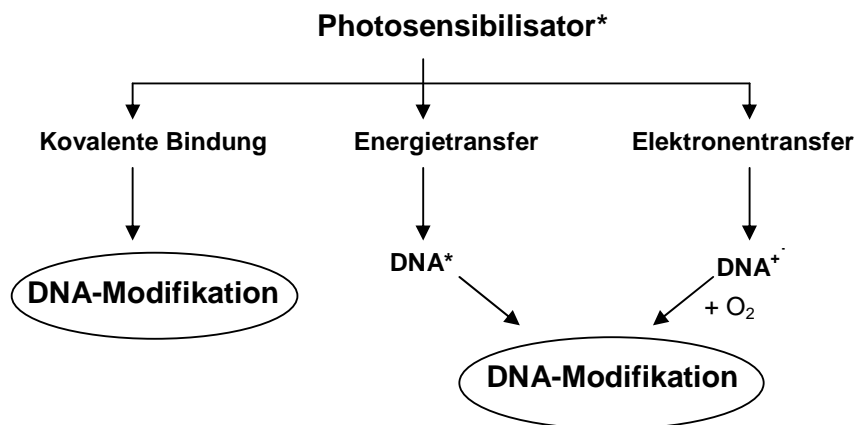
Der angeregte Photosensibilisator reduziert oder oxidiert den Akzeptor



### 3. Adduktbildung

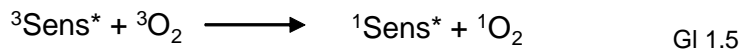
Der angeregte Photosensibilisator bindet kovalent an den Akzeptor.

Die drei möglichen Reaktionen fasst man unter dem Begriff der **Typ-I-Reaktionen** zusammen (**Abb. 1.7**).

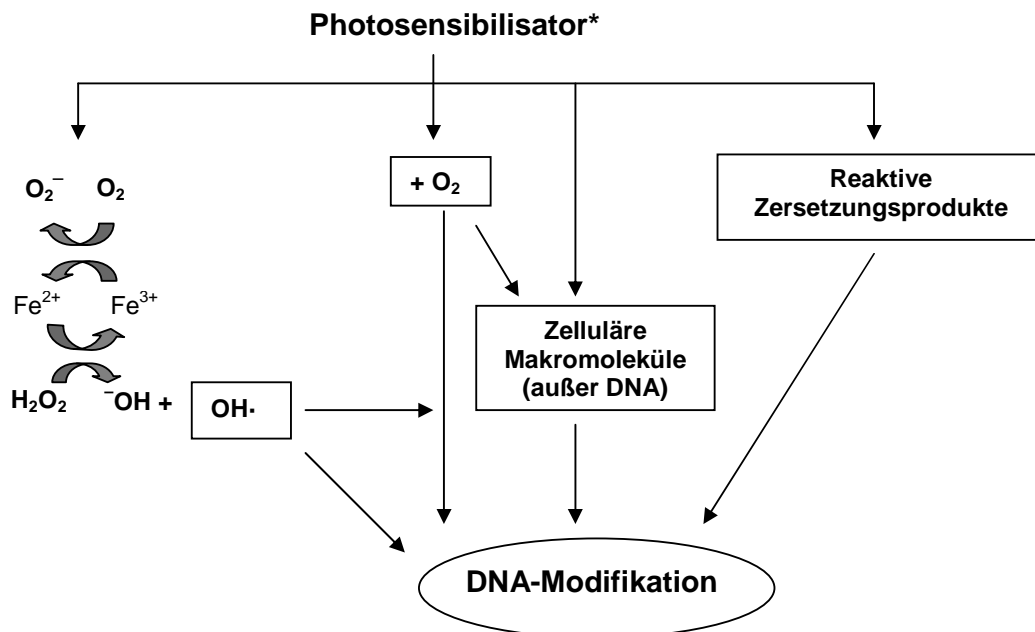


**Abb. 1.7** Typ I-Reaktion von Photosensibilisatoren (Epe, 1998).

Unter **Typ-II-Reaktionen (Abb. 1.8)** versteht man die *indirekte* Schädigung der DNA durch eine photoaktive Substanz unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff. Durch die Aufnahme von Energie bzw. eines Elektrons von dem Photosensibilisator kann es zur Entstehung von Singulett-Sauerstoff bzw. Superoxidanionradikalen kommen (Foote, 1968; Gollnick, 1968; Cadet et al., 1986; Piette et al., 1986b; Kochevar and Dunn, 1990). Daneben sind indirekte Schädigungen der DNA auch ohne Sauerstoffbeteiligung möglich (siehe **Abb. 1.8**).



Da die Energiedifferenz zwischen Singulett-Sauerstoff und Triplett-Sauerstoff nur 22 kcal/mol beträgt, können selbst photoaktive Stoffe, die lediglich energiearme, langwellige Strahlung absorbieren, Singulett-Sauerstoff bilden.



**Abb. 1.8** Indirekte Mechanismen zur Induktion von DNA-Modifikationen, nach Epe, modifiziert (Epe, 1998).

### **1.3 *In-vitro*-Tests zur Photogenotoxizitätsprüfung als Ersatz von Photokanzerogenitätsstudien an Nagern**

Ein Teil der vorliegenden Arbeit gehört zu einer Studie, welche an Hand eines Ringversuches die Validierung von bestimmten *in-vitro*-Testverfahren zur Photogenotoxizitätsprüfung zum Ziel hatte. Die folgenden Kapitel sollen die Studie und die damit verbundenen Zusatzuntersuchungen, welche den Inhalt dieser Arbeit darstellen, erläutern.

#### **1.3.1 *Bedeutung der Photogenotoxizitätsprüfung von Arzneistoffen***

Wie Eingangs erwähnt spielen die Arzneistoffe als exogene Photosensibilisatoren eine herausragende Rolle (siehe **Tab. 1.2**). Es gibt Stoffe, die topisch oder systemisch verabreicht unter Lichteinfluss eine Hypersensibilisierung der Haut hervorrufen. Solche unerwünschten Nebenwirkungen während einer Arzneimitteltherapie treten vor allem bei Sonnenlichtexposition der Haut auf und werden vom Patienten oft als eine Art Sonnenbrand wahrgenommen. Hält die Photosensibilisierung über einen längeren Zeitraum hinweg an, so kann es zu irreversiblen Schäden der Haut kommen. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass es sich bei solchen phototoxischen Arzneistoffen fast ausschließlich um auch photogenotoxische Substanzen handelt, die in der Zelle eine Schädigung der DNA verursachen. Die DNA-Modifikationen können zu Mutationen führen, was die Entstehung von Krebs fördert (Loveday, 1996b; Nataraj et al., 1996; Klecak et al., 1997). Eine strenge Prüfung auf phototoxische und photogenotoxische Eigenschaften von neuen Arzneimittelwirkstoffen in der präklinischen Prüfungsphase wird als notwendig erachtet, wenn der Stoff eine der folgenden Voraussetzungen erfüllt (Brendler-Schwaab et al., 2004) :

1. Die Substanz absorbiert Strahlung im UV- und/oder VIS-Bereich
2. Der Arzneistoff wird topisch appliziert
3. Der systemisch applizierte Arzneistoff erreicht eine hohe Konzentration in Hautzellen
4. Der Stoff ist ein Abkömmling eines bereits als photogenotoxisch deklarierten Stoffes

Es ist nach wie vor sehr schwierig Grenzwerte für die einzelnen Kriterien festzulegen (insbesondere bei Punkt 3). Besteht der geringste Verdacht auf ein photo(geno)toxisches Potential eines Stoffes, sollten Prüfungen durchgeführt werden.



Patienten, die potentiell phototoxische oder photoallergische Arzneimittel erhalten, sollten darauf hingewiesen werden, dass der ungeschützte Kontakt mit Sonnenstrahlen zu teilweise schweren Hautveränderungen führen kann.

**Tab. 1.2** Photosensibilisierende Arzneistoffe (Ferguson, 2002)

Antibiotika	Fluoroquinolone Tetracycline Sulfonamide
Antimykotika	Griseofulvin
Diuretika u. kardiovaskulär wirksame Stoffe	Thiazide Furosemid Amiodaron
Nicht-steroidale-Antiphlogistika	Naproxen Tiaprofensäure Piroxicam
Calcium-Kanal-Antagonisten	Nifedipin
Psoralene	8-Methoxypsoralen
Psychopharmaka	Phenothiazine Protryptilin
Retinoide	Isotretinoin Acitretin
Photodynamische Therapiesubstanzen	Foscan Photofrin

Die einzelnen Reaktionsarten eines Organismus bzw. einer Zelle auf die Einwirkung eines Photosensibilisators und Licht sind hier nochmals definiert (Definitionen nach In-vitro-3T3-NRU-Phototoxizitätstest; RL 2000/33/EG; 67/548/EWG):

1. Phototoxizität: eine akute toxische Reaktion, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten chemischen Stoffen bei anschließender Lichtexposition entsteht oder die auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffes induziert wird.

2. Photogenotoxizität: eine bei einem genetischen Endpunkt beobachtete genotoxische Reaktion, die nach der Exposition von Zellen mit einer nicht-genotoxischen Dosis UV/VIS-Licht und einem im Dunkeln nicht-genotoxischen Stoff auftritt.

3. Photoallergie: eine erworbene immunologische Reaktion, die nicht bei der ersten Behandlung mit chemischen Stoffen und Licht auftritt und eine Induktionszeit von einer oder zwei Wochen benötigt, bevor eine Hautreaktion nachgewiesen werden kann.

### **1.3.2 Prüfung auf Phototoxizität und Photogenotoxizität**

Für die Prüfung von photosensibilisierenden Stoffen werden traditionell und bis heute nahezu ausschließlich Tierversuche eingesetzt (Lambert et al., 1996; Jacobs et al., 2000) und es gibt weltweit keine Richtlinie, die das Vorgehen bei der präklinischen Photo-Sicherheitsprüfung für den Arzneimittelbereich verbindlich regeln. Als Versuchstiere werden vor allem Meerschweinchen und Ratten (Phototoxizität, Photoallergenität) verwendet. Die Prüfung auf Photogenotoxizität ist bisher nur indirekt möglich durch das Testen der Photokanzerogenität als Hauttumormodell an haarlosen Mäusen (Forbes, 1996). Der Versuch wird in der Regel über einen Zeitraum von einem Jahr durchgeführt, wobei mehr als 200 Tiere pro Versuch benötigt werden. Er ist für die Lebewesen besonders belastend, da sie Bestrahlungsdosen ausgesetzt sind, die bei der Mehrzahl der Tiere sehr schnell zu Erythemen und Augenschäden führen. Binnen weniger Wochen bilden sich bei fast allen Versuchstieren schnell wachsende Papillome, die die Tiere in ihrem Befinden und ihrer Beweglichkeit stark einschränken. Obwohl die Anzahl derartiger Prüfungen weltweit pro Jahr begrenzt ist, kann die Belastung der Tiere als lang andauernd und sehr hoch eingestuft werden. Eine Vermeidung dieses Tierversuches erscheint dringend geboten. Sollen die toxikologischen Tierversuche durch tierversuchsfreie Methoden ersetzt werden, so müssen die Methoden entsprechend den Empfehlungen der EU und der OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) experimentell validiert werden, um nachzuweisen, dass die Ergebnisse die mit den neuen Methoden erzielt werden, in gleicher Weise eine Abschätzung der gefährlichen Eigenschaften neuer Substanzen gestatten, wie die etablierten Tierversuche.

Bisher wurden lediglich vier tierversuchsfreie Alternativmethoden in die offiziellen behördlichen Prüfrichtlinien aufgenommen. Hierbei werden die Phototoxizität und die allergisierende Wirkung von Stoffen getestet, jedoch keine Photogenotoxizität. Zu den Tests zählen Untersuchungen mit roten Blutkörperchen (Pape et al., 2001), Lymphocyten, Hautzellen und einem künstlichen Hautmodell (Cohen et al., 1994; Liebsch et al., 1995; Api, 1997; Jones et al., 2001). Besondere Beachtung verdient der so genannte „*In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest“. Die Cytotoxizität in diesem Test wird ausgedrückt als konzentrationsabhängige Reduzierung der Aufnahme des Vitalstoffs Neutralrot durch Balb/c-3T3-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung und Behandlung mit der Testchemikalie. Er wurde im Zeitraum 1992-1997 (Spielmann et al., 1994; Anon, 1998; Spielmann et al., 1998) in einem gemeinsamen EU/COLIPA (*European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association*) -Projekt unter der Federführung der ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) im BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) entwickelt und validiert, um eine *In-vitro*-Alternative zu den herkömmlichen Tests zu etablieren. Die OECD empfahl 1996 ein *In-vitro*-Stufen-Testkonzept für die Beurteilung der Phototoxizität (OECD Test, 1996).

Zwei Jahre später wurde eine durch ECVAM (*European Center for the Validation of Alternative Methods*) und COLIPA überarbeitete Richtlinie an die OECD und die europäische Kommission weitergeleitet (Spielmann et al., 2000). Im Februar 2000 haben die zuständigen Behörden die tierversuchsfreie Methode zur Prüfung der Phototoxizität von chemischen Substanzen offiziell akzeptiert (Anon, 2000). Damit stand erstmals eine validierte und innerhalb der europäischen Union amtlich anerkannte Methode zur Prüfung der Phototoxizität zur Verfügung (Liebsch and Spielmann, 2002). In der Praxis zeigte sich, dass der Test keine falsch negativen Vorhersagen liefert, wohl aber gelegentlich falsch positive, wenn das phototoxische Potential eines photoreaktiven Stoffes sich erst in sehr hohen Konzentrationen zeigt, die in der Haut auf Grund geringer Aufnahme durch die Barriere nicht erzielt werden kann. Bei Verdacht auf eine solche Substanz sollte ein Test mit künstlichem Hautmodell ergänzt werden, bevor eine endgültige Aussage getroffen wird.

Als *In-vitro*-Photogenotoxizitätstests eignen sich der Photo-Chromosomenaberrationstest (Prüfung auf Klastogenität) (Müller and Kasper, 1998), der Photo-Mikrokerntest (Kersten et al., 1999; Snyder and Cooper, 1999; Kersten et al., 2002) und der Photo-Comet-Assay (Brendler-Schwaab et al., 2003).

Mutationen durch Photosensibilisatoren können prinzipiell mittels Photo-HPRT Test (an Zellen) oder Photo-Ames-Test (Bakterieller Rückmutationstest) festgestellt werden. Bei bakteriellen Testmethoden ergeben sich jedoch Probleme in Bezug auf die UV-Empfindlichkeit, die es unmöglich macht hohe Bestrahlungsdosen in Gegenwart von Bakterien einzusetzen. Es besteht außerdem der Verdacht auf eine variierende Sensibilität der Bakterien innerhalb des gleichen Stammes (COLIPA, 1995). Dennoch besteht das Ziel, ein Standard-Protokoll für bakterielle Photomutagenitätstests zu etablieren (Chetelat et al., 1993; Henderson et al., 1994; Photomutagenicity Task Force, 1995).

Die genannten Prüfmethode auf verschiedene genetische Endpunkte sind alle etabliert für die Untersuchung von Testsubstanzen ohne Bestrahlung. Für den speziellen Einsatz in Zusammenhang mit Photo-Effekten, können diese Methoden als mehr oder weniger validiert betrachtet werden, da die ergänzende Bestrahlung das Protokoll nicht grundlegend verändert. Die Problematik besteht in der Sensibilität der jeweils eingesetzten Testorganismen gegenüber der UV/VIS-Bestrahlung und der folglich geänderten methodischen Messgrenze, sowie der damit verbundenen Beurteilung der Genauigkeit der Messergebnisse (Gocke et al., 2000).

Die Prüfung von Chemikalien auf den Endpunkt der Photogenotoxizität mittels *In-vivo*-Methoden (Gorelick, 1996) erweist sich als problematisch, da die Haut ein schlecht standardisierbares Element darstellt. Dementsprechend sind in diesem Bereich bis heute kaum Daten verfügbar (Brendler-Schwaab et al., 2004).

Eine Photokanzerogenität von Testsubstanzen kann *in-vivo* nachgewiesen werden (siehe oben). Neben dem ethisch umstrittenen Einsatz von Versuchstieren weist eine solche Prüfung noch weitere Schwierigkeiten auf (Jacobs et al., 1999). Bei der Bestrahlung im UV-Spektrum wird eine Tumorbildung bei Mäusen durch den UVB-Anteil allein induziert. Schwach wirksame, aber positive Testsubstanzen werden folglich als solche evtl. nicht erkannt (Brendler-Schwaab et al., 2004). Haarlose Mäuse entwickeln durch die Behandlung relativ schnell Basalzellkarzinome, die Entstehung von, für den Menschen sehr gefährlichen, Melanomen kann hier jedoch nicht untersucht werden. Aus diesem Grund ist der zukünftige Einsatz von transgenen Maus-Melanom-Modellen (Beermann et al., 1999) nicht ausgeschlossen.

Die Prüfung auf Photokanzerogenität an Versuchstieren könnte nach heutigen Gesichtspunkten durch *In-vitro*-Tests auf Photogenotoxizität mit Säugerzellen ersetzt werden (Loperino, 1991; Loveday, 1996a; Müller and Kasper, 1998; Meunier et al., 2002). Für diese Prüfungen erscheinen der Mikrokerntest und der Comet Assay geeignet, welche in Vorarbeiten (Kersten et al., 1999; Brendler-Schwaab et al., 2003) gute Resultate erzielten. Um für die genannten Methoden allgemein Anerkennung in Form einer OECD-Richtlinie zu erhalten und dadurch effizient Tierversuche zu verhindern, bedarf es einer Validierung der Tests (Balls et al., 1990). Die Validierung toxikologischer Prüfmethode sollte nach den Vorarbeiten eines Labors in mehreren Laboratorien unter blinden Bedingungen mit einer ausreichend großen Anzahl von Prüfsubstanzen als Ringstudie durchgeführt werden.

### **1.3.3 Aufbau, Inhalt und Ziel der Studie**

Das BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) hatte in Kooperation mit der Bayer AG in einem vorangehenden Forschungsvorhaben zwei *in-vitro*-Testmethoden, den **Mikrokerntest** und den **Comet Assay**, als geeignete Methoden zur routinemäßigen Photogenotoxizitätsprüfung etabliert und präevaluiert. Für beide Tests wurden Standardprotokolle (*Standard Operation Procedure*, SOP) erarbeitet, die insbesondere auch die für die Testdurchführung geeigneten Strahlungsbedingungen genau beschreiben. Entsprechend den formalen Kriterien des ECVAM zur Prävalidierung von Alternativmethoden (Curren et al., 1995) sollte der erfolgreich abgeschlossenen Phase der Testmethodenentwicklung eine nächste Phase folgen, die die Übertragbarkeit der SOPs in andere Labors prüft, wobei Veränderungen mit dem Ziel der Optimierung der Protokolle in dieser Phase ermöglicht wurden. Es wurde außerdem die routinemäßige Anwendbarkeit der Methoden unter Verwendung von kodierten Testsubstanzen (blinde Bedingungen) in den verschiedenen Laboratorien überprüft. Dieses Forschungsvorhaben mit den Zusatzuntersuchungen (siehe 1.3.4) wurde vom BmBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) gefördert (Kennzeichen 0312916D) und wird im Folgenden als „Ringstudie“ bezeichnet.

Die Ringstudie wurde in der Zeit vom 01.08.2002 bis 30.11.2004 unter der Teilnahme von 7 Laboratorien durchgeführt:

- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn (D)
- Bayer AG, Wuppertal (D)
- RCC Cytotest Cell Research, Roßdorf (D)
- Johannes Gutenberg Universität ,Institut für Pharmazie, Mainz (D)
- Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
- Cosmital (Wella) SA, Marly (CH)
- Novartis Pharma AG, Basel (CH)

Getestet wurden 13 Substanzen, welche nach der vorliegenden wissenschaftlichen Literatur als „photogenotoxisch“ und „nicht-photogenotoxisch“ klassifiziert wurden (siehe **Tab. 1.3**). Die Stoffe wurden wegen der Prüfung auf Aussagekraft der Testmethoden mit einem Nummerncode versehen. Die Kodierung der Proben, deren Verteilung an die Teilnehmer, die Sammlung und biometrische Auswertung sämtlicher Ergebnisse wurde von der ZEBET im BgVV (Berlin) vorgenommen. Die wissenschaftliche Koordination und Organisation des gesamten Verbundprojektes wurde vom BfArM wahrgenommen.

**Tab. 1.3** Liste der Testsubstanzen für die Ringstudie

Positivsubstanzen (photogenotoxisch)	8-Methoxypsoralen Chlorpromazin Lomefloxacin Ciprofloxacin Methylenblau Proflavin Dacarbazin Doxycyclin
Negativsubstanzen (nicht-photogenotoxisch)	Promazin Ketoprofen Acridin Octylmethoxycinnamat Titandioxid

Bei den Testsubstanzen handelte es sich vorwiegend um bekannte photogenotoxische Arzneistoffe, wobei Chlorpromazin in allen Tests auch als nicht kodierte positive Kontrollsubstanz verwendet wurde. Die Bestrahlung bestand in allen Tests aus künstlich erzeugtem Sonnenlicht (Solarsimulator, siehe **3.2.2**).

Gliederung der Ringstudie:

## A) Vorexperimente:

1. Standardisierung der Bestrahlungsbedingungen aller Teilnehmer
2. Prüfung von Praktikabilität und Reproduzierbarkeit der SOPs anhand der Testung einer Positivsubstanz (Chlorpromazin) und einer Negativsubstanz (Chlorhexidin)
3. Prüfung der verblindeten Testsubstanzen hinsichtlich Löslichkeit und anwendbarem Konzentrationsbereich (*range finder*)

## B) Hauptstudie:

1. Durchführung des Mikrokerntests (siehe **3.1.7.3**) mit den zugewiesenen, kodierten Substanzen
2. Durchführung des Comet Assays (siehe **3.2.4**) mit den zugewiesenen, kodierten Substanzen
3. Biometrische Analysen aller Rohdaten und Auswertung der Ergebnisse nach Inter- und Intra-Laborvariabilität bzw. allgemeiner Richtigkeit der Ergebnisse

C) Mechanistische Zusatzuntersuchungen an ausgewählten Testsubstanzen (**1.3.4**)

Die in den einzelnen Labors ermittelten Daten aller Studienabschnitte wurden in vorgefertigte Excel-Datenblätter (*Spreadsheets*) eingetragen und zu ZEBET geschickt, wo eine mathematische Analyse der Ergebnisse mit dem Ziel einer Vorhersagbarkeit der Photogenotoxizität einer Substanz durchgeführt wurde.

Die Versuche mit den verblindeten Substanzen der Ringstudie (Punkt A und B) sowie die Untersuchung von, aus den Testsubstanzen ausgewählten, nicht-kodierten Arzneistoffen in Bezug auf Schädigungsart, -ausmaß und -mechanismus (Punkt C) wurden in unserem Labor parallel durchgeführt. Nach Ablauf der Studie und damit erfolgter Decodierung der Stoffe waren einige experimentelle Aufklärungsversuche zu C notwendig und wurden noch nach offiziellem Ablauf der Ringstudie durchgeführt.

Die Auswahl der Bestrahlungsbedingungen für die Versuche stellt einen Kompromiss zwischen natürlicher Sonnenlichtsimulation einerseits und der Vermeidung hoher Absorption durch die DNA andererseits dar. Würde die zelluläre DNA ohne Einfluss einer Testchemikalie, nur durch die Strahlung stark geschädigt, so wäre das Messen der Photogenotoxizität einer Substanz auf Grund von methodisch bedingten Messgrenzen erschwert. Unter diesen Aspekten war es nötig, die UVB-Dosis der künstlichen Sonnenlichtbestrahlung so gering wie möglich zu halten. Besonders der Mikrokerntest zeigte im Experiment eine hohe UVB-Empfindlichkeit. In der Literatur werden keine bestimmten

UV-Dosen für die Tests empfohlen, es gilt die geeigneten Bedingungen experimentell zu ermitteln.

Die zu etablierenden Testmethoden wurden wie in **3.1.7.3** und **3.2.4** beschrieben an V79-Zellen (Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters) durchgeführt. In beiden Fällen ist eine Vorinkubation der Zellen mit der Substanz zur Vermeidung falsch-negativer Testergebnisse durch verlangsamte Aufnahme der Testsubstanz in die Zelle notwendig.

Die Ergebnisse der Ringstudie werden hier nur unter Berücksichtigung der Fragestellungen in **1.3.4** wiedergegeben (siehe **4.5**) und beinhalten die Daten zu den in dieser Arbeit untersuchten Arzneistoffen (siehe Ergebnisteil, **4**)

### **1.3.4 Zusatzuntersuchungen in Verbindung mit der Ringstudie**

Für die in der Ringstudie verwendeten Testsubstanzen existieren viele Arbeiten, in denen untersucht wurde, ob es sich um photogenotoxische oder um nicht-photogenotoxische Stoffe handelt. Für alle Substanzen liegen jedoch bisher kaum detaillierte Untersuchungen zur Art und Mechanismus der DNA-Schädigung vor. In dem Forschungsvorhaben ging es außer dem in **1.3.3** beschriebenen Ziel darum, die mechanistischen Aspekte der *In-vitro*-Photogenotoxizität näher zu beleuchten. Die Anwendung der *In-vitro*-Tests sollte hier über das reine Screening hinaus erweitert werden. Die zu erreichende „mechanistische Plausibilität“ erhöht die Akzeptanz sowohl bei Anwendern als auch bei Behörden. Hierzu müssen die molekularen Grundlagen der untersuchten Effekte und mögliche Wechselbeziehungen zu anderen zellulären Wirkungen möglichst gut verstanden sein. Aus diesem Grund sollten für ausgewählte Testsubstanzen zusätzliche Endpunkte an Hand von Methoden mit Zellen und reiner DNA erfasst werden, detaillierte Kenntnis über die Art und den Mechanismus der Schädigung von zellulärer und zellfreier DNA erlangt werden, sowie eine Korrelation der Daten der verschiedenen Methoden und Endpunkte vollzogen werden. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob es einen Zusammenhang zwischen einer bestimmten Art von DNA-Schäden in Zellen und nachfolgender Entstehung von Mikrokernen gibt. Auftretenden Besonderheiten während der Untersuchungen der Stoffe sollte genauestens nachgegangen werden, mit dem Ziel der Aufklärung der photogenotoxischen Wirkmechanismen von Arzneistoffen (siehe auch Zielsetzung, **2**).

### 1.3.4.1 Testsubstanzen

Zur Molekülstruktur der Stoffe siehe **Tab. 4.2**.

#### Chlorpromazin

Chlorpromazin (2-Chloro-10-(3-dimethyl-aminopropyl)-phenothiazin) zählt zur Klasse der Phenothiazine. Das 1952 eingeführte Arzneimittel wird zur Behandlung von Psychosen als mittelstarkes Neuroleptikum eingesetzt und wirkt außerdem noch antihistaminisch, antiemetisch und schwach lokalanästhetisch. Wegen der sehr rasch einsetzenden sedativen Wirkung ist das Mittel gut geeignet zur Initialbehandlung von Psychosen, die mit Erregungszuständen und Unruhe verbunden sind. Es verbessert insbesondere bei Schizophrenen die psychischen Symptome, ohne das Bewusstsein und die intellektuellen Fähigkeiten wesentlich zu beeinflussen. Weiterhin kann es zur Behandlung von zentral ausgelöstem Erbrechen sowie in der Narkose-Prämedikation verwendet werden. Seine Wirkung beruht auf der Blockade von postsynaptischen Dopaminrezeptoren,  $\alpha$ -Rezeptoren, Serotonin- und Muskarin-Rezeptoren. Chlorpromazin ist außerdem in der Lage die Wiederaufnahme von Noradrenalin zu hemmen und schaltet das Thermoregulationszentrum aus, was zur Erzeugung einer kontrollierten Hypothermie ausgenutzt werden kann. Die Anwendung von Chlorpromazin als Pharmakon in der Humanmedizin ist heute selten geworden, es kommt jedoch noch häufiger in der Landwirtschaft z. B. zur Sedierung von Schlachtschweinen zum Einsatz.

Bereits kurz nach der Einführung des Stoffes wurden photokontaktallergische Ekzeme beobachtet (Schulz et al., 1956; Eppstein et al., 1957; Horio, 1975). Dies geschah vor allem bei Krankenpflegepersonal, das häufigeren Hautkontakt mit dem Medikament hatte (Rudzki, 1979). Der Sensibilisierung der Haut von Personen im Gesundheitsdienst konnte durch entsprechende galenische Maßnahmen Einhalt geboten werden.

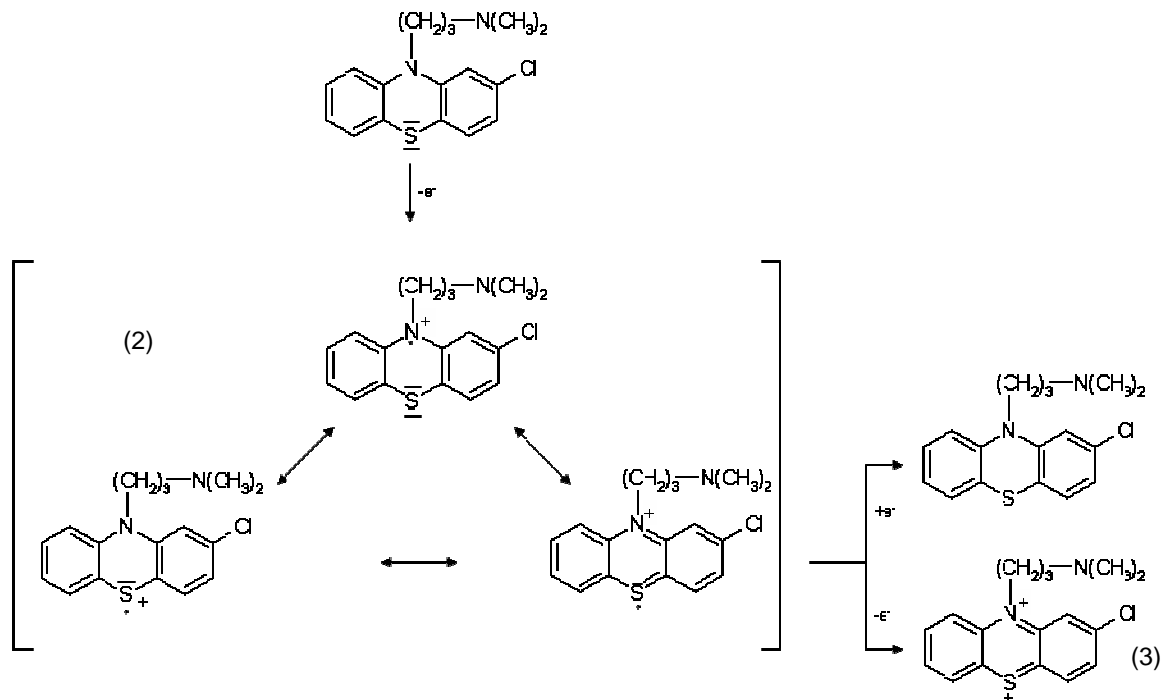
Die Substanz erwies sich in zahlreichen Studien als photogenotoxisch (siehe **5.2.1**), wobei der zu Grunde liegende Mechanismus bis heute unbekannt ist.

Chlorpromazin wurde bei den Untersuchungen der Ringstudie sowohl als Positiv- als auch als verblindete Testsubstanz verwendet.

Unter UVA- und Sauerstoff-Einwirkung zersetzt sich CPZ (1) (**Abb. 1.9**) *in-vitro* zunächst auf Grund der guten Elektronendonator-Eigenschaft (Karreman et al., 1959) zu einem mesomeriestabilisierten roten Radikalkation (2) (Feldmeister and Discher, 1964; Levy et al., 1972; Iwakowa and Kondo, 1974). Die entstandenen Radikale können wieder zu CPZ reduziert, oder zu einem Phenazathonium-Ion (3) oxidiert werden (Disproportionierung des



Radikalkations). Diese Reaktion läuft jedoch nicht im sauren Milieu ab, die Radikalkationen sind dort stabilisiert.



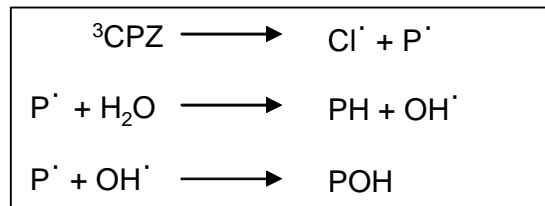
**Abb. 1.9** Photoinduzierte Oxidation von Chlorpromazin (Eger et al., 1999).

Eine weitere photoinduzierte Reaktion des CPZ ist die Chlor-Abspaltung, welche bevorzugt unter sauerstoffarmen Bedingungen abläuft (Eger et al., 1999). Untersuchungen zu Photozerfallsreaktionen des CPZ in Gegenwart von DNA ergaben, dass es auch bei Anwesenheit von Sauerstoff zur Dechlorination von CPZ kommt (Kahn and Davies, 1970; Grant and Greene, 1972; Rosenthal et al., 1978; Decuyper et al., 1984). Produkte einer derartigen Reaktion sind das Chlorradikal und das Promazinylradikal.

Die Bildung des genannten Radikalkations (**Abb. 1.9**) wurde auch bei der Bestrahlung von Promazin nachgewiesen (Decuyper et al., 1984). Andere Phenothiazine (neben CPZ) bilden ebenfalls Radikalkationen (Merkle et al., 1964). Die Radikalkationen, die in 2-Position einen elektronenziehenden Substituenten haben, reagieren schneller und effektiver mit Nukleophilen (Sackett and McCreery, 1979), was u.a. zur Bildung von Sulfoxiden führt (s.u.).

Es scheint gesichert, dass die Elektronenabgabe die häufigste Reaktion nach Anregung der Substanzen mit Phenothiazingrundgerüst ist. Weitere Folgereaktionen des Radikalkations hängen von der Art der anwesenden Reaktionspartner ab. Bei der Inkubation mit biologischen Makromolekülen (wie DNA) können diese Reaktionen sehr vielfältig sein.

Grant und Greene fanden heraus (Grant and Greene, 1972), dass CPZ in wässriger Lösung (*in vitro*) unter dem Einfluss von Sonnenlicht auch zu Promazin (PZ) und 2-Hydroxypromazin (2HPZ) umgewandelt werden kann. Das angeregte CPZ im Triplettzustand spaltet ein Chloratom ab und wird selbst zum Promazinylradikal (Saucin and Van der Horst, 1980). Letzteres kann mit Wasser zu PZ bzw. 2HPZ reagieren (Grant and Greene, 1972) (**Abb. 1.10**).



**Abb. 1.10** Reaktion von photoaktiviertem CPZ zu Promazin (hier: HP) und 2-Hydroxypromazin (hier POH) (Grant and Greene, 1972).

Weiterhin wurde bei der Bestrahlung von CPZ in wässriger Lösung die Bildung von Chlorpromazinsulfoxid (CPZSO) nachgewiesen (Feldmeister and Discher, 1964; Iwakowa and Kondo, 1974; Ljunggren and Moller, 1977; Sackett and McCreery, 1979). Dieser Metabolit hat ein Absorptionsmaximum von 340 nm, welches im Gegensatz zu den Absorptionsmaxima von CPZ (siehe **Tab. 4.2**) deutlich im UVA-Bereich liegt. An Patienten (Schulz et al., 1956) und Mäusen (Hunter et al., 1970) wurde gezeigt, dass nach CPZ-Gabe durch die UVA-Bestrahlung eine höhere Phototsensibilität als nach UVB-Bestrahlung auftrat. *In-vivo*-Untersuchungen an Rattenhaut konnten zeigen, dass nach systemischer Gabe von CPZ und Bestrahlung mit UVA-Licht aus photoaktiviertem CPZ vor allem PZ, 2HPZ und wenig CPZSO entstehen (Schoonderwoerd et al., 1989). In humanem Plasma wurde nach einer oralen Gabe von nur 50 mg CPZ nachgewiesen, dass mehr als die Hälfte der CPZ-Menge in CPZSO umgewandelt werden (Yeung et al., 1983). Den Metaboliten kommt daher bei der Aufklärung der Phototoxizität durch CPZ eine hohe Bedeutung zu.

Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zu Photoreaktionen des CPZ sind oft im Substanz-Lösungsmittel-Gemisch ohne Anwesenheit von Biomolekülen durchgeführt worden. Die Befunde dienen als Grundlage zur Aufklärung der Reaktionen in Gegenwart von DNA. Während bei den zellfreien Versuchen die Nähe zur DNA unmittelbar gegeben ist und die Substanz sofort in Kontakt mit der DNA tritt, befindet sich im Zellexperiment die zugegebene Untersuchungssubstanz zuerst im Behandlungsmedium der Zellen. Der Kontakt zur zellulären DNA hängt also von der intrazellulären Bioverfügbarkeit und damit von den molekularen Eigenschaften des Stoffes, dem pH-Wert des umgebenden Mediums und der Beschaffenheit von Zellmembranen ab.

Reaktionen mit der DNA werden schließlich für die photomutagenen Effekte durch CPZ verantwortlich gemacht (Kochevar, 1981), welche in Bakterien und Zellen nachgewiesen werden konnten (Kelly-Garvert and Legator, 1973; Jose, 1979; Merville et al., 1983).

### **Promazin**

Promazin (10-(3-Dimethylamonipropyl)-phenothiazin) ist ebenfalls ein Neuroleptikum und besitzt ein zu Chlorpromazin analoges Wirkungsspektrum. Die Substanz wurde in die Liste der Ringstudien-Testsubstanzen als nicht-photogenotoxische Verbindung aufgenommen.

### **Lomefloxacin und Ciprofloxacin**

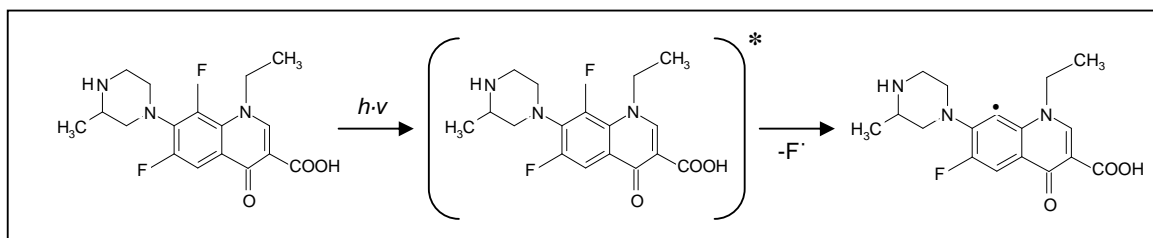
Lomefloxacin (1-Ethyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-chinolin-carbonsäure) und Ciprofloxacin (1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolin-carbonsäure) gehören zu den Fluorochinolonen. Es sind antibakteriell wirkende Gyrasehemmer, die peroral sehr gut bioverfügbar sind (Holzgrave, 2000) und ein breites Wirkungsspektrum besitzen. Sie werden eingesetzt bei Nieren-, Harnwegs- und Atemwegsinfektionen. Die Wirkung beruht auf der Hemmung der DNA-Gyrase von Bakterien, welche in der Funktion der eukaryontischen Topoisomerase II entspricht. Dieses Enzym sorgt durch eine starke Verdrillung der DNA (*Supercoiling*) dafür, dass der DNA-Strang in der Zelle Platz findet. Die Verdrillung geschieht durch Aufbrechen der DNA-Doppelhelix, spiralige Verdrillung und dem (wieder) Verbinden der DNA-Stränge mit Hilfe von vier verschiedenen Untereinheiten des Enzyms. So ist eine energetisch günstige DNA-Duplikation, schnelle Replikation, Transkription und Rekombination der DNA möglich. Die Arzneistoffe sorgen durch Anlagerung an das Enzym für eine Fixierung der DNA im offenen Zustand. Wegen der hohen Stabilität des DNA-Gyrase-Fluorochinolon-Komplexes (Shen and al., 1989; Shen and Chu, 1996) werden enzymatische Reaktionen in der Bakterienzelle ausgelöst, die zum Zelltod führen können. Säugetierzellen werden im Normalfall nicht von den Gyrasehemmern beeinflusst, da diese Topoisomerase II weniger Untereinheiten besitzt als die Gyrase. Es ist jedoch anzumerken, dass bei der Verwendung von hohen Dosen der Substanzen auch die eukaryotische Topoisomerase II gehemmt werden kann (Herbold et al., 2001). Untersuchungen an Enzymen von resistenten Bakterien haben gezeigt, dass die Gyrasehemmer in hohen Dosen auch die Funktion der Topoisomerase IV grampositiver Bakterien stören (Shen et al., 1997). Die Aufgabe dieses Enzyms ist es, nach der DNA-Replikation die zwei doppelsträngigen DNA-Ringe voneinander zu lösen. Dies geschieht in ähnlicher Weise wie das genannte *Supercoiling* durch die Gyrase.

Gyrasehemmer zeigen eine ausgeprägte Phototoxizität, welche mit der Substitution verschiedener Reste am Molekül variiert (Christ, 1998). Die Höhe des phototoxischen Potentials korreliert meist jedoch mit der antibiotischen Wirksamkeit des Arzneistoffes.

Solche stark wirksamen Fluorochinolone sind im Wesentlichen für die klinische Anwendung vorgesehen. Ein Beispiel hierfür ist das zu untersuchende Lomefloxacin (Aldridge et al., 1989), welches auf Grund der starken phototoxischen Wirkung (stärker als Ciprofloxacin) nicht zur systemischen Therapie, jedoch zur lokalen Anwendung bei bakteriellen Infektionen am Auge in Deutschland zugelassen wurde. Die Anwendung bei bakterieller Konjunktivitis sollte jedoch nur nach strenger, fachärztlicher Indikationsstellung erfolgen (ZCT, 2000).

Für die Substanzen wurde in einigen Studien eine photogenotoxische Wirkung nachgewiesen (siehe 5.2.2).

Bei der Bestrahlung werden die Fluorochinolone durch die Absorption von UV-Licht zu reaktiven Metaboliten umgewandelt (Martinez et al., 1997). In Abhängigkeit von ihrer Substitution an C-8 reagieren sie unterschiedlich, wonach sich auch ihr phototoxisches Potential richtet (Ferguson, 1995; Christ, 1998). Je elektronegativer der Substituent, desto schneller erfolgt dessen Abspaltung. Lomefloxacin (LOF) besitzt in 8-Position ein Fluoratom und Ciprofloxacin (CIF) ein Proton (siehe Tab. 4.2). Während CIF unter UVA-Bestrahlung nicht defluoriert (da Fluor nur in Position 6 vorhanden) (Martinez et al., 1997), zeigt LOF unter Lichteinfluss eine Defluorination in Position 8 (Fasani et al., 1998) (Abb. 1.11). Dadurch entsteht an dieser Stelle des Moleküls ein Carben, welches sehr reaktiv und wahrscheinlich für die DNA-Schädigung verantwortlich ist (Martinez et al., 1997; Martinez and Chignell, 1998).



**Abb. 1.11** Reaktion von Lomefloxacin mit Licht und Bildung eines Fluorochinoloneradikals.

Für die Fluorochinolone wird allgemein die Schädigung der DNA über den Typ-II-Mechanismus angenommen (Gocke et al., 1998), indem die entstehenden Radikale mit  $\text{H}_2\text{O}$  oder das angeregte Fluorochinolone mit  $\text{O}_2$  zu ROS reagieren (s.u.) (Rosen et al., 1997; Umezawa et al., 1997; Spratt et al., 1999).

Neben ihrer therapeutischen Funktion (siehe 1.3.4.1) durch Hemmung der DNA-Gyrase von Bakterien, besitzen diese Antibiotika die Fähigkeit in Abhängigkeit von Dosis und Molekülstruktur, die Topoisomerase II von Säugerzellen zu hemmen (Barret et al., 1989; Elsea et al., 1992). Daher zeigen einige Vertreter dieser Substanzklasse genotoxische Effekte in zellulären Testsystemen sogar im Dunkeln, jedoch in für den therapeutischen Einsatz irrelevant hohen Dosen (Herbold et al., 2001). Für Ciprofloxacin (CIF) wurden daher einige Untersuchungen durchgeführt, die besagen, dass CIF mutagen (Gocke, 1991) und DNA-Reparatur-induzierend im Dunkeln ist (Bredberg et al., 1989; McQueen et al., 1991).

Unter diesen Bedingungen wurden jedoch keine DNA-Addukte mit CIF nachgewiesen (McQueen et al., 1991).

Die Schäden an der DNA können verantwortlich gemacht werden für die beobachtete Mutagenität (V79-Zellen) (Jeffrey et al., 2000). Mäuse, die mit Fluorochinolonen und UVA-Licht behandelt wurden, entwickelten Hauttumore als Konsequenz der Mutagenität der Substanzen (Klecak et al., 1997).

### **Doxycyclin**

Doxycyclin ( $\alpha$ -6-Desoxy-5-hydroxytetracyclin) gehört zu den Tetracyclinen (tetracyclische biogene Arzneistoffe) und ist ein Antibiotikum mit einem breiten Wirkungsspektrum. Es zählt zu den antibiotischen Substanzen mit Langzeitwirkung und ist bakteriostatisch wirksam gegen grampositive (z.B. Staphylokokken und Streptokokken) und gramnegative (z.B. Brucellen, Campylobacter und Neisserien) Bakterien. Von wichtiger Bedeutung ist die Wirkung auf zellwandlose Problemkeime wie Mykoplasmen und Chlamydien. Die Wirkung wird erzielt durch die Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese durch Verhinderung der Anlagerung der Aminoacyl-tRNA während der Translation an die Akzeptorstellen der 30S-Untereinheit der Ribosomen. Die Toxizität für den Menschen ist gering und kann durch die spezifische Interaktion mit bakteriellen und nicht eukaryontischen Ribosomen erklärt werden, welche jedoch dosisabhängig ist. Neuere Studien weisen außerdem auf eine anti-entzündliche Wirkung der Substanzklasse hin (Elliott, 2004). Tetracycline bilden mit 2- und 3-wertigen Kationen ( $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) schwerlösliche Komplexe, was bei der Therapie mit diesen Mitteln beachtet werden sollte (Keine gleichzeitige Einnahme von Milchprodukten).

Doxycyclin (DXC) ist eine phototoxische Substanz (Bonnetblanc, 2002), dessen Mechanismen der Phototoxizität durch die Bildung zahlreicher Photoprodukte und vielseitigen Reaktionen mit Biomolekülen sehr kompliziert sind. Studien beweisen, dass DXC unter dem Einfluss von Licht Lyse von Erythrozyten (Bjellerup and Ljunggren, 1985) verursacht, das Zellwachstum von Fibroblasten hemmt (Bjellerup et al., 1985) und Monozyten schädigt (Hassan et al., 1984).

Das Molekül besitzt auf Grund seiner Biosynthese eine hohe Polyfunktionalität. Die leichte Zersetzlichkeit ist durch die hohe Anzahl an funktionellen Gruppen bedingt (Eger et al., 1999). Die Bestrahlung mit UVA oder sichtbarem Licht verursacht eine Desaminierung an C-4 des Tetracyclinringesystems (**Tab. 4.2**) (Hlavka and Bitha, 1966). Die ersten Radikale, die durch die Bestrahlung entstehen sind also das Dimethylaminoradikal und das 4-Desdimethylaminotetracyclinradikal (Martin et al., 1987). Die folgenden Oxidationen der Radikale verursachen Nebenreaktionen mit Sauerstoff und es werden verschiedene ROS gebildet. Stabile Tetracycline wie beispielsweise Minocyclin, die keine photolytische Desaminierung erfahren, zeigen auch keine Phototoxizität *in vivo* (Hassan et al., 1984).

Die Schädigung der DNA durch photoaktiviertes Doxycyclin wurde ebenfalls in einigen Studien bewiesen (siehe **5.2.3**).

### **Methylenblau**

Bei Methylenblau (Methylthioniumchlorid) handelt es sich um eine in der Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckte Substanz, welche als Antiseptikum verwendet werden kann. Es dient außerdem als Vitalfarbstoff zur oberflächlichen Färbung von Geweben verschiedener Art. Heutzutage findet es vor allem Anwendung in der Biochemie als Inhaltsstoff verschiedener Färbelösungen (Löfflers Methylenblau-Lösung, Unnas Methylenblau, May-Grünwald-Lösung u.a.) zur Anfärbung von Zellmaterial (Wurm et al., 1990). Die Substanz kann als Antidot bei Methämoglobinämie eingesetzt werden, wobei sie als Reduktionsmittel für das  $\text{Fe}^{3+}$  im Methämoglobin dient und die Sauerstoffbindefähigkeit des Hämoglobins durch  $\text{Fe}^{2+}$  wiederherstellt (Wright et al., 2004). Es wurde außerdem eine Wirkung von Methylenblau gegen Malariaerreger festgestellt (Schirmer et al., 2003).

Methylenblau absorbiert Strahlung des sichtbaren Lichtspektrums und wirkt photosensibilisierend. Da es keine empfohlene Therapieanwendung für die Substanz gibt, hat die Gefahr der Photosensibilisierung für den Menschen in diesem Zusammenhang keine praktische Relevanz.

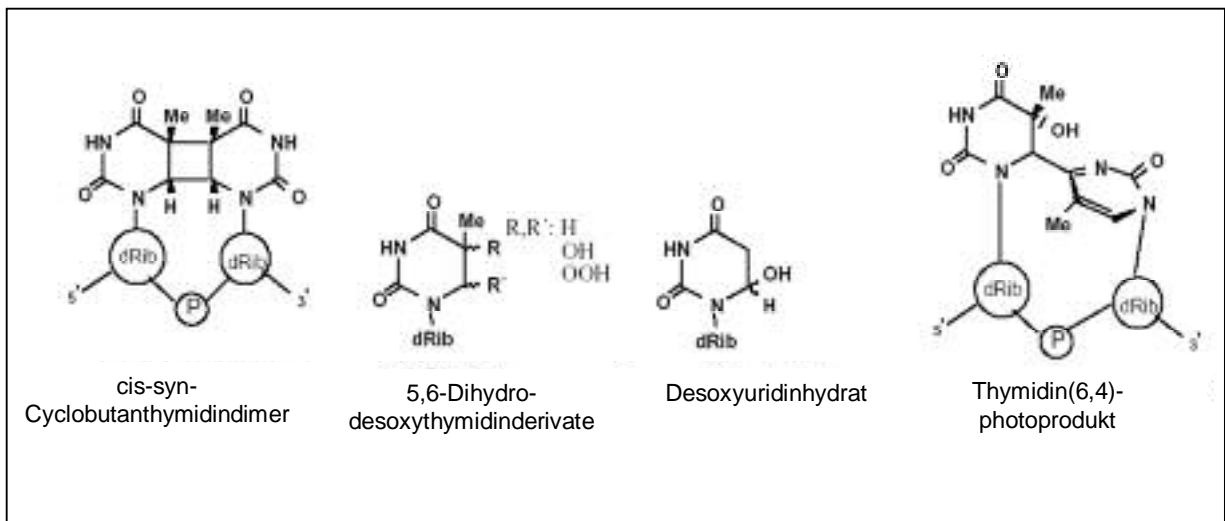
Methylenblau (MTB) ist ein in früherer Arbeit zellfrei gut untersuchter Typ-II-Photosensibilisator (Epe et al., 1993) (siehe auch **5.2.4**). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass photoaktiviertes MTB in die DNA interkaliert (Norden and Tjerneld, 1982; OhUigin et al., 1987) und extern an die DNA binden kann (OhUigin et al., 1987). OhUigin konnte zeigen, dass in Gegenwart von Magnesiumionen die genannte interkalative Bindung von angeregtem MTB mit der DNA zugunsten der externen Bindung abnimmt. Die Fähigkeit des MTB zur Interkalation kann durch die planare Struktur des Moleküls (PhenothiazinGrundgerüst) und der Anwesenheit von elektrophilen Stellen (am N der Substituenten, siehe **Tab. 4.2**) erklärt werden. MTB ist außerdem in der Lage unter Lichteinfluss Photoprodukte zu bilden (Waskell et al., 1966), über diese ebenfalls Reaktionen mit der DNA möglich wären.

Für MTB konnte außerdem ein mutagenes Potential nachgewiesen werden (McBride et al., 1992).

## 1.4 DNA-Schäden

### 1.4.1 Direkt, durch UV-Strahlung, induzierte Basenmodifikationen

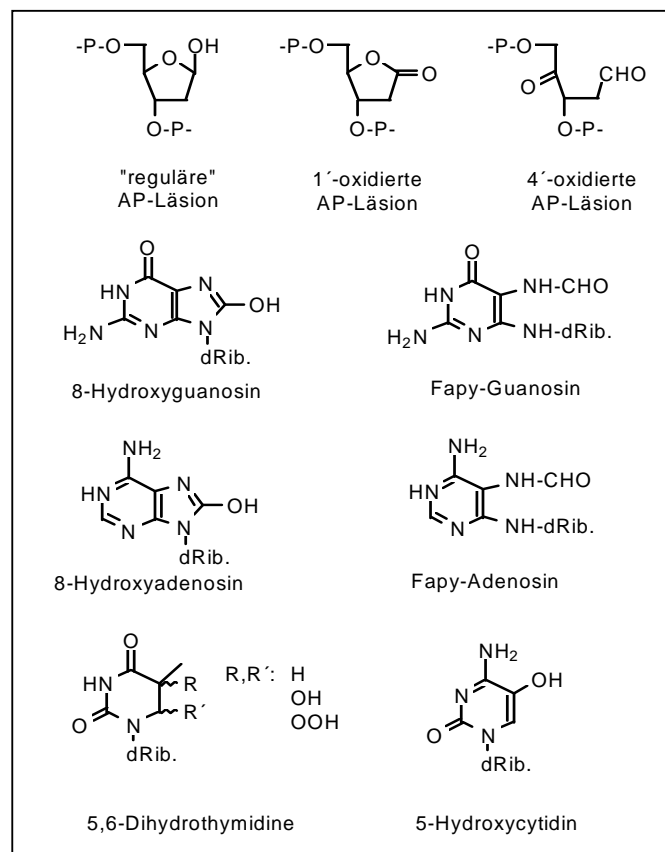
Solare Strahlung wird von den Bestandteilen einer Zelle unterschiedlich stark absorbiert. Während beispielsweise Riboflavin und Melanin durch UVA-Strahlung bzw. sichtbares Licht aktiviert werden können, erfolgt eine Anregung der DNA ganz überwiegend im UVB-Bereich. Durch direkte Anregung entstehen vor allem Cyclobutan-Pyrimidindimere und Thymidin(6-4)-photoproducte (Lippke et al., 1981; Mitchell and Nairn, 1989; You et al., 2001) (siehe **Abb. 1.12**). Neben diesen DNA-Schäden werden in sehr geringer Menge monomere Produkte nach Bestrahlung der DNA mit UVB-Licht gebildet, wie 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin, 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin und 5-Hydroxy-5,6-dihydrothymidin (Doetsch et al., 1995).



**Abb. 1.12** Basenmodifikationen nach direkter Anregung der DNA durch UV-Strahlung, nach Brendler-Schwaab, modifiziert (Brendler-Schwaab et al., 2004).

### 1.4.2 Indirekte, durch ROS induzierte Basenmodifikationen

Die Gruppe der DNA-Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies induziert wird, umfasst zahlreiche verschiedene Verbindungen. Neben Basenmodifikationen existieren Einzel- und Doppelstrangbrüche (Epe et al., 1988), basenfreie Stellen (AP-Läsionen, apurinische oder apyrimidinische Stellen), sowie Vernetzungen (*cross-links*) zwischen DNA-DNA- oder DNA-Protein-Molekülen (Dizdaroglu, 1992). Einige dieser DNA-Basenmodifikationen sind in **Abb. 1.13** dargestellt. Die häufigste Basenmodifikation ist das 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin, 8-oxoG), welches in der DNA in der Ketoform vorliegt und durch Hydroxylradikale, Singulett-Sauerstoff oder Photosensibilisatoren induziert werden kann (Epe et al., 1988; Epe, 1991; Will et al., 1999). Guanin ist wegen des geringen Oxidationspotentials die am leichtesten zu oxidierende Base (Hüttermann, 1982). Durch Wasserstoffabstraktion kann es an den Desoxyriboseresten zur Entstehung von AP-Läsionen oder Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommen (Halliwell and Arouma, 1991). Die Generation von oxidierten AP-Läsionen kann durch Angriff von Radikalen an 1'-, 2'- oder 4'-Position des Zuckers geschehen (Epe, 1995). Hydroxylradikale können auch Adenin oxidieren, es bildet sich 8-Hydroxyadenin oder Fapy-Adenin (Halliwell and Arouma, 1991).



**Abb. 1.13** Einige DNA-Basenmodifikationen, verursacht durch reaktive Sauerstoffspezies.



## 1.5 DNA-Reparatur

In jeder Zelle des menschlichen Körpers entstehen pro Tag eine Vielzahl von chemisch veränderten DNA-Basen (Loeb, 2001). Um diese Schäden wieder zu beheben, existieren zelluläre DNA-Reparaturmechanismen mit über 100 verschiedenen Reparaturgenen. Die daraus gebildeten Reparaturproteine haben die Aufgabe, die Integrität der DNA zu erhalten (Wood, 2001). Es existieren verschiedene Wege der DNA-Reparatur, wie beispielsweise die direkte Reparatur (Schadensreversion), die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die Mismatch-Reparatur (MMR) und die Reparatur von Strangbrüchen in der DNA.

Die **Reversion** eines DNA-Schadens ist relativ selten. Beispielsweise werden alkylierte Basen oder Pyrimidindimere durch spezielle Enzyme direkt repariert. Diese sind zum Beispiel die humane O<sup>6</sup>-Alkylguaninalkyltransferase (Pegg, 2000), die DNA-dioxygenase ABH2 (Sedgwick, 2004) und die in Hefen, Pflanzen und manchen Bakterien vorkommende Photolyase (Sancar, 2000).

Die enzymatische Exzision (Ausschneiden) einer veränderten Base aus einem DNA-Einzelstrang mit folgender Auffüllung der entstandenen Lücke und anschließender Wiederherstellung der intakten DNA ist die häufigste Art der DNA-Reparatur. Sie kann auf dem Weg der Basenexzision oder Nukleotidexzision erfolgen.

Bei der **Basenexzisionsreparatur** (BER) bindet eine DNA-Glykosylase, welche eine hohe Spezifität zu einer speziellen Basenmodifikation besitzt, an das betreffende Nukleotid und hydrolysiert die N-glykosidische Bindung zwischen Base und Zucker. Das Resultat ist eine AP-Stelle. Durch eine AP-Endonuklease wird diese Läsion in einen Strangbruch überführt und der Zucker mittels einer Exonuklease entfernt. Eine DNA-Polymerase und DNA-Ligase füllen die entstandene Lücke und schließen den Strangbruch. Die meisten Reparaturenendonukleasen besitzen sowohl eine Glykosylase- als auch eine AP-Endonuklease-Funktion (Wallace, 1988). Innerhalb der BER unterscheidet man die *short-patch*-Reparatur, bei der nur ein Nukleotid ersetzt wird von der *long-patch*-Reparatur, bei der mehrere Nukleotide entfernt werden.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Reparaturenendonukleasen sind in **3.2.6.1, Tab. 4.1** zusammengestellt. Bei dem Enzym *Fpg* (*Formamidopyrimidinglykosylase*) handelt es sich um das aus *E.coli* isolierte funktionelle Homolog des humanen Enzyms hOGG1 (Boiteux, et al., 1990). Es ist ein globuläres Monomer aus 269 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 30,2 kD. Das C-terminale Ende des *Fpg* Proteins enthält ein Zink-Finger-Motiv, welches für die DNA-Bindung und Enzymaktivität des Proteins essentiell ist (O'Connor et al., 1993). Das Enzym erkennt Guanin- und Adenin-Derivate mit geöffnetem Imidazolring (Formamidopyrimidine, FAPY-Guanin/Adenin), AP-Stellen und 8-Hydroxyguanin in der *anti*-

Konfiguration (Boiteux et al., 1992). Es schneidet 8-oxoG aus 8-oxoG:C Paaren aus, jedoch nicht aus 8-oxoG:A Paaren. Die Paarung entsteht durch Falscheinbau von Adenin gegenüber 8-oxoG während der DNA-Replikation (Michaels et al., 1992). Neben der Glykosylase-Aktivität besitzt das Fpg-Enzym eine AP-Lyase-Funktion und kann somit die DNA an basenfreien Stellen einschneiden. Die Trennung der Phosphodiesterbindung wird 3' und 5' von der AP-Läsion katalysiert, so dass die basenfreie Stelle freigesetzt und ein Einzelstrangbruch mit 3'-Hydroxylrest und 5'-Phosphatrest vorliegt (Bailly et al., 1989).

Das Enzym *Endonuklease III* (Nth Protein) ist ein eisenhaltiges, monomeres Enzym aus *E. coli* mit einer Molekülmasse von 23,4 kDa (Asahara et al., 1989). Es erkennt Pyrimidin-Oxidationsprodukte, die als ringgesättigte, ringkontrahierte oder ringfragmentierte Pyrimidine ohne planare Struktur zusammengefasst werden können (z. B. Alloxan, Harnstoff, Dihydrothymidin u.a.) (Boiteux, 1993). Das Enzym besitzt DNA-Glykosylase- und AP-Lyase-Aktivität (Demple and Linn, 1980). Das entsprechende Enzym beim Menschen ist das hNTH-Protein.

Bei der *Endonuklease IV* handelt es sich um ein aus *E. coli* isoliertes monomeres Enzym mit einer Molekülmasse von 30 kDa. Das Protein ist eine AP-Endonuklease mit 3'-Phosphatase und 3'-Phosphoglykolaldehyd-Diesterase Aktivität (Levin et al., 1988).

Die Endonuklease V stammt aus dem Bakteriophagen T4 und hat eine Molekülmasse von 16 kD. Sie besitzt Glykosylase- und AP-Lyase-Funktion, die voneinander unabhängig sind (Nakabeppu et al., 1982) und erkennt neben AP-Läsionen durch UV induzierte cis-syn-Cyclobutanpyrimidindimere. Das Enzym spaltet dabei die glykosidische Bindung eines der beiden Pyrimidinreste des Photoproduktes und trennt anschließend die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden. Somit entstehen 3'-Hydroxyl- und 5'-Hydroxyl-Enden auf der 3'-Seite der AP-Läsion (Nakabeppu et al., 1982).

Die **Nukleotidexzisionsreparatur** (NER) ist verantwortlich für das Entfernen von „bulky“-DNA-Läsionen, wie beispielsweise Benzo(a)pyrendiolepid-Addukte oder Pyrimidindimere (de Laat et al., 1999). Die NER, welche in nicht-aktiven Bereichen des Genoms tätig ist, wird auch *global genomic repair* (GGR) genannt, während die NER in den aktiven (transkribierten) Bereichen der DNA als transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) stattfindet (Cline and Hanawalt, 2003). Der Mechanismus der NER ist sehr komplex, da sehr viele verschiedene Enzyme zusammen wirken (XPC-HR23B-Komplex, XPA, RPA, TFIIH-Komplex, XPF, XPG u.a.). Die Enzymgruppe erkennt und entfernt ein Oligonukleotid aus einem DNA-Strang. Das Schließen der Lücke übernehmen DNA-Polymerase und Ligase, welche die Stelle auffüllen und die intakte DNA wiederherstellen. Ein Ausfall der NER konnte als Ursache von Krankheiten wie Xeroderma Pigmentosum oder Cockayne Syndrom festgestellt werden. In beiden Fällen sind die Betroffenen extrem lichtempfindlich und besitzen im Falle von Xeroderma Pigmentosum ein erhöhtes Hautkrebsrisiko. Bakterien erkennen und entfernen „bulky“-DNA-Läsionen mit Hilfe des UvrABC-Komplexes.

Die **Mismatch-Reparatur** erkennt Fehlpaarungen und korrigiert diese. Die Enzymkomplexe MutS $\alpha$  oder MutS $\beta$  erkennen zum Beispiel 8-oxoG, verschiedene Deletionen oder so genannte Loops (Schlaufen). Letztere können durch Fehler beim Ablesen von repetitiven Sequenzen der DNA entstehen. Während der MutS $\alpha$  vorwiegend für die Erkennung von kleinen Loops verantwortlich ist, bindet MutS $\beta$  nur an größere Schleifen (Cline and Hanawalt, 2003). Die Reparatur dieser Schäden setzt eine Fähigkeit zur klaren Unterscheidung der beiden DNA-Stränge voraus.

Die **Reparatur von Einzelstrangbrüchen** (single-strand-breaks, SSB) erfolgt im Gegensatz zu Doppelstrangbrüchen relativ schnell, was sie gering toxisch für die Zelle macht (Caldecott, 2001). Die Reparatur von indirekt entstandenen SSB ist Bestandteil der BER (s.o.). Direkt in die DNA eingefügte SSB können über zwei Wege behoben werden, die long-patch- oder short-patch-Reparatur. In beiden Fällen fungiert das PARP-Protein (*poly-ADP-ribose-polymerase*) als Sensor und bindet an den Einzelstrangbruch. Dies ist die Initialisierung weiterer Reparaturschritte durch Rekrutierung verschiedener Enzyme (XRCC1, Ape1, Hap1, Pol $\beta$  u.a.). Die DNA wird mittels einer Ligase wieder verschlossen.

## 2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Art (Schadensspektrum) und der Mechanismus der DNA-Schädigung durch Photosensibilisatoren in Kombination mit Sonnenlicht (Solarsimulator) in Zellen und zellfrei näher untersucht werden und die Daten mit den Ergebnissen der Genotoxizitätstests (Mikrokerntest und Comet Assay) korreliert werden. Im Vordergrund stand dabei die Frage, welche Art des zellulären DNA-Schadens für die spätere Entstehung von Mikrokernen verantwortlich ist. Aus den Testsubstanzen der Ringstudie (siehe **1.3.3**) wurden dazu 6 Stoffe ausgewählt: Chlorpromazin, Promazin, Lomefloxacin, Ciprofloxacin, Doxycyclin und Methylblau (siehe auch **Tab. 4.2**). Die durch diese Substanzen verursachten DNA-Schäden sollten zellulär in V79-Zellen und zellfrei an PM2-DNA charakterisiert werden. Neben dem Ausmaß an Einzelstrangbrüchen in der DNA sollte mittels verschiedener Reparaturenzyme (**Tab. 4.1**) die Zahl der verschiedenen AP-Läsionen und unterschiedlichen Basenmodifikationen durch die betreffende Substanz bestimmt werden. Diese Untersuchungen sollten außer mechanistischen Aufschlüssen auch Informationen über die Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Schädigung liefern. Ferner sollten die Stoffe auf Induktion thermolabiler Läsionen in der DNA getestet werden, welches einen Rückschluss auf Alkylierungen der DNA durch den Sensibilisator während der Schädigung zulässt. Der Vergleich von Photosensibilisatoren einer gleichen chemischen Substanzklasse sollte Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen photogenotoxischem Potential und Molekülstruktur geben. Der Schädigungsmechanismus durch die Testsubstanzen sollte mit Hilfe von bestimmten modulierenden Zusätzen während der DNA-Schädigung weiter aufgeklärt werden. Die Gegenüberstellung der ermittelten DNA-Schäden in Zellen und unter zellfreien Bedingungen sollte den Einfluss der DNA-Umgebung auf den Schädigungsmechanismus aufdecken. Schließlich sollten die Daten verwendet werden, um weitere Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen Phototoxizität und Photogenotoxizität zu erhalten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG245, max. 210 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Autoklav	Tecnoclav 50 6.0, bzw. 2.0 (Fedegari Autoklav, SPA, Albuzzo, Italien)
Brutschrank Zellkultur	CO <sub>2</sub> -Inkubator BB16, BB6060 O <sub>2</sub> und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter Counter	Beckmann Coulter Z2 (Beckmann, München)
Destillationsapparatur	Destamat <sup>®</sup> (Heraeus, Hanau)
DNA-Gel-Auswertung	Molecular Analyst <sup>®</sup> (V 2.1, 1995, BioRad, Hercules, CA, USA)
DNA-Gel-Vermessung	BioRad Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
Fluoreszenz-Mikroskop	Eclipse E400, Nikon, Düsseldorf
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden) und MM10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Fluorimeter	Kontron Instruments
Gefrierschrank (-20 °C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70 °C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Elektrophoresekammer für DNA-Agarosegele	Mechanikwerkstatt, Institut für Toxikologie, Universität Würzburg
Elektrophoresekammer für Comet-Assay	Mechanikwerkstatt, Institut für Toxikologie, Universität Würzburg
Halogenlampe, 1000 W	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Heißluftsterilisator	WTC Binder, Tuttlingen
Kantenfilter	Schott Spezialglas GmbH, Mainz

Kryobehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Kühlschränke	KG 3666-32 (Liebherr)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke&Kunkel GmbH & Co KG, Staufen im Breisgau)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
Peristaltik-Pumpe	ISM 759, 20 Kanäle, mit Schläuchen (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Pipetman P20, P100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku® (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Radiometer	Kompakt – Radiometer RM-12 (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen)
Schüttelbäder	heizbar bis 100°C (Köttermann GmbH & Co., Uetze-Hänigsen)
Solarsimulator	Suntest CPS + (Atlas, Linsengericht / Altenhasslau)
Spannungsgerät	Power PAC-3000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
Spectralphotometer	Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Sensoren	UVA-Sensor, UVB-Sensor (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen)
UV/VIS Photometer	Ultraspec II, LKB-Biochrom (Biochrom, Cambridge, England)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, INC, Bohemia, NY, USA)
Waage	PB 3002, Delta Range, max. 3100 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100°C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)

Wasserbad	Haake Fisons W19 mit Thermostat Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Neubauer Kammer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugen	Hettich Universal/K2S, Hettich Micro Rapid (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Deckgläser (Grosse)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
DC-Platten (Kieselgel)	VWR international, Darmstadt
Einmalspritzen (Plastik)	2 ml PRIMO (Codan Medical ApS, Roedby, Dänemark), 5 ml/10 ml Quadroject Plus (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Filter (Alkalische Elution)	Isopore™, Polycarbonat-Membran, 2 µm, Ø 25 mm (Millipore, Irland)
Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Glaspipetten (Zellkultur)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Kanülen, steril	21G x 1½, Nr. 2 (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Kryo-Röhrchen, steril	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kultur-Röhrchen, steril	PP (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Multipettenaufsätze	Combitips 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Objektträger	geschnitten, mit Mattrand (Knittel Gläser)
Objektträger Superfrost	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Flint Glass (Chase Instruments Corp., Glen Falls, NY, USA)
Pipettenspitzen (Einweg)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (Einweg)	5 ml, 10 ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Plastik-Reaktionsgefäße	500 µl, 1500 µl, 2000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)

Quadripermschalen	quadriPERM (In Vitro Systems Services GmbH, Göttingen)
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Syringe, Luerlock (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
6-well-Platten	Greiner GmbH, Nürtingen
Zellschaber	Greiner GmbH, Nürtingen
Zellkulturflaschen, steril	Greiner GmbH, Nürtingen
Zellkulturschaber, steril	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugenröhrchen, Glas	Corex-Röhrchen, 15 ml/50 ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Zentrifugenröhrchen, Plastik	15 ml, 50 ml (Greiner GmbH, Nürtingen)

### **3.1.3 Chemikalien und Reagenzien**

Agarose (Typ I, low EEO)	Sigma Aldrich, Steinheim
LM-Agarose	Biozym, Oldendorf
Aktivkohle	VWR international, Darmstadt
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ciprofloxacin	Sigma Aldrich, Steinheim
Chlorpromazin	Sigma Aldrich, Steinheim
Chlorpromazinsulfoxid	zur Verfügung gestellt von Aventis Pharma Process Development Chemistry, Romainville, Frankreich
Cyclohexan	VWR international, Darmstadt
Deuteriumoxid	Sigma Aldrich, Steinheim
Dextranblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Diethylamin	VWR international, Darmstadt
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
Doxycyclin	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA (Tetramethylethyldiamin)	VWR international, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidumbromid	Roth, Karlsruhe
Eukitt	Fluka/Riedel de Häen
Formaldehydlösung (37 %)	VWR international, Darmstadt
Giemsa-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim



---

2-Hydroxypromazin	zur Verfügung gestellt von Aventis Pharma Process Development Chemistry, Romainville, Frankreich
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kälberserum, fetales	PAA, Cölbe
Kalibrierlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR international, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	VWR international, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin	Sigma Aldrich, Steinheim
Lomefloxacin	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	VWR international, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Mannit	Sigma Aldrich, Steinheim
May-Grünwald-Lösung	VWR international, Darmstadt
Earle's MEM Medium	PAA, Cölbe
Earle's MEM Medium ohne Phenolrot	PAA, Cölbe
Methylenblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	VWR international, Darmstadt
Natriumazid	VWR international, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR international, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natrium-EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	VWR international, Darmstadt
Osmiumsäurelösung 2 %	VWR international, Darmstadt
Promazin	Sigma Aldrich, Steinheim
Propidiumjodid	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25 %, 37 %	VWR international, Darmstadt
Schwefelsäure 96 %	VWR international, Darmstadt
Sephadex G50	Sigma Aldrich, Steinheim
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	VWR international, Darmstadt
TRIS-Base (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>tert</i> -Butanol	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim

Trypsin /EDTA-Lösung (Viralex)	PAA, Cölbe
Weise-Puffer	VWR international, Darmstadt
Xylol	VWR international, Darmstadt

### **3.1.4 Enzyme**

Endonuklease IV	Von J. Levin und B. Demple, Harvard University Cambridge, USA
Endonuklease III	Zur Verfügung gestellt von S. Boiteux, Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich
Fpg	(Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase), Rohextrakt hergestellt nach Boiteux et al. (Boiteux, 1990), von M. Pflaum bzw. M. Osterod (Mainz)
T4-Endonuklease V ( <i>E. coli</i> )	Präparation nach Nakabeppu et al. (Nakabeppu, 1982), modifiziert durch Pflaum (Pflaum, 1996), hergestellt durch M. Pflaum bzw. C. Flohr und I. Schulz (Mainz)
Katalase (40 422 U/mg) aus Rinderleber	Serva, Heidelberg
Superoxiddismutase aus Rinder-Erythrocyten	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium albidum</i> (Roth, Karlsruhe)

### **3.1.5 DNA**

PM2 DNA	DNA des Bakteriophagen PM2, Präparation nach Salditt et al. (Salditt et al., 1972) durch I. Schulz, Mainz
---------	---

### 3.1.6 Zellen

V 79-Zellen	Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters Zur Verfügung gestellt von Bayer, Wuppertal (Ringstudie)
-------------	--

### 3.1.7 Puffer, Lösungen, Medien

#### 3.1.7.1 Zellkultur

PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
PBS/CMF (autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Kulturmedium für V79-Zellen	MEM Earle's-Medium 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % FCS
Bestrahlungsmedium für V79-Zellen	MEM Medium ohne Phenolrot 2 % FCS

#### 3.1.7.2 Comet-Assay

Agarose-Lösung 1 % (Vor Gebrauch aufgekocht)	1g Agarose ad 0,1 L PBS/CMF
Low Melting Agarose-Lösung 0,7 % (Vor Gebrauch aufgekocht)	0,7 g LM-Agarose ad 0,1 L PBS/CMF

Lyse-Stammlösung pH 10 (eingestellt mit NaOH)	146 g NaCl 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA 1,2 g Tris-Base 10 g N-Laurylsarcosin- Na ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Lyselösung (frisch angesetzt)	178 ml Lyse-Stammlösung pH 10 20 ml DMSO 2 ml Triton X 100
Elektrophoresepuffer	12,0 g NaOH 0,37 g Na <sub>2</sub> EDTA ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Neutralisationspuffer pH 7,5 (eingestellt mit HCl)	48,5 g Tris-Base ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Propidiumjodid-Stammlösung	25 mg Propidiumjodid ad 0,1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Propidiumjodidlösung 0,005 % (frisch angesetzt)	500 µL Propidiumjodid-Stammlösung In 24,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

### 3.1.7.3 Mikrokerntest

Natriumcitratlösung 1,5 %

Fixativ	75 ml Essigsäure 75 ml Ethanol 1,25 ml Formaldehydlösung (37 %)
Giemsa-Lösung (frisch angesetzt)	2,6 ml Giemsa ad 100 ml Weise Puffer (pH 7,2)

### 3.1.7.4 Alkalische Elution

PBS/CMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ad 1 lL H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
PBS/CMF (autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
BE1-Puffer pH 7,5 (autoklaviert)	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
BE1/BSA-Puffer pH 7,5 (frisch angesetzt)	26 ml BE1-Puffer 13 mg Rinderserumalbumin (BSA)
BE15-Puffer/KCl pH 7,5 (autoklaviert)	20 mM Tris-HCl 75 mM KCl 15 mM Na <sub>2</sub> EDTA
BE15/BSA-Puffer pH 7,5 (frisch angesetzt)	20 ml BE15/BSA-Puffer 10 mg Rinderserumalbumin (BSA)
Lysepuffer (pH 10)	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS
Lysepuffer/Proteinase K (frisch angesetzt)	100 ml Lysepuffer 40 mg Proteinase K
Waschpuffer pH 10,0 (autoklaviert)	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA
Elutionspuffer pH 12,15 (pH-Einstellung mit TEAH)	20 mM EDTA
Bisbenzimid (Hoechst No. 33258) -Stammlösung	0,15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (Aliquots bei -20 °C)

Phosphatpuffer pH 6 (autoklaviert)	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer pH 7,2 (autoklaviert)	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer (pH 7,2)/Bisbenzimid (frisch und lichtgeschützt angesetzt)	1 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung in Phosphatpuffer (pH 7,2)

### 3.1.7.5 DNA-Relaxationsassay

BE1-Puffer pH 7,5 (autoklaviert)	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na <sub>2</sub> EDTA
BE1(15)/BSA- Puffer pH 7,5 (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1(15) mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,1 g/l BSA (BSA-Zusatz nach dem Autoklavieren)
Phosphatpuffer pH 7,4 (autoklaviert)	5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM NaCl
Phosphatpuffer in D <sub>2</sub> O pD 7,4 (=pH 7.0) (autoklaviert)	5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM Na Cl
Stoppuffer pH 7,8	40 mM Tris-HCl 5 mM Na-Acetat 21 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 70 % Glycerin 4 % SDS
TAE-Puffer pH 7,8 (Kammerpuffer)	400 mM Tris-HCl (10fach) 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA (pH Einstellung mit 2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )

---

Fällungslösung	125 mM Na-Acetat in Ethanol <sub>abs</sub>
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 g Ethidiumbromid ad 1 L H <sub>2</sub> O dest.

### 3.1.7.6 Modifikation von PM2-DNA mit Osmiumtetroxidlösung

BE1-Puffer pH 7,5 (autoklaviert)	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na <sub>2</sub> EDTA
Dextranblaulösung (q.s.)	
Tris-Puffer pH 7,5 (autoklaviert)	10 mM Tris-HCl
OS1-Puffer pH 12,3 (sterilfiltriert)	0,3 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
OS2-Puffer pH 4,0 (autoklaviert)	1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 M NaCl-Lösung (autoklaviert)	
Mannitlösung 2 %	
1 mM Osmiumtetroxidlösung	

### 3.1.7.7 Dünnschichtchromatographie

Fliessmittel (lt. EUAB für Chlorpromazin)	10 VT Aceton 10 VT Diethylamin 80 VT Cyclohexan
--	---

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Allgemeine Zellpflege**

Für alle zellulären Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden V79-Zellen verwendet. Die Pflege der Zellen erfolgt ausschließlich unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Box. Auf Grund einer Verdopplungszeit von 10-14 Stunden dieser adhärenenten Zellen, ist es notwendig, jeden zweiten bis dritten Tag eine Reduktion der Zelldichte vorzunehmen. Dies geschieht durch das sogenannte Passagieren der Zellen. Hierfür wird das auf den Zellen befindliche und gebrauchte Medium abpipetiert und verworfen. Vorhandene Restmengen dieses Mediums werden durch einmaliges Spülen der Zellen mit 10 ml PBS/CMF entfernt. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche geschieht durch Inkubation mit 1 ml Trypsin./EDTA-Lösung für ca. 15 Sekunden. Da die Zellen relativ stark an der Wand haften, werden sie nach der Inkubation mit Trypsin für ca. 5 min im Brutschrank leicht erwärmt (37 °C ,5 % CO<sub>2</sub>, 99 % Luftfeuchtigkeit). Dadurch lösen sich die kovalenten Bindungen zwischen Zelle und Wand der Flasche leichter. Durch geringes Abklopfen erreicht man ein nahezu vollständiges Ablösen, welches unter dem Lichtmikroskop visuell überprüft wird. Es wird resuspendiert, indem nach Zugabe von 5-10 ml frischem Medium, die Zellsuspension mittels einer 5 ml Glaspipette mehrmals auf- und abpipetiert wird. Dieser Schritt ist wichtig, da so die stark aneinander haftenden V79-Zellen gründlich vereinzelt werden. Das im Medium enthaltene FCS inaktiviert das Trypsin. Die Zellen werden nun mittels Coulter Counter gezählt. Hierzu werden 0,2 ml der Zellsuspension in ein Zählgefäß mit 9,8 ml Isoton II gegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wird die gewünschte Menge der Zellsuspension entnommen, in eine Zellkulturflasche gegeben und eine ausreichenden Menge frisches Medium zugegeben. Die Zellen wachsen nun bei einer Temperatur von 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, 99 % Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank.

Die Zellen wurden bis zur Passage 25 für die Versuche verwendet. Zellen mit einer Passagenzahl von 12 oder 13 wurden in Stickstoff eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

#### **3.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Um Zellen einzufrieren benötigt man spezielle Kryoröhrchen. Diese ermöglichen es, die Zellen sicher und über mehrere Jahre in Stickstoff zu lagern.

Zuvor werden die abgelösten und resuspendierten Zellen in ein Greinerröhrchen gegeben und bei 4 °C, 1000 U/min 10 min zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abdekantiert und die am Boden des Greinerröhrchens befindlichen Zellen in einer Mischung aus Medium



mit 10 % DMSO resuspendiert. Ein Volumen von 1-1,5 ml (max. 1-2 Mio. Zellen) dieser Suspension wird nun in vorgekühlte Kryoröhrchen gefüllt und dicht verschlossen. Die Behältnisse werden nun für 2 h bei -20 °C gefroren. Anschließend werden die Zellen über Nacht bei -70 °C gelagert und schließlich in einen Stickstofftank gelegt. Dort ist eine Lagerung über mehrere Jahre möglich.

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryoröhrchen mit der Hand leicht erwärmt und der Inhalt in ein Greinerröhrchen überführt. Dieses enthält 10 ml frisches Medium. Um das DMSO aus der Mischung zu entfernen, wird das Ganze bei 20 °C, 1000 U/min 10 min zentrifugiert. Die Resuspension der Zellen erfolgt nach Abdekantieren des Überstandes und Zugabe von frischem Kulturmedium. Schließlich werden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gelegt. Nach 24 h erfolgt ein Mediumwechsel.

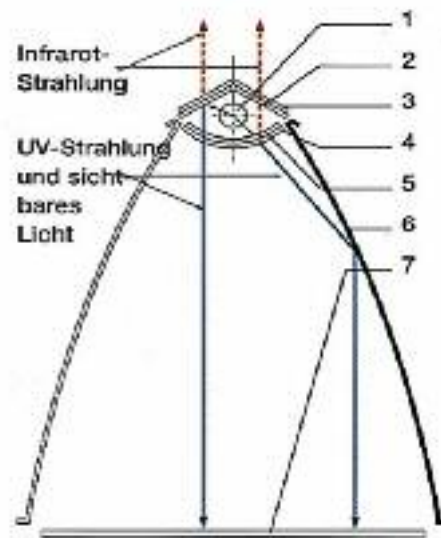
Nach zweimaligem Passagieren, also nach frühestens 4 Tagen, werden die Zellen speziell für Versuchszwecke in Zellkulturflaschen ausgesät.

### **3.2.2 Bestrahlung mit dem Solarsimulator**

Die Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht erfolgte in allen Versuchen mit dem CPS+-Suntest-Gerät der Firma ATLAS, auch Solarsimulator genannt. Es handelt sich hierbei um eine dicht verschließbare Apparatur mit einem im Gerät befindlichen waagrechten Probenisch. Der Abstand zur darüber befindlichen Lampe beträgt 23 cm. Das Gerät kann nach Verschließen der Tür und Einrasten des Sicherheitsschlusses eingeschaltet werden. Im Verschluss der Gerätetür befindet sich eine Sicherung, die beim Öffnen im angeschalteten Zustand die Bestrahlung automatisch unterbricht. Ist die Bestrahlungsdauer erreicht, wird die Lampe manuell ausgeschaltet und die Proben entnommen.

#### **3.2.2.1 Gerätaufbau**

Als Lichtquelle im Gerät dient eine Xenonlampe (**Abb. 3.1**). Die Simulation von Sonnenlicht im Freien wird durch Einsatz eines UV-Spezialglases (UV-Kante 290 nm) erreicht. So werden kurzwellige UVC-Strahlen gefiltert. Wird das Gerät angeschaltet, so findet eine Lampenzündung in Form eines Initialblitzes statt, der innerhalb von Sekunden automatisch herunterreguliert wird (siehe **4.2**). Die Bestrahlung im Solarsimulator erfolgt immer bei Raumtemperatur. Zur Vermeidung der Erwärmung während der Bestrahlung, ist eine automatische Kühlung vorhanden. Zur Messung der Temperatur im Probenraum befindet sich ein Sensor auf der Probenebene.



**Abb. 3.1** Schematische Darstellung des Solarsimulator-Innenraums (Seitenansicht)

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| 1 Xenonlampe   | 5 Zusatzfilter aus UV-Spezialglas |
| 2 UV-Spiegel   | 6 Parabolreflektor                |
| 3 Licht-Spiegel  | 7 Probenebene                     |
| 4 Quarzglasschale mit selektiv reflektierender Schicht |                                   |

### 3.2.2.2 Bestrahlungsbedingungen

Vor jedem Versuch wird die Bestrahlungsstärke der Lampe mittels Radiometer für UVA und UVB-Strahlung bestimmt. Hierzu wird das betreffende Messgerät auf die Probenebene gelegt und die Probenbestrahlung simuliert. Ein Regulieren der UVA bzw. UVB-Stärke erfolgt hier durch Aufsetzen entsprechender Anzahl an Zellschalen-Deckel.

		UVA	UVB
		(mJ/cm <sup>2</sup> )	
<b>Comet Assay</b>	1 Deckel der 6-Well-Platte	600	30
<b>Mikrokerntest</b>	2 Deckel der Quadripermschale	600	17
<b>Alkalische Elution</b>	2 Deckel der Quadripermschale	600	17
<b>DNA-Relaxationsassay</b>	2 Deckel der Quadripermschale	1200	34

Der Messwert der Radiometeranzeige wird nach Herunterregulieren des Initialblitzes abgelesen ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) und die Bestrahlungsdauer mit Hilfe von **Gleichung 3.1** berechnet.

$$\begin{array}{l} \text{Messwert der Bestrahlungsstärke UVA oder UVB } (\text{mW}/\text{cm}^2) \times \text{Bestrahlungszeit (s)} = \\ \text{Bestrahlungsdosis } (\text{mJ}/\text{cm}^2) \end{array} \quad \text{(GI 3.1)}$$

Die Angabe der Bestrahlungsdosis in allen Versuchen berücksichtigt nicht die Intensität des Initialblitzes. Dieser ist jedoch unvermeidlich und in allen Versuchen gleichermaßen vorhanden.

Alle Bestrahlungen mit dem Solarsimulator wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.2.3 Abwiegen der Substanzen**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen wurden bei Rotlicht abgewogen und in DMSO, Phosphatpuffer oder Medium ohne Phenolrot (Behandlungsmedium) gelöst. Das Verdünnen der Stammlösungen und die Zugabe der Lösungen zu Zellen bzw. DNA erfolgte ebenfalls unter Rotlicht bzw. unter lichtarmen Verhältnissen.

Durch diese Vorgehensweise kann man den Zerfall bzw. die Aktivierung der Photosensibilisatoren vor der eigentlichen Bestrahlung vermeiden.

### **3.2.4 Comet Assay**

#### **3.2.4.1 Prinzip**

Der Comet Assay (auch *single cell gel electrophoresis* = SCGE) dient zur quantitativen Messung von DNA-Strangbrüchen in Säugerzellen. Die zu untersuchenden Zellen werden hierzu in eine dünne Schicht Agarosegel eingebettet, welche sich auf einem Objektträger befindet. Die Zellen werden lysiert und die im Gel verbleibende DNA wird nach der Denaturierung elektrophoretisch aufgetrennt. Sind durch die Schädigung kurze DNA-Stücke vorhanden, so wandern diese schneller im Gel, als längere ungeschädigte DNA. Nach Anfärben der Präparate mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und Betrachten unter einem Fluoreszenz-Mikroskop sind diese DNA-Wanderungen einer jeden Zelle in Form eines Kometen sichtbar. Die Auswertung solcher Kometen erfolgt nun durch Messen der Kometenschweiflänge oder der Fluoreszenz-Intensität des Schweifes. So kann eine Aussage über das Ausmaß des Schadens getroffen werden.

Die alkalische Version des Assays (Singh, 1988) detektiert Einzelstrangbrüche und alkali-labile Stellen. Diese DNA-Schäden werden durch die Mehrheit der gentoxischen Substanzen erzeugt.

### **3.2.4.2 Vorbereitung**

Am Vortag des Versuches wird die benötigte Anzahl an V79-Zellen ausgesät. Hierzu werden 6-Well-Platten benötigt. Dies sind Plastikschaalen mit 6 runden Mulden (Wells) für 6 getrennte Ansätze. Eine genaue Anzahl ( $0,8 \times 10^6$ ) an Zellen wird in Medium in je eine Mulde der Platte gegeben und bis zum nächsten Tag in den Brutschrank gelegt.

Objektträger für die späteren Zellpräparate werden mit einer dünnen Gelschicht versehen, indem sie kurz in eine warme 1 %-ige Agaroselösung getaucht werden. Diese werden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Die beschichteten Objektträger lassen sich bis zu einer Woche aufbewahren.

### **3.2.4.3 Schädigung der Zellen**

Am Versuchstag werden die 6-Well-Platten mit den darin befindlichen adhärennten Zellen dem Brutschrank entnommen und das Medium abpipettiert. Die Zellen werden mit PBS/CMF gewaschen und mit 2 ml Medium ohne Phenolrot (Behandlungsmedium) versetzt. Es erfolgt die Zugabe der Testsubstanz in Form einer Lösung. Das Volumen der zugegebenen Lösung beträgt immer 220  $\mu$ l. Anschließend werden die Platten für 20 min in den Brutschrank gelegt. Nach dieser Vorinkubationszeit wird mit dem Solarsimulator die Bestrahlung durchgeführt (**3.2.2.2**). Das vorgeschriebene UVA/UVB-Verhältnis wird durch Auflegen des Deckels der 6-well-Platte erreicht. Die Bestrahlungszeit beträgt je nach Stärke der Lampe ca. 11 min. Zur 10-minütigen Nachinkubation befinden sich die bestrahlten Zellen wieder im Brutschrank. Nach dieser Zeit wird das Behandlungsmedium entnommen, die Zellen 1x mit PBS/CMF gewaschen und mit 100  $\mu$ l Trypsin für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aktivität des Trypsins wird durch Zugabe von 1 ml Medium abgestoppt. Zum vollständigen Ablösen der Zellen wird ein Zellschaber eingesetzt, dessen Gebrauch sehr vorsichtig erfolgen sollte, so dass eine Zerstörung der Zellen vermieden wird. Unter Aufwendung von wenig Druck auf den Schaber werden so die Zellen von dem Well-Boden abgeschabt. Die Zellen werden schließlich in 2 ml Medium suspendiert. Diese Zellsuspension kann nun für den Toxizitätstest (**3.2.4.4**) oder für die Elektrophorese (**3.2.4.5**) verwendet werden.

### 3.2.4.4 Toxizitätstest

Zur Prüfung auf Toxizität der Behandlung wird die unterschiedliche Färbung von lebendem und totem Zellmaterial mit Trypanblau ausgenutzt. Hierzu werden die ca. 2 ml Zellsuspension aus dem Well in ein Greinerröhrchen überführt und die Mulde mit 2 ml PBS/CMF ausgespült. Die Spüllösung wird ebenfalls in das Röhrchen gegeben und die Mischung gut resuspendiert. Es werden 30 µl entnommen und mit 30 µl Trypanblaulösung gemischt. Nach einer Wartezeit von 3 min werden die unterschiedlich gefärbten Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Bei farblos bis leicht hellblau gefärbten Zellen handelt es sich um vitale, bei den dunkelblau gefärbten um abgestorbene Zellen. Die Anzahl letaler Zellen wird in Bezug zur Gesamtzellzahl gesetzt und man erhält so eine Aussage über die Toxizität der Schädigung.

### 3.2.4.5 Elektrophorese

Aus der vorbereiteten Zellsuspension (**3.2.4.2**) werden 15 µl entnommen und mit 135 µl 0,7%iger **Low-Melting-Agarose (LMA)**-Lösung gemischt. Durch vorsichtiges auf und abpipettieren der Zellsuspension werden die Zellen gründlich vereinzelt. Nun werden 75 µl dieser Mischung auf die vorbereiteten Objektträger (**3.2.4.2**) gegeben. Ein großes Deckglas wird darüber gelegt und sorgt so für ein Spreiten der Zell-LMA-Mischung auf den agarosebeschichteten Objektträgern. Die so entstandenen Präparate werden für 10 min in den Kühlschrank gelegt, um ein Aushärten der LMA-Schicht zu erreichen. Danach kann das Deckglas vorsichtig abgezogen werden. Die eingebetteten Zellen werden nun in Küvetten mit einer frisch zubereiteten, kalten (4°C) Lyselösung lysiert (1h). Für die Elektrophorese wird eine horizontale Elektrophoresekammer verwendet, welche sich in einer Wanne mit Eis befindet. Der Innenraum der Kammer wird mit 4°C kaltem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die lysierten Präparate werden der Küvette entnommen und kurz in den Elektrophoresepuffer getaucht. Die Objektträger werden nun nebeneinander, horizontal in der Kammer angeordnet. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wird die Elektrophorese gestartet. Sie läuft bei 18 V und 300 mA für 60 min.

Nach der Elektrophorese werden die Präparate auf ein Tablett gelegt und mit einem Neutralisationspuffer gespült. Die Färbung der DNA erfolgt durch Zugabe von 50 µl Propidiumjodidlösung pro Objektträger. Die Agaroseschicht wird mit einem Deckglas abgedeckt und die Proben sind bereit für die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### 3.2.4.6 Auswertung der Kometen

Der durch die Schädigung entstandene Komet gliedert sich in den sogenannten „Kopf“ und „Schweif“ (**Abb. 3.2**). Ein Komet, bei dem diese Unterteilung wegen zu hoher Schädigung nicht mehr möglich ist, wird nicht gewertet.

Die Auswertung der Kometen kann durch Messen folgender Parameter erfolgen:

Schweiflänge (tail length = TL)

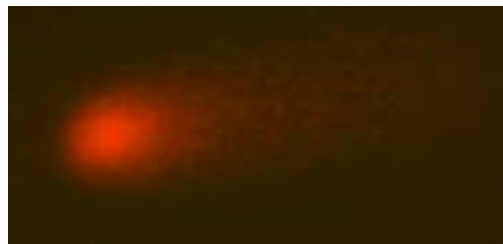
Schweifintensität (tail intensity = TI)

oder dem Produkt aus TL und TI = tail moment (TM)

Die Schweiflänge kann manuell mit einem geeigneten, skalierten Messokular ausgemessen werden. Möglich ist auch das Einteilen der Kometen in vier verschiedene Schadensklassen. Die Auswertung und das Bestimmen der TL wird jedoch durch die Verwendung eines geeigneten Computer-Auswerteprogramms erleichtert. Das Auswählen der Kometen erfolgt jedoch auch hier manuell.

Die Auswertung unserer Comet Assay Präparate wurde von der Firma Novartis in Basel übernommen. Das Vermessen der Kometen erfolgte dort durch einen Roboter. Dabei wird automatisch eine Anzahl an Kometen anhand der genannten Parameter ausgewertet. Eine manuelle Auswahl ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Gemessen wurden 50 Kometen pro Präparat.

Zu beachten ist, dass im Comet Assay der DNA-Schaden jeder einzelnen Zelle bestimmt wird. Der Mittelwert der durchgeführten Einzelauswertungen wird als Endwert verwendet.



**Abb. 3.2** Geschädigte Zelle nach Durchführung des Comet Assays

Die Durchführung des Comet-Assays erfolgte streng nach den Vorgaben einer SOP (*standard operation procedure*), verfasst durch Koordinatoren der Ringstudie (für den Comet Assay: Bayer, Wuppertal) (siehe **1.3.3**).

### **3.2.5 Mikrokerntest**

#### **3.2.5.1 Prinzip**

Mit dieser Methode werden die Folgen einer DNA-Schädigung in Form von Mikrokernen nachgewiesen. Es handelt sich dabei um Einschlüsse von chromosomalen Fragmenten oder vollständigen Chromosomen, die von einer Kernmembran umgeben sind. Sie können durch die Absonderung chromosomaler Fragmente nach der Bildung von Chromosomenbrüchen, sowie durch Chromosomenfehlverteilungen während der Mitose entstehen. Das genomische Material in den Mikrokernen ist aktiv, aber es ist nicht geklärt, ob die enthaltene Geninformation der Zelle zur Verfügung steht.

Mikrokerne kommen in jeder Zellart in geringer Menge natürlicherweise vor. Wird die Anzahl dieser Kerne durch eine Schädigung der Zelle deutlich erhöht, so lässt dies auf eine klastogenen (Chromosomenbruch hervorrufende) oder aneugen (Verlust vollständiger Chromosomen) Effekt der Schädigung schließen. Die Zahl der Mikrokerne innerhalb einer definierten Menge an Zellen dient als Marker für das Ausmaß der Schädigung. Für die Entstehung von Mikrokernen ist eine Teilung der Zelle erforderlich, was in der Praxis eine bestimmte Wartezeit nach der Schädigung erfordert.

#### **3.2.5.2 Vorbereitung**

Zu Beginn des Versuchstages werden sterile Objektträger in die Fächer von Quadripermschalen gelegt. Diese Schalen besitzen Fächer für vier getrennte Ansätze. Die Fächer werden mit je 5 ml Medium gefüllt und je  $1,5 \times 10^5$  V79-Zellen zugegeben, die nun in 6 Stunden im Brutschrank auf den Objektträgern festwachsen. Danach wird das Medium abpipettiert und die Zellen 2x mit je 5 ml PBS/CMF gewaschen.

#### **3.2.5.3 Schädigung der Zellen**

In jedes Fach der Schale werden 5 ml Behandlungsmedium pipettiert. Die schädigende Substanz wird in Form einer Lösung zugegeben. Wird die Substanz in DMSO gelöst, so darf dessen Endkonzentration an den Zellen 1 % nicht überschreiten. Es folgt eine Vorinkubationszeit von 30 min im Brutschrank. Anschließend werden die Zellen mit dem Solarsimulator bei Raumtemperatur bestrahlt (**3.2.2.2**). Das vorgeschriebene UVA/UVB-Verhältnis wird durch Auflegen von zwei Deckeln der Quadripermschale erreicht. Die Bestrahlungszeit beträgt je nach Stärke der Lampe ca. 11 min. Anschließend wird sofort das Behandlungsmedium verworfen und die Präparate mit 2x 5 ml PBS/CMF gewaschen. Es werden je 5 ml Medium in die Fächer gegeben und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.5.4 Fixierung der Zellen

Nach der Wartezeit wird das Medium abpipetiert und die Zellen mit 2x 5 ml PBS/CMF gewaschen. Es werden 3 ml einer 37°C warmen Natriumcitrat-Lösung auf die Zellen gegeben und einige Tropfen einer eiskalten Fixativ-Lösung. Durch die osmotische Wirkung der Natriumcitratlösung quellen die Zellen etwas auf und werden durch das Fixativ in diesem Zustand festgehalten. Das Aufquellen erleichtert später die Färbung und Auswertung der Proben. Dieser Schritt wird wiederholt. Die endgültige Fixierung der Zellen erfolgt durch Zugabe von 1x3 ml Fixativ, nachfolgendem umschwenken und absaugen, Zugabe von 1x2 ml Fixativ, erneutem umschwenken und absaugen. Die einzelnen Objektträger werden der Schale entnommen und 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss getrocknet.

### 3.2.5.5 Färbung der Zellen

Die trockenen Präparate werden für 3 min in eine Küvette mit May-Grünwald-Lösung (Inhaltsstoffe: Eosin, Methylenblau, Methanol) gestellt. Es folgt ein Auswaschen der überschüssigen Färbelösung durch 3x waschen mit Weisepuffer. Die Objektträger werden dann 20 min in Giemsa-Lösung (Inhaltsstoffe: Azur-A/B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat, Methylenblauchlorid, Methanol, Glycerin) gestellt, danach erfolgt ebenfalls ein Auswaschen in Weisepuffer. Durch die Färbeschritte werden Cytoplasma und Zellkern unterschiedlich gefärbt.

Die Präparate werden getrocknet und können nun mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet werden.

### 3.2.5.6 Auszählen der Mikrokerne und Bestimmung der Toxizität

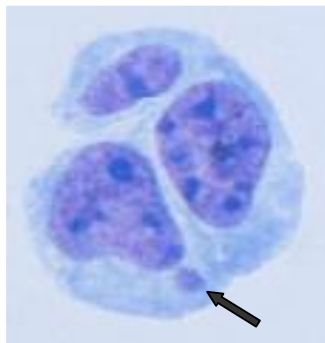
Auf Grund der unterschiedlichen Färbung sind nun Cytoplasma (hellblau) und Kernsubstanz (violett) unter dem Mikroskop differenzierbar (**Abb. 3.3**). Die Erkennung des Cytoplasmas ist zur Zählung der Zellen für die Bestimmung der Toxizität notwendig. Die Anordnung von 1000 Zellen in so genannten „Zellpacks“ wird bestimmt. Ein Zellpack geht aus einer einzelnen Zelle durch Teilung(en) hervor. Die Größe der Zellkolonie nimmt mit sinkender Toxizität der Schädigung zu, da in diesem Fall die Zelle zu mehreren Teilungen in der Lage ist. Gezählt werden einzelne Zellen (c1), 2er Packs (c2), 3-4 er Packs (c4) und 5-8er packs (c8). Eine Zellgruppe mit 8 Zellen entstand aus einer Zelle und nachfolgend 3 Zellteilungen. Visuell ist so eine Vorabanschätzung des Ausmaßes der Toxizität der betreffenden Schädigung möglich.



Aus der Anzahl der verschiedenen Zellpacks kann der Proliferationsindex (PI) errechnet werden:

$$PI = \frac{(c1 \times 1) + (c2 \times 2) + (c4 \times 3) + (c8 \times 4)}{n(\text{Gesamtkolonieanzahl})} \quad \text{GI 3.2}$$

Diese Zahl ist ein Maß das Teilungsverhalten der geschädigten Zellen. Gleichzeitig wird die Anzahl an Mikrokernen pro 1000 Zellen bestimmt. Ein Mikrokern wird nur dann als solcher gewertet, wenn dieser sich in Kernnähe befindet und die gleiche violette Färbung vorweist wie der eigentliche Zellkern. Die Größe der Einschlußverbindung darf ein Drittel der Zellkerngröße nicht überschreiten. Da Mikrokern während der Zellteilung entstehen, werden diese in einzelnen Zellen nicht in die Zählung aufgenommen.



**Abb. 3.3** Geschädigte Zellen: pack bestehend aus drei Zellen, eine davon mit Mikrokern.

Die Durchführung des Mikrokerntests erfolgte streng nach den Vorgaben einer SOP (*standard operation procedure*), verfasst durch Koordinatoren der Ringstudie (für den Mikrokerntest: BfArM, Bonn) (siehe **1.3.3**).

### **3.2.6 Alkalische Elution**

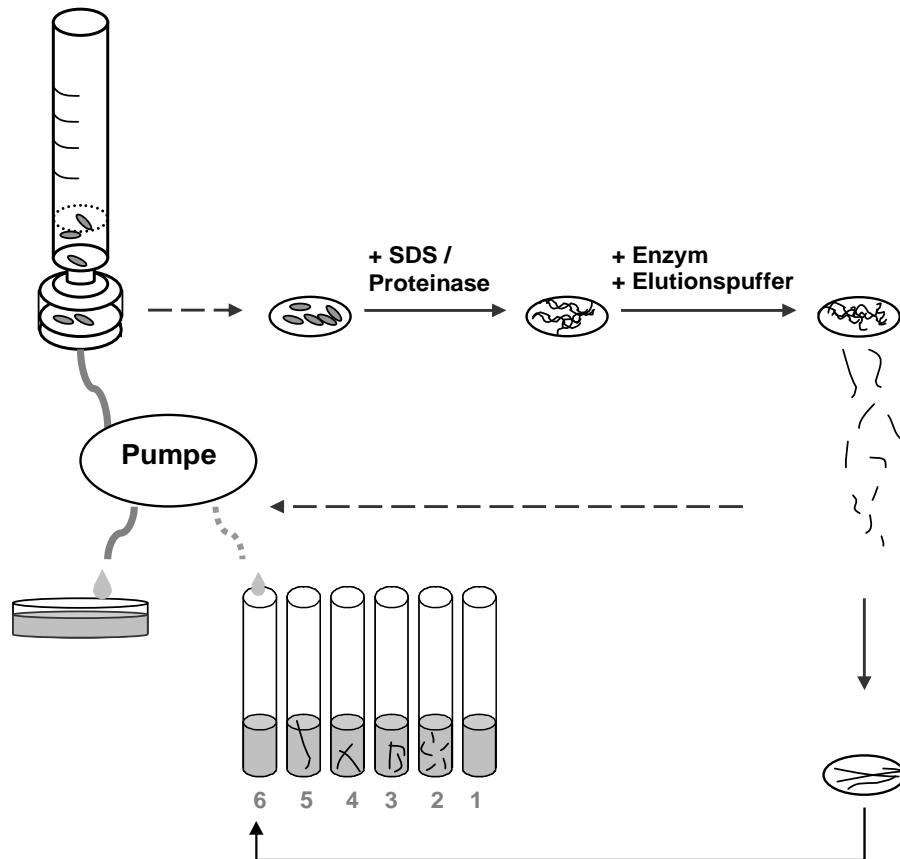
#### **3.2.6.1 Prinzip**

Die Methode erlaubt eine Quantifizierung und Charakterisierung von DNA-Schäden in Zellen. Es ist möglich Einzelstrangbrüche, sowie verschiedene Basenmodifikationen zu detektieren. Das Messen von veränderten Basen in der DNA gelingt mit Hilfe verschiedener Reparaturenzyme.

Nach Freilegen der Zell-DNA durch Zugabe von Lysepuffer, wird diese mit einem Reparaturenzym inkubiert. Dieses erkennt spezifische Basenmodifikationen oder abasische Stellen, sogenannte AP-Läsionen. Handelt es sich um eine modifizierte Base, so wird diese zunächst entfernt und es entsteht eine AP-Läsion. Das Zucker-Phosphat-Gerüst wird anschließend an dieser Stelle eingeschnitten woraus kürzere DNA-Fragmente resultieren. Die durch ein Enzym detektierten Schäden treten dann als zusätzliche Strangbrüche in Erscheinung. Durch die Elution mit einem alkalischen Puffer, erhält man einzelsträngige DNA, die über einen Filter der Größe nach aufgetrennt und fraktioniert gesammelt wird. Je kürzer die DNA-Fragmente (hohe Schädigung), umso früher passieren diese den Filter. Ungeschädigte DNA verbleibt wegen der Größe auf dem Filter und wird nach der Elution im Eluat der letzten Fraktion gelöst. Die Fraktionen werden neutralisiert und man erhält die doppelsträngige Form der DNA zurück. In diese kann nun ein Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimid) interkalieren. Die Menge der DNA in jeder Fraktion kann mittels Fluorimeter bestimmt werden. Die Fluoreszenzstärke der Proben ist direkt proportional zur DNA-Menge.

Die von Kohn et al. (Kohn, 1976) entwickelte Methode der Alkalischen Elution besitzt eine Empfindlichkeit von 1 Läsion/ $10^7$  bp. Die Pumpgeschwindigkeit während der Elution lässt sich variieren, es besteht die Möglichkeit eine langsame oder schnelle Version durchzuführen. Letztere bietet sich an, wenn die obere Nachweisgrenze der langsamen Elution erreicht ist (ca. 0,8 Läsionen/ $10^6$  bp). Der Messbereich der schnellen Elution ist größer, die Empfindlichkeit wegen der höheren Pumpgeschwindigkeit geringer.

### 3.2.6.2 Versuchsaufbau



**Abb. 3.4** Prinzip und Aufbau der Alkalischen Elution

Ein Polycarbonatfilter der Porengröße 2  $\mu\text{m}$  wird auf einen Frittenboden in eine Halterung eingelegt und über einen Schraubverschluss mit einer Einmalspritze verbunden. Das Ganze (= 1 Spur) wird in senkrechter Position an einem Ständer befestigt. Die Filterhalterung befindet sich in einem Wasserbad, welches eine Temperatur von 4°C hat. Schläuche verbinden jede Spritze (Spur) mit einer Peristaltik-Mehrkanalpumpe, die in der Spritze befindliche Flüssigkeiten durch den Filter in ein Auffanggefäß pumpt. Pro Elutionsapparat stehen ca. 16-20 solcher Spuren zur Verfügung. In die Spritze werden 1 Mio Zellen in Form einer Zellsuspension eingefüllt. Durch sofortiges Ansaugen der Zellsuspension mit Hilfe der Pumpe, gelangen die Zellen zügig auf den Filter und werden 2x mit eiskaltem PBS/CMF gewaschen. Nach Erhöhen der Wasserbadtemperatur auf 25°C beginnt das Lysieren der Zellen. Dazu werden 5 ml eines SDS haltigen Lysepuffers mit Proteinase K versetzt und die Mischung in die Spritze gefüllt. Die Lyselösung wird nun über einen Zeitraum von 90 min konstant durch das System gepumpt. Proteinase K verhindert ein Anhaften von Proteinen an der DNA. Nach der Zell-Lyse wird 7x mit je 5 ml BE1-Puffer gespült, um alle Lysepufferreste

zu entfernen. Währenddessen wird die Temperatur des Wasserbades auf 37°C erhöht, welche die Aktivitätstemperatur der hier verwendeten Enzyme ist. Die Stammlösung des Enzyms wird in BSA (bovines Serumalbumin)-haltigem BE1-Puffer verdünnt (**Tab. 3.1**). Das BSA verhindert das Anhaften des Enzyms an der Wand der Spritze und gewährleistet so, dass das gesamte Enzym aktiv zur Verfügung steht.

Die Enzyminkubation läuft nun 50 min lang. Dabei wird die Enzymlösung konstant durch das System gepumpt. Anschließend wird die DNA 2x mit BE1 gespült, das Wasserbad auf eine Temperatur von 25 °C abgekühlt und die eigentliche Elution durch Zugabe von 4 ml alkalischem Waschpuffer vorbereitet. Nachdem dieser durchgepumpt wurde, werden alle Spritzen randvoll mit Elutionspuffer gefüllt. Das Auffanggefäß wird durch Ständer mit Reagenzgläsern ersetzt und die Elution wird gestartet. Diese läuft nun mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h über 12 h (langsame Elution). Alle zwei Stunden findet ein Fraktionswechsel statt, so dass man sechs Fraktionen erhält.

**Tab. 3.1** Arbeitspuffer und Konzentrationen der in der Alkalischen Elution verwendeten Reparaturenendonukleasen

Enzym	Puffer	Anwendungskonzentration
Fpg-Rohextrakt	BE1 mit 0,5 mg/ml BSA	1 µg/ml
Endonuklease III	BE1 mit 0,5 mg/ml BSA	30 ng/ml
Endonuklease IV	BE1 mit 0,5 mg/ml BSA	30 ng/ml
T4 Endonuklease V	BE15/KCl mit 0,5 mg/ml BSA	100 ng/ml

### 3.2.6.3 Schädigung der Zellen

Die V79-Zellen werden abgelöst, gezählt und in Quadripermschalen gegeben. In jedem Fach befinden sich genau 5 ml Behandlungsmedium (ohne Phenolrot) und 5 Mio Zellen. Die zu untersuchende Substanz wird bei Rotlicht abgewogen und entweder in Medium ohne Phenolrot oder in DMSO gelöst. Die verschiedenen Konzentrationen werden in einer Verdünnungsreihe hergestellt. Die Zugabe der Lösung zu den Zellen erfolgt kurz vor der Bestrahlung. Handelt es sich um eine Lösung in DMSO, so darf der Zusatz zu der Zellsuspension 50µl nicht überschreiten.

#### 3.2.6.3.1 Bestrahlung mit dem Solarsimulator

Die Bestrahlung der Zellen im Solarsimulator erfolgt wie unter **3.2.2.2** beschrieben. Danach werden die Zellen mit der Pipette aus der Quadripermschale in ein, auf Eis befindliches, Greinerröhrchen überführt. Zellreste werden durch Spülen der Fächer mit 2x je 1 ml kaltem Behandlungsmedium eingesammelt. Die Zellen werden mit der Pipette gut vereinzelt und in die Spritzen der Alkalischen Elution gegeben (**3.2.6.2**).

### 3.2.6.3.2 Bestrahlung mit der Halogenlampe

Zur Bestrahlung mit sichtbarem Licht werden die Zellen in der Quadripermschale auf Eis platziert. Der Abstand der Zellen zur Lampe beträgt 33 cm. Auf der Schale befindet sich während der Bestrahlung ein Deckel. Zwischen den Proben und der Halogenlampe wird ein Kantenfilter befestigt, der lediglich für Strahlung über 400 nm durchlässig ist. Die Bestrahlungszeit beträgt 30 min, die Bestrahlungsstärke 675 kJ/m<sup>2</sup>. Danach wird wie in (3.2.6.3.1) beschrieben verfahren.

### 3.2.6.4 Auswertung der Alkalischen Elution

Der Rest an Elutionspuffer (3.2.6.2), der nach der Elution in den Spritzen verbleibt, wird komplett in das Reagenzglas der sechsten Fraktion gepumpt. Die Filter werden aus den Filterhalterungen genommen und mit dem Frittenboden in je ein Plastikdöschen gelegt. Das Volumen der sechsten Fraktion wird gemessen und diese zu den Filtern gegeben. Die Döschen werden verschlossen. Bei einer Temperatur von 60°C wird die auf den Filtern verbleibende, ungeschädigte DNA in der Flüssigkeit der sechsten Fraktion innerhalb zwei Stunden unter Schütteln gelöst. Das Volumen einer einzelnen Fraktion (Fraktionsvolumen) wird gemessen. Es sollte zwischen 3,5 ml und 4,5 ml liegen.

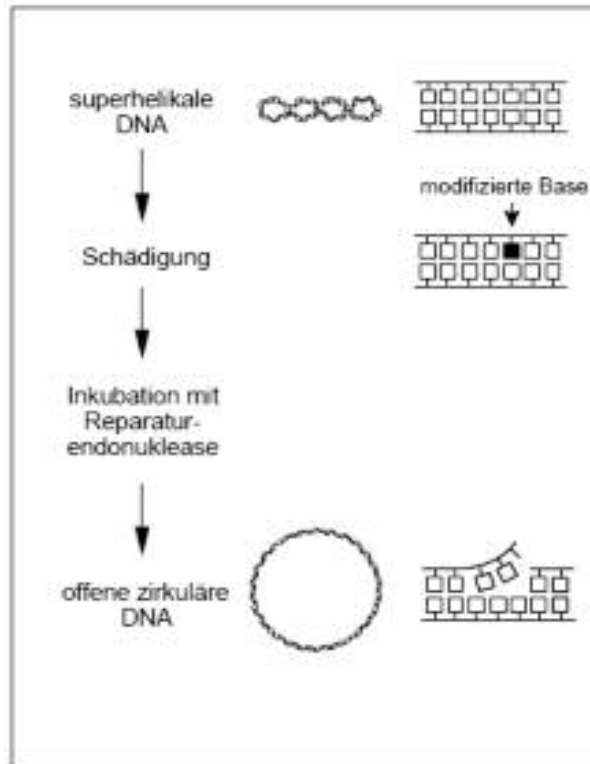
Alle Fraktionen werden mit einem Phosphatpuffer (pH 6,0) neutralisiert. Bisbenzimid wird in einem neutralen Phosphatpuffer (pH 7,2) verdünnt und zugegeben. Es ist wichtig bei diesen Schritten auf eine gute Durchmischung der Flüssigkeiten zu achten. Die Proben können nach einer Inkubation von 15 min im Dunkeln schließlich mittels eines Fluorimeters ausgewertet werden. Der Bisbenzimid–DNA-Komplex wird bei 360 nm angeregt und die Emission bei 450 nm gemessen. Als interne Korrektur der Messung wird die Emission einer Blindlösung verwendet. Diese besteht aus dem Fraktionsvolumen an Elutionspuffer, der gleichen Menge an Phosphatpuffer pH 6,0 und verdünnter Bisbenzimidlösung.

Die Ergebnisse der Messwerte der alkalischen Elution werden in eine vorgefertigte Excel-Maske übertragen. Die Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaaren werden so per Computer berechnet. Dabei wird als Berechnungsgrundlage eine mit  $\gamma$ -Strahlung geschädigte Probe zugrunde gelegt (6 Gy erzeugen einen Einzelstrangbruch/10<sup>6</sup> bp) (Kohn, 1976). Um die Anzahl an Läsionen zu erhalten, die von einem Enzym erkannt wurden, ist es notwendig von diesen Werten die Menge an Einzelstrangbrüchen abzuziehen.

### 3.2.7 PM2-DNA-Relaxationsassay

#### 3.2.7.1 Prinzip

Mit dieser Methode ist es möglich, Schäden in zellfreier DNA nachzuweisen. Hierzu macht man sich zu Nutze, dass das Plasmid des Bakteriophagen PM2 im ungeschädigten Zustand in einer superhelikalen Form vorliegt (**Abb. 3.5**). Wird diese Form durch einen Einzelstrangbruch zerstört, so liegt das Plasmid offen zirkulär vor. Wenn ein Doppelstrangbruch entsteht, so nimmt das Plasmid eine lineare Form an. Durch Einsatz von verschiedenen Reparaturenzymen kommt es zu einer Erhöhung der Strangbruchrate (siehe **3.2.6.1**). Das Gemisch kann schließlich durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Plasmidformen mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Superhelikale DNA wandert wegen der kompakteren Form schneller im Gel, als offen zirkuläre.



**Abb. 3.5** Prinzip des PM2-DNA-Relaxationsassays (nach M. Pflaum)

### 3.2.7.2 Schädigung der DNA

Zu Beginn des Versuches werden die zu untersuchenden Substanzen abgewogen und die benötigten Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe hergestellt. In Eppendorfgefäße wird Phosphatpuffer (pH 7,4) vorgelegt und mit der jeweiligen Substanzlösung und DNA (0,6 µg in 20 µl Phosphatpuffer) vermischt. Das Volumen dieses Gemisches beträgt immer 100 µl. Dieses wird nun auf den Boden einer Quadripermschale pipettiert. Auf die Schale werden zwei Deckel gelegt und es erfolgt die Bestrahlung mit dem Solarsimulator (3.2.2.2). Die Proben werden anschließend mit der Pipette entnommen und in die jeweiligen Eppendorfgefäße zurück überführt. Es werden 250 µl eiskalte Fällungslösung zupipettiert und die DNA auf Eis mindestens 30 min gefällt. Die Gefäße werden 30 min lang zentrifugiert (12 000 rpm). Der Überstand wird verworfen und die DNA durch Zugabe von 50 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Abzentrifugieren der Waschlösung wird das DNA-Pellet in BE1-Puffer gelöst und in zwei neue Eppendorf-Caps verteilt. Ein Wert dient der Bestimmung der Einzelstrangbrüche und der andere zur Prüfung auf DNA-Basenmodifikationen mittels Enzyme, die in einer BSA-haltigen BE1-Lösung verdünnt und zugesetzt werden (Enzymkonzentrationen entsprechend Alkalischer Elution, siehe 3.1.7.4.). Die Enzyminkubation dauert 30 min und findet hier bei 37°C im Wasserbad statt. Beendet wird die Enzymreaktion durch Zugabe von Stopppuffer.

### 3.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Herstellung des Agarosegels erfolgt durch Lösen von 0,8 g Agarose in einem Gemisch aus 90 ml destilliertem Wasser und 10 ml TAE-Puffer (10x), unter der Verwendung einer Mikrowelle. Aus dieser Lösung wird das Gel gegossen, welches nach dem Erkalten mit TAE-Puffer (1x) überschichtet wird.

Die einzelnen Proben haben ein Volumen von 40 µl und werden mit der Pipette in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Die Elektrophorese läuft 90 min bei 80 V. Anschließend wird das Gel in einer Kammer mit Ethidiumbromidlösung (0,005%ig) mindestens zwei Stunden lang gefärbt.

### 3.2.7.4 Auswertung des Agarose Gels

Das gefärbte Gel wird mit einer UV-Lampe (312 nm) mittels CCD-Kamera digital fotografiert und mit Hilfe einer Software (Molecular Analyst®) ausgewertet. Man bestimmt hierbei die Relation der Fluoreszenzintensitäten von ungeschädigter, superhelikaler Plasmid-DNA zu geschädigter, offen zirkulärer Form. Die Anzahl der Strangbrüche wird mittels einer Gleichung berechnet.

$$ssb_{gesamt} = -\ln \frac{1,42 \times S}{1,42 \times S + R} \quad \text{GI 3.3}$$

$SSB_{gesamt}$	=	Gesamtanzahl an Einzelstrangbrüchen pro DNA-Molekül
1,42	=	Korrekturfaktor wegen der geringen Interkalation des Farbstoffs in die superhelikale DNA
S	=	Fluoreszenzintensität der superhelikalen DNA-Form
R	=	Fluoreszenzintensität der offen zirkulären DNA-Form

Die Gleichung berücksichtigt, dass es sich um eine zufällige Verteilung (Poisson-Verteilung) der Einzelstrangbrüche im Molekül handelt. Nur der erste Strangbruch im Plasmid verursacht die Konformationsänderung, weitere Brüche treten so nicht in Erscheinung. Außerdem ist zusätzlich ein Korrekturfaktor wegen geringer Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale DNA erforderlich (Lloyd et al., 1978).

Da durch die Enzyminkubation der DNA zusätzliche Einzelstrangbrüche detektiert werden, müssen zur Ermittlung der Schäden, die nur durch das Enzym erkannt wurden, die Einzelstrangbrüche (ohne Enzyminkubation) von den Gesamtwerten subtrahiert werden.

### **3.2.8 Modifikation von PM2-DNA mit Osmiumtetroxid**

Die Modifikation der DNA mit Osmiumtetroxid wurde durchgeführt, um die Aktivität der Endonuklease III zu testen (Demple and Linn, 1980). Osmiumtetroxid hat eine hohe Oxidationskraft und dient zur Herstellung von 5,6-Dihydroxythymidinen in der DNA. Diese gehören zum Erkennungsspektrum der Endonuklease III (siehe **Tab. 4.1**). So kann überprüft werden, ob das Enzym aktiv ist und für die folgenden Untersuchungen verwendet werden kann.

#### **3.2.8.1 Oxidation der DNA**

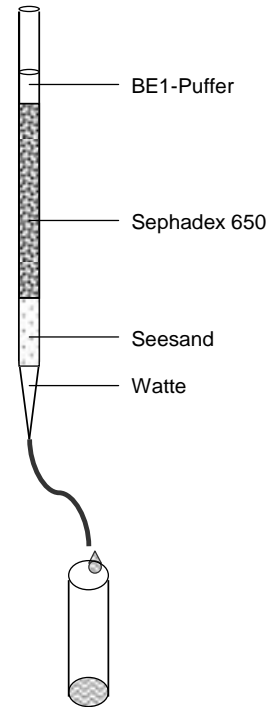
Für die Modifikation wird PM2-DNA verwendet. Davon werden 6 µg in 35 µl Tris-Puffer aufgenommen und mit 90 µl OS1-Puffer (pH 12,3) vermischt. Es werden 15 µl einer 1 mM Osmiumtetroxidlösung zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 35 µl OS2-Puffer (pH 4,0), 25 µl 5 N NaCl und 10 µl 2%ige Mannitlösung zugesetzt und gemischt.



### 3.2.8.2 Reinigung der modifizierten DNA

Eine Pasteurpipette mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm wird als Säule verwendet (**Abb. 3.6**). Diese wird am unteren Ende mit Watte und Seesand verschlossen. Sephadex G50 wird in BE1-Puffer aufgeschlämmt und mit einer 5 ml Einmalspritze aufgezogen. Mit einer langen Injektionsnadel wird die Suspension luftblasenfrei von oben in die Pipette gefüllt. Die Säulenfüllung sollte immer mit einer BE1-Pufferschicht bedeckt sein, um ein Austrocknen zu verhindern. An der zulaufenden unteren Öffnung der Pipette wird ein Schlauch befestigt, dessen Länge die gewünschte Tropfgeschwindigkeit bestimmt. Die austropfende Flüssigkeit wird in Fraktionen in Reagenzgläsern aufgefangen. Die Elutionszeit wird durch Verwendung einer Dextranblaulösung bestimmt. Es wird ein bekanntes Volumen auf die Säule gegeben und die Menge an vorlaufendem Puffer, sowie die Geschwindigkeit der Elution der Farbstofflösung bestimmt. Das Eluat sollte sich mindestens 10 min auf der Säule befinden, um eine optimale Reinigung zu erreichen.

Die Lösung der modifizierten DNA wird auf die Säule gegeben. Da sich in der ersten Fraktion (ca. 25 Tropfen) nur Puffer befindet, kann diese verworfen werden. Die gereinigte DNA ist in den folgenden Fraktionen enthalten, die am Ende vereinigt werden. Es wird weiter wie in **3.2.7.2** beschrieben verfahren.



**Abb. 3.6** Säule zur DNA-Reinigung

### 3.2.8.3 Prüfung auf Aktivität der Endonuklease III

Die modifizierte DNA wird mit dem Enzym Endonuclease III bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Konzentration des Enzyms richtet sich nach Erfahrungswerten von früher getesteten Enzymchargen und beträgt in diesen Versuchen 33 ng/ml. Die Enzymreaktion wird mit Stoppuffer beendet und die einzelnen Proben in die Taschen eines Agarosegels pipettiert. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel gefärbt und ausgewertet (**3.2.7.3**, **3.2.7.4**). Im Gegensatz zum mitlaufenden Vergleichswert bestehend aus unmodifizierter PM2-DNA, geschieht hier ein Einschneiden der superhelikalen, modifizierten Plasmide durch das Enzym. Das Enzym ist aktiv und kann zum Erkennen von 5,6-Dihydropyrimidinen eingesetzt werden.

## **3.2.9 Dünnschichtchromatographie**

### **3.2.9.1 Prinzip**

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC) werden Substanzgemische auf Grund der unterschiedlichen Lipophilie bzw. Hydrophilie der Einzelkomponenten aufgetrennt. Dies erfolgt auf einer DC-Platte, auf der die Mischung als Lösung aufgetragen wird. Ein Fließmittel, welches durch Kapillarkraft an der Platte hochsteigt, sorgt für die Auftrennung. Es kommt so zu einer Verteilung der zu chromatographierenden Substanz zwischen einer mobilen Phase und der aktiven Oberfläche der stationären Phase. Sofern die Einzelsubstanzen farbig sind, fluoreszieren oder eine Fluoreszenzlösung auf der Platte bewirken, kann man das Chromatogramm sichtbar machen und anhand von Vergleichen mit Reinsubstanzen eine qualitative Aussage über die Gemischzusammensetzung treffen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Färbung und Laufstrecke der Substanz.

### **3.2.9.2 Vorbereitung der Proben**

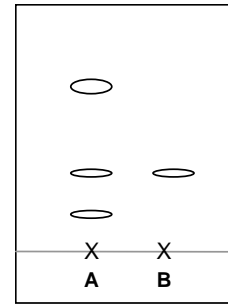
Bei der Untersuchung von Chlorpromazin und dessen Derivaten, wurden diese Substanzen in DMSO gelöst, in das Zell-Behandlungsmedium (Medium ohne Phenolrot) gegeben und unter den angegebenen Bestrahlungsbedingungen für die Alkalische Elution (**3.2.2.2**) bestrahlt. Die Lösung wurde danach komplett in ein Reagenzglas überführt und mit Diethylether überschichtet. Durch Schütteln kommt es zur Mischung der beiden Phasen. Diese Mischung wird nun stehen gelassen, bis eine Trennung der Phasen erfolgt ist. Chlorpromazin und deren Metabolite reichern sich hierbei in der Etherphase an. Dies ist die obere Phase, aus welcher nun mit Hilfe von dünnen Glaskapillaren ein bestimmtes oder unbestimmtes Volumen entnommen werden kann. Dieses wird nun auf die Platte aufgetragen und weiter wie in **3.2.9.3** beschrieben verfahren.

### **3.2.9.3 Durchführung der DC**

Die Zusammensetzung des Fließmittels wird der Literatur entnommen (z.B. aus dem europäischen Arzneibuch) oder ausgetestet. Es ist möglich verschiedene lipophile Lösungsmittel zu verwenden und die Anteile der Einzelkomponenten zu variieren. Bei diesen Versuchen wurden 10 VT Aceton, 10 VT Diethylamin und 80 VT Cyclohexan gemischt (lt. Ph.Eur. 2004, „Reinheitsprüfung für Chlorpromazin“). Auf eine mit Kieselgel beschichtete Kunststoffplatte werden die Untersuchungslösungen mit Hilfe von dünnen Glaskapillaren aufgetragen und die Platte anschließend in eine DC-Kammer mit darin befindlichem Fließmittel gestellt. Kurz bevor das, an der Platte aufsteigende, Fließmittel den oberen Plattenrand erreicht, wird die Platte entnommen und trocknen gelassen.

### 3.2.9.4 Auswertung der DC

Das Chromatogramm wird mit Hilfe des GelDoc®-Auswerteprogramms (siehe 3.2.7.4) vermessen. Wichtig sind die Intensitäten der jeweiligen Fluoreszenzlösungen auf der Platte, sowie das visuell erkennbare Laufverhalten der Komponenten. Die Einzelbestandteile (siehe **Abb. 3.7 A**) können an Hand von mitgelaufenen Vergleichslösungen (siehe **Abb. 3.7 B**) auf Grund der gleichen Laufstrecke identifiziert werden.



**Abb. 3.7** DC-Skizze

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Hintergrundspiegel der DNA-Modifikationen in V79-Zellen

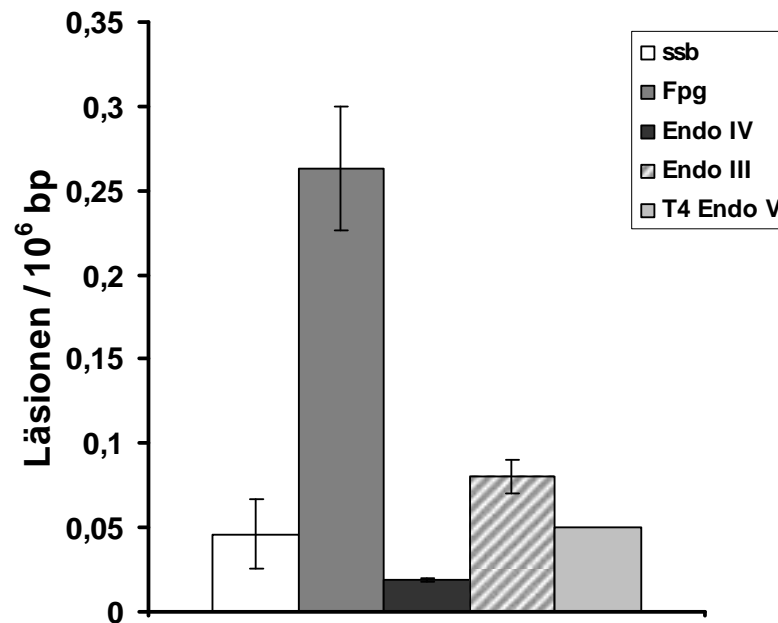
Zellen weisen auch ohne exogene Einflüsse eine bestimmte Menge an oxidativen DNA-Schäden auf (auch Hintergrundspiegel genannt), die auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies während den Stoffwechselprozessen in der Zelle zurückzuführen sind. Bevor die Auswirkungen einer exogenen Schädigung der zellulären DNA untersucht werden, ist es wichtig, Kenntnis über diesen Hintergrundspiegel an Schäden zu erlangen. Aus den Messergebnissen der Alkalischen Elution mit ungeschädigten V79-Zellen wurde ein so genanntes DNA-Schadensprofil erstellt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme zur Charakterisierung der DNA-Schäden sind in **Tab. 4.1** mit ihrem jeweiligen Erkennungsspektrum zusammengefasst.

**Tab. 4.1** Erkennungsspektrum von DNA-Glykosylasen

	<b>Fpg</b>	<b>Endo III</b>	<b>Endo IV</b>	<b>T4 Endo V</b>
<b>AP-Läsion</b>				
- regulär	+	+	+	+
- 1'oxidiert	-	-	+	-
- 4'oxidiert	+	+	+	+
<b>Basenmodifikation</b>				
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-
FaPy-Guanin	+	-	-	-
FaPy-Adenin	+	-	-	-
5,6-Dihydropyrimidin	-	+	-	-
<b>Pyrimidindimere</b>	-	-	-	+

Die Ergebnisse (**Abb. 4.1**) zeigen, dass in V79-Zellen vor allem Fpg-sensitive Läsionen zu finden sind, bei denen es sich vermutlich überwiegend um 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) handelt (siehe **Tab. 4.1**). Einzelstrangbrüche (SSB) liegen wie die T4-Endonuklease V (T4 Endo V)- und Endonuklease III (Endo III)-sensitive Läsionen in geringer Anzahl vor. Endonuklease IV (Endo IV) - sensitive Läsionen, also AP-Stellen, sind kaum vorhanden.



**Abb. 4.1** Hintergrundspiegel von DNA-Schäden in V79-Zellen. In unbehandelten Zellen wurden DNA-Einzelstrangbrüche (SSB) und Basenmodifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution gemessen. Die Anzahl der Versuche (n) beträgt bei SSB n=16, bei Fpg n=11, bei Endo III n=4 und bei Endo IV, sowie T4 Endo V n=2.

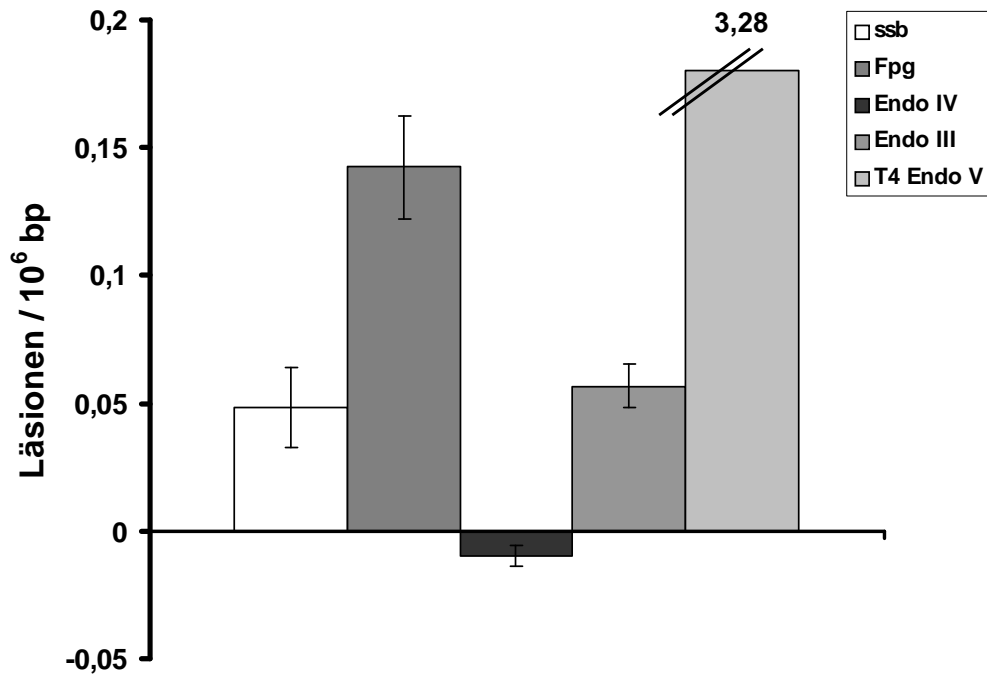
## **4.2 Induktion von DNA-Modifikationen in V79-Zellen durch Sonnenlicht**

Zur Untersuchung von DNA-Schäden durch exogene Photosensibilisatoren ist es ebenfalls wichtig zu bestimmen, welche Schäden durch die Bestrahlung allein (über endogene Photosensibilisatoren) erzeugt werden. Dazu wurden die Zellen mit künstlichem Sonnenlicht, erzeugt durch den Solarsimulator, bestrahlt. Die Bestrahlungsbedingungen entsprechen denen des Mikrokerntests (3.2.2.2).

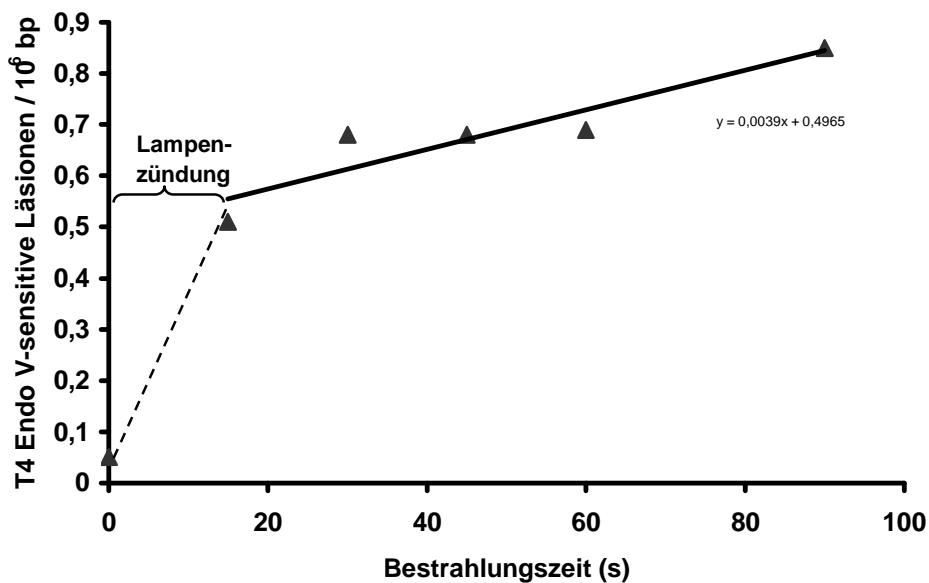
Die Messergebnisse sind in **Abb. 4.2** in einem zellulären Schadensprofil dargestellt, der Hintergrundspiegel an DNA-Schäden in den ungeschädigten Zellen wurde subtrahiert. Es entstehen vorrangig Fpg-sensitive Läsionen. Einzelstrangbrüche werden in geringer Menge erzeugt, gefolgt von Endo III-sensitiven Läsionen. AP-Läsionen, erkannt durch Endo IV, entstehen nicht.

Die Induktion von Pyrimidindimeren in zellulärer DNA durch Bestrahlung mit Sonnenlicht ist sehr hoch (**Abb. 4.3**). Aus diesem Grund werden die T4 Endo V-sensitiven Läsionen bei einer niedrigen Bestrahlungsdosis gemessen und für die Bestrahlungsbedingungen des Mikrokerntests ( $600 \text{ mJ/cm}^2$  UVA und  $17 \text{ mJ/cm}^2$  UVB) linear extrapoliert.

In **Abb. 4.3** ist die bestrahlungsdosisabhängige Induktion von Pyrimidindimeren durch den Solarsimulator gezeigt. Zu Beginn kommt es zur Auslösung eines Initialblitzes (=Lampenzündung). Dieser wird in den ersten Sekunden in der Stärke herunterreguliert. Eine Induktion von ca.  $0,5 \text{ Läsionen}/10^6 \text{ bp}$  ist nach ca. 20 s schon geschehen, größtenteils verursacht durch die Lampenzündung. Zeitabhängig kommt es nun zu einem linearen Anstieg der Menge an Pyrimidindimeren. Der Vergleich in **Abb. 4.2** zeigt, dass die Zahl der induzierten Pyrimidindimere mit  $3,3/10^6 \text{ bp}$  etwa 20-fach höher liegt als die Zahl der Fpg-sensitiven oxidativen Basenmodifikationen mit  $0,15/10^6 \text{ bp}$ .



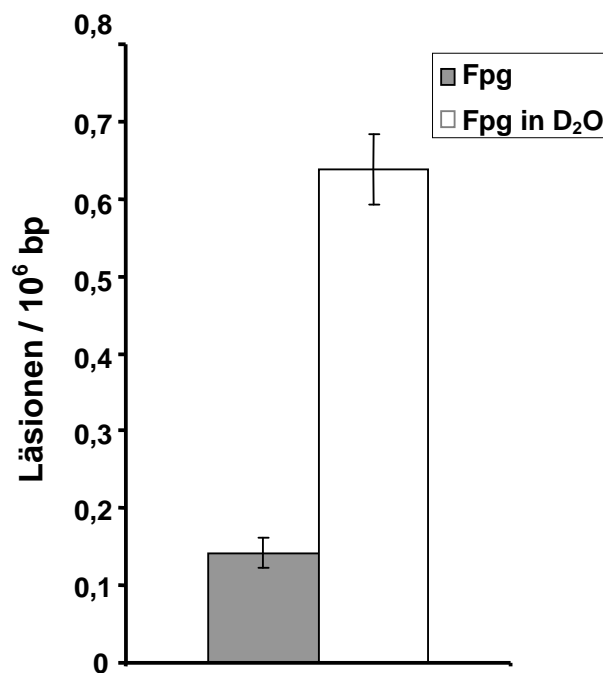
**Abb. 4.2** Induktion von DNA-Modifikationen in V79-Zellen durch Bestrahlung mit einem Solarsimulator. Es wurde nach Bedingungen, beschrieben in 3.2.2.2, bestrahlt ( $600 \text{ mJ/cm}^2$  UVA und  $17 \text{ mJ/cm}^2$  UVB), jedoch keine Testsubstanz zugegeben. Bei den T4 Endo V-sensitiven Läsionen wurde die Anzahl der Läsionen durch lineare Extrapolation für die Bestrahlungsdosis errechnet (Daten aus Abb. 4.3). Die Anzahl der Versuche (n) beträgt bei SSB  $n=40$ , bei Fpg  $n=26$ , bei Endo III  $n=3$  und bei Endo IV  $n=7$ .



**Abb. 4.3** Induktion von Pyrimidindimeren in V79-Zellen durch den Solarsimulator. Gemessen wurden T4 Endo V-sensitive Läsionen nach verschiedenen Bestrahlungszeiten mit Hilfe der Alkalischen Elution.

#### 4.2.1 Einfluss von $D_2O$ auf die oxidativen DNA-Modifikationen in V79-Zellen

Während der Bestrahlung befinden sich die Zellen in einem wässrigen Medium (siehe 3.2.6.3). Um die Rolle von Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) bei der Schadensentstehung durch die Sonnenlichtbestrahlung zu überprüfen, wurden die Zellen in  $D_2O$ -Puffer (pH 7,0 = pD 7,4) statt wässriger Lösung bestrahlt. In  $D_2O$  wird die Halbwertszeit von  $^1O_2$  erhöht. Oxidative Basenmodifikationen verursacht durch Singulett-Sauerstoff sollten in  $D_2O$  vermehrt auftreten. Wie in **Abb. 4.4** dargestellt, führt die Bestrahlung in  $D_2O$  zu einem deutlichen Anstieg der Fpg-sensitiven Läsionen, was die Beteiligung von  $^1O_2$  bei der Schädigung beweist.



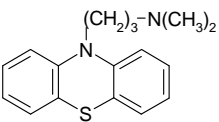
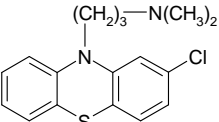
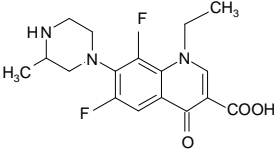
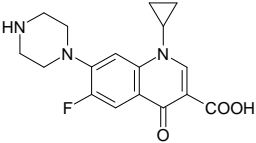
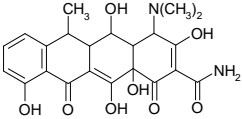
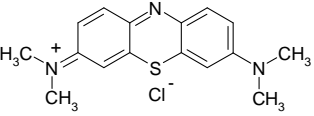
**Abb. 4.4** Induktion von oxidativen Basenmodifikationen in V79-Zellen durch den Solarsimulator. Dargestellt ist die Menge an Basenmodifikationen, erkannt durch Fpg bei Bestrahlung in  $H_2O$ -haltigem (grau) und  $D_2O$ -haltigem Puffer (weiß). Die Daten für Fpg sind aus **Abb. 4.2** entnommen, für Fpg in  $D_2O$  ist  $n=4$ .



### 4.3 Quantifizierung von DNA-Modifikationen verursacht durch Photosensibilisatoren in Zellen mittels alkalischer Elution und zellfrei im DNA-Relaxationsassay

Im Rahmen des Programms der Ringstudie wurden Substanzen ausgewählt, deren photogentoxisches Potential in Zellen und in zellfreier DNA näher untersucht werden sollte. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Ergebnisse zu den Substanzen vorgestellt.

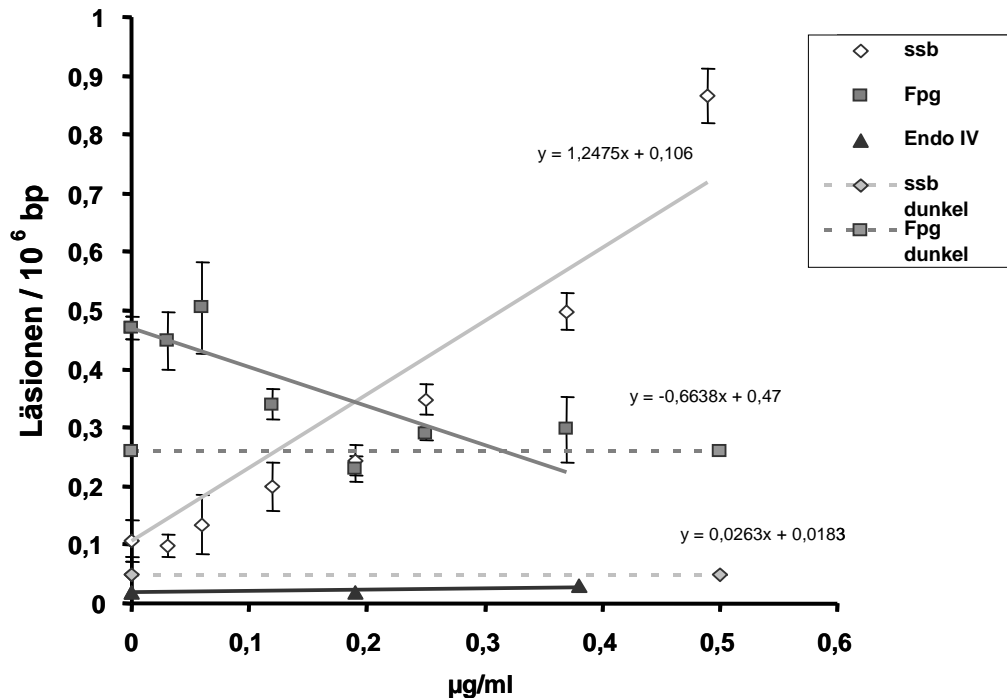
Tab. 4.2 Ausgewählte Testsubstanzen

<b>Promazin</b>	<b>PZ</b>		$\lambda_{\max} = 251 \text{ nm}; 302 \text{ nm}$
<b>Chlorpromazin</b>	<b>CPZ</b>		$\lambda_{\max} = 253 \text{ nm}; 307 \text{ nm}$
<b>Lomefloxacin</b>	<b>LOF</b>		$\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}; 320 \text{ nm}$
<b>Ciprofloxacin</b>	<b>CIF</b>		$\lambda_{\max} = 277 \text{ nm}; 328 \text{ nm}$
<b>Doxycyclin</b>	<b>DXC</b>		$\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}; 351 \text{ nm}$
<b>Methylenblau</b>	<b>MTB</b>		$\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$

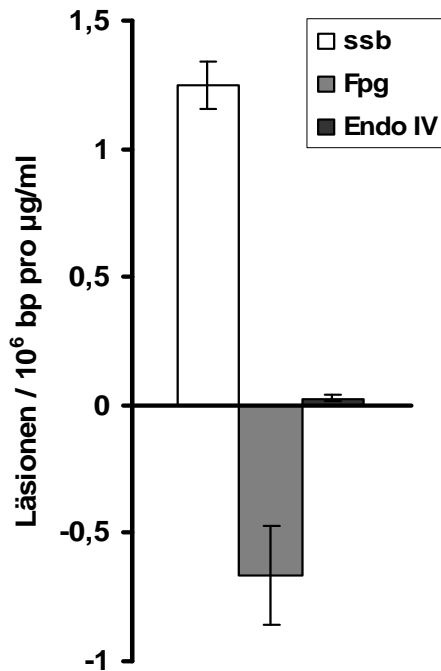
### 4.3.1 Chlorpromazin und Metabolite

#### 4.3.1.1 Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Chlorpromazin und Sonnenlicht

In **Abb. 4.5** sind die DNA-Schäden in V79-Zellen durch Chlorpromazin (CPZ) und Bestrahlung mit dem Solarsimulator (Bestrahlungsbedingungen siehe **3.2.2.2**) dargestellt. Gemessen wurde die Menge an Einzelstrangbrüchen, Fpg-sensitiven oxidativen Basenmodifikationen und AP-Läsionen. Die photoaktivierte Substanz verursacht einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Einzelstrangbrüche. Es werden fast keine AP-Läsionen gebildet. Die Prüfung auf Endonuklease III-sensitive Läsionen wurde bei 0,3 µg/ml CPZ durchgeführt und es konnten keine derartigen DNA-Veränderungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise verursacht UV-bestrahltes CPZ konzentrationsabhängig einen Abfall der durch die Bestrahlung allein induzierten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen. Die Anzahl dieser Basenmodifikationen sinkt auf den Wert des Hintergrundschadens ab, d.h. die oxidative Schädigung durch das Sonnenlicht wird ab ca. 0,2 µg/ml CPZ vollständig verhindert. Das gezeigte Schadensprofil verdeutlicht die genannten Befunde, zu beachten ist hier der veränderte Maßstab der Ordinatenachse (**Abb. 4.6**).



**Abb. 4.5** DNA-Schäden durch **Chlorpromazin** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe **3.2.2.2**). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Hintergrundspiegel wieder (SSB: n=3-7, Fpg: n=2-4, Endo IV n=1). Die Hintergrundspiegel selbst sind als Kontrollwert im Dunkeln dargestellt. [1µg/ml ≡ 2,8 µM]



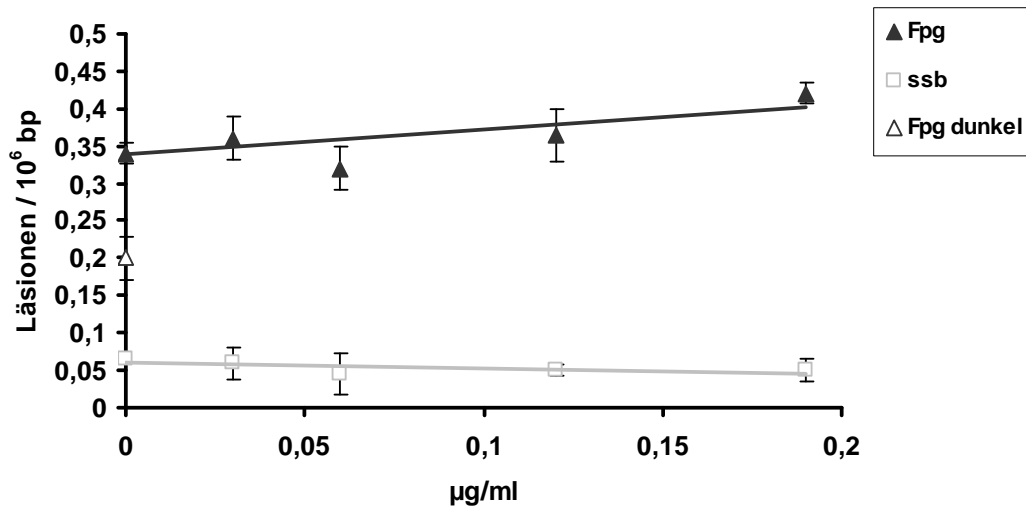
**Abb. 4.6** Induzierte DNA-Schäden durch **Chlorpromazin** und Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Läsionen/ $10^6$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Chlorpromazin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.5**.

Der beobachtete Quencheffekt des CPZ auf die Menge an oxidativen Basenmodifikationen in bestrahlten V79-Zellen wurde nachfolgend genauer untersucht.

#### 4.3.1.1.1 Einfluss von Chlorpromazin auf die oxidative DNA-Schädigung durch Licht > 400 nm

Die Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in **4.3.1.1** geschädigt, allerdings mit dem Licht einer Halogenlampe durch einen Kantenfilter (> 400 nm; 30 min, siehe **3.2.6.3.2**) bestrahlt. Die Fragestellung war, ob der durch Licht induzierte Fpg-sensitive Schaden auch unter diesen Bedingungen verhindert wird.

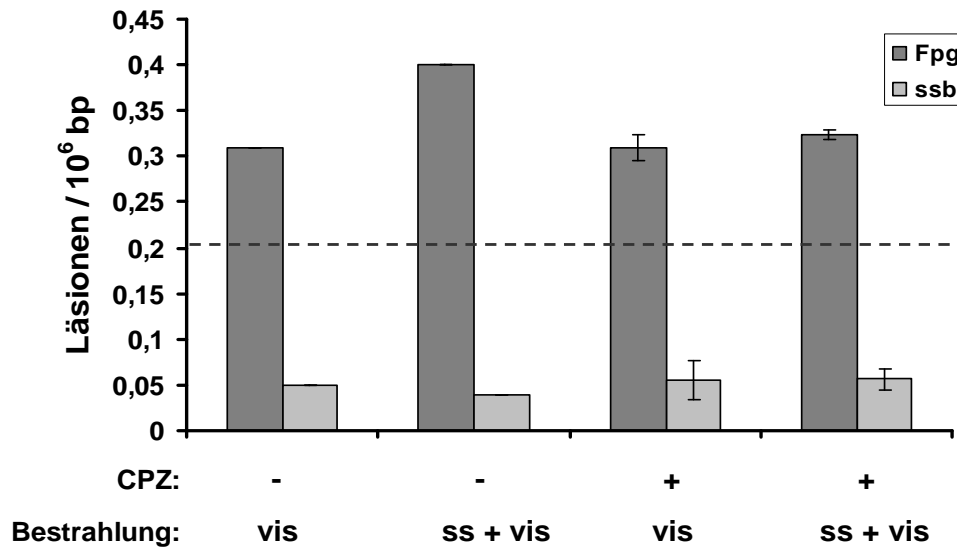
Wie in **Abb. 4.7** dargestellt, werden durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht allein Fpg-sensitive oxidative Basenmodifikationen in einer Höhe von  $0,15$  Läsionen/ $10^6$  bp verursacht. Diese werden jedoch nicht durch die Zugabe von CPZ gesenkt. Es muss daraus geschlossen werden, dass CPZ die durch den endogenen Photosensibilisator (im sichtbaren Bereich) induzierten DNA-Schäden nicht verhindert, wenn es selbst (durch die UV-Strahlung) nicht angeregt wird.



**Abb. 4.7** DNA-Schaden in V79-Zellen durch **Chlorpromazin** und Bestrahlung mit Licht > 400 nm (30 min, siehe 3.2.6.3.2). Gemessen wurden Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen (n=2). Der Hintergrundspiegel von Fpg-sensitiven Modifikationen (Dunkelkontrolle) ist auf der Ordinate dargestellt.

#### 4.3.1.1.2 Bedeutung des endogenen Chromophors in V79-Zellen für den oxidativen DNA-Schaden durch Chlorpromazin und Sonnenlicht

Es wurde untersucht, ob es unter der Behandlung der Zellen mit CPZ und Sonnenlicht zu einer Zerstörung des endogenen Chromophors kommt. Wäre dies der Fall, würde das den Abfall des Fpg-sensitiven Schadens bei steigender CPZ-Konzentration erklären. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zuerst mit Sonnenlicht in Anwesenheit von CPZ bestrahlt und sofort danach mit sichtbarem Licht (Kantenfilter 400 nm) (siehe 3.2.2.2). Wie in **Abb. 4.8** gezeigt, wurde die Induktion von oxidativen Basenmodifikationen durch sichtbares Licht durch eine Vorbehandlung mit CPZ unter Bestrahlung mit dem Solarsimulator nicht verhindert. Man muss daraus schliessen, dass der endogene Chromophor durch photoangeregtes CPZ nicht dauerhaft zerstört wird.



**Abb. 4.8** Entstehung von Fpg-sensitiven DNA-Basenmodifikationen in V79-Zellen durch Bestrahlung mit dem Solarsimulator (ss) in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von **Chlorpromazin** (0,2 µg/ml) und anschließendem Bestrahlen mit Licht > 400 nm (vis). Die gestrichelte Linie zeigt die Höhe des Untergrundschadens an Fpg-sensitiven Läsionen (n=1).

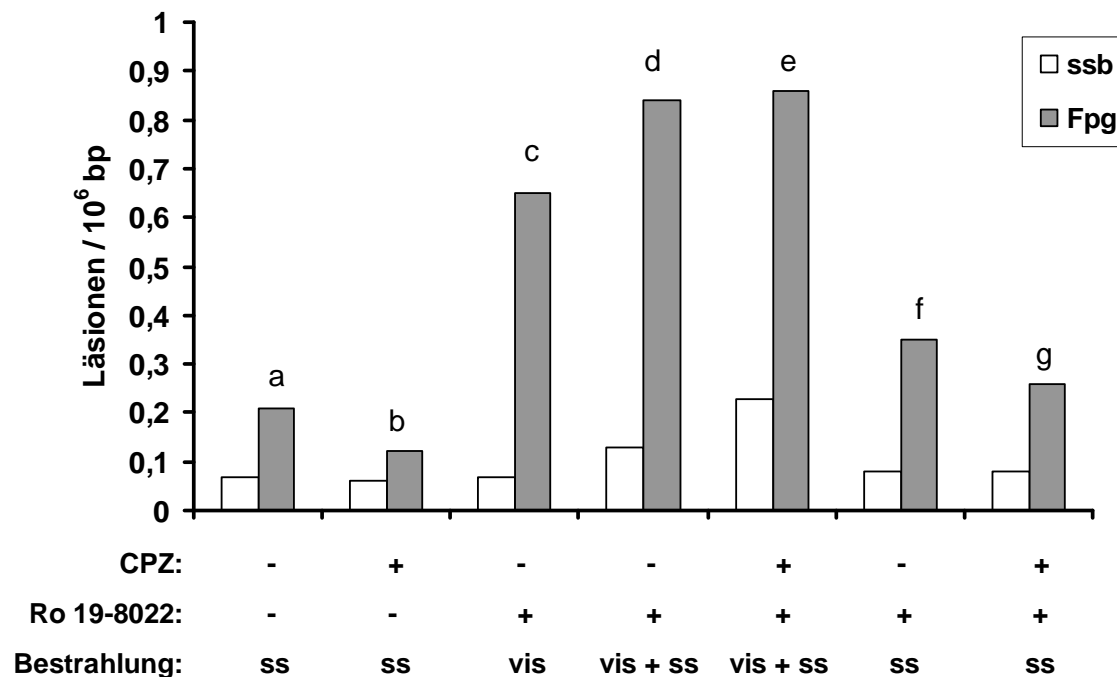
#### 4.3.1.1.3 Einfluss von Chlorpromazin auf die Induktion oxidativer Basenmodifikationen durch Ro 19-8022 und Sonnenlicht

Um auszuschliessen, dass CPZ im angeregten Zustand mit 8-Hydroxyguanin reagiert und somit die Zielstruktur des Fpg blockiert, was ebenfalls verantwortlich für einen scheinbaren Quencheffekt sein könnte, wurde diese Basenmodifikation in den Zellen mit Hilfe von Ro 19-8022 in großer Menge generiert. Die Modellsubstanz induziert durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht via Singulett-Sauerstoff die Bildung oxidativer, Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in hohem Ausmaß. Einzelstrangbrüche werden kaum erzeugt (Will, 1995). **Abb. 4.9** zeigt das Ergebnis dieses Versuches, der mit der schnellen Alkalischen Elution gemessen wurde (dadurch sind die absoluten Messwerte im Vergleich zu den Ergebnissen der langsamen Elution etwas niedriger). Werden die Zellen in Anwesenheit von Ro 19-8022 mit Licht der Halogenlampe bestrahlt (c) (10 min, Abstand zur Lampe 38 cm, auf Eis), dann steigt der Fpg-sensitive Schaden in den Zellen auf etwa 0,65 Läsionen/10<sup>6</sup> bp an. Werden diese Zellen anschließend unter Standardbedingungen mit dem Solarsimulator bestrahlt (d), so kommt ein Schaden von 0,15 Läsionen/10<sup>6</sup> bp hinzu. Ein Zusatz von CPZ zu dieser Probe (e) während der Sonnenlichtbestrahlung hat keinen Einfluss auf die Schadenshöhe.

Wird Ro 19-8022 zugegeben und mit Sonnenlicht bestrahlt (f), dann ist die Induktion von 8-Hydroxyguanin unter den Standardbedingungen um etwa ein Drittel niedriger als bei der Bestrahlung mit der Halogenlampe. Da die Bestrahlungszeiten fast identisch sind, spricht

dies für eine schwächere Beleuchtungsstärke bzw. einen geringeren VIS-Anteil des Solarsimulators.

Die Ergebnisse zeigen, dass CPZ nicht mit 8-Hydroxyguanin reagiert und der beobachtete Quencheffekt ist somit nicht auf das Verhindern der Erkennung von 8-oxoG durch das Enzym zurückzuführen.



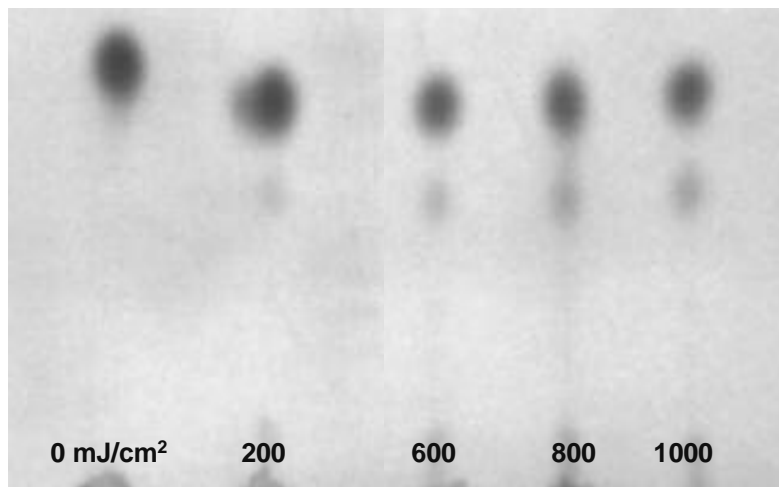
**Abb. 4.9** Einfluss der Vorbehandlung von Zellen mit Ro 19-8022 plus sichtbarem Licht auf die Menge an oxidativen Basenmodifikationen durch Bestrahlen mit dem Solarsimulator in Anwesenheit von **Chlorpromazin** (e). Es sind verschiedene Kontrollen bei Anwesenheit (b,g) und Abwesenheit (a,c,d,f) von Chlorpromazin gezeigt. Es wurde die schnelle Alkalische Elution angewendet, der Untergrundschaden wurde nicht abgezogen (n=1).

#### 4.3.1.1.4 Bedeutung von Protein-cross-links für den Schaden durch Chlorpromazin und Sonnenlicht.

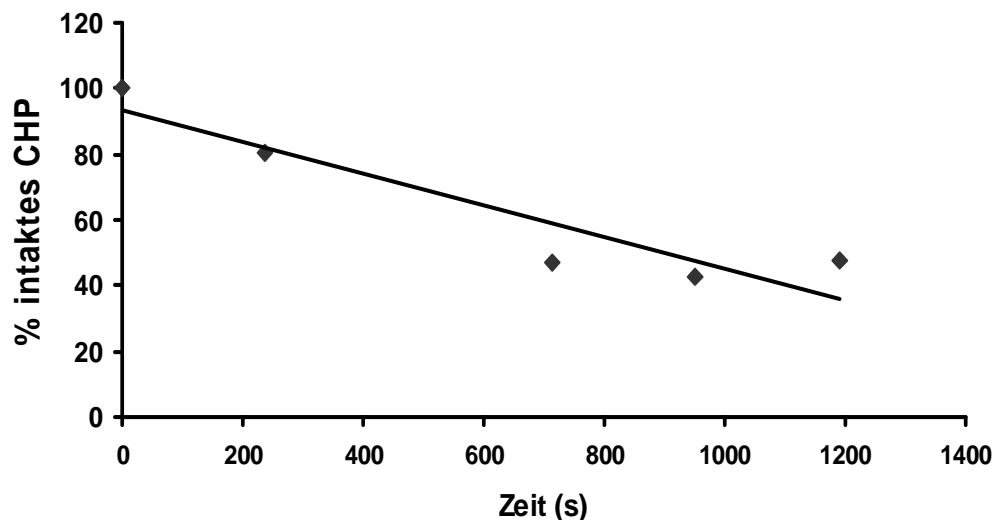
DNA-Protein-cross-links (DPC) können bei der Alkalischen Elution sowohl Einzelstrangbrüche als auch enzym-sensitive Läsionen verdecken, also deren Nachweis verhindern. Normalerweise wird deshalb bei der Lyse der Zellen Proteinase K zugesetzt (siehe 3.2.6.2). Um auszuschließen, dass nach Behandlung mit CPZ und Bestrahlung mit dem Solarsimulator erst bei der Inkubation mit Fpg DPC entstehen, wurde in einem Versuch nach der Enzyminkubation mit Fpg eine weitere Inkubation mit Proteinase K durchgeführt. Das Ergebnis entspricht dem aus 4.3.1.1. Folglich liegt keine Beeinflussung des Ergebnisses durch DPC vor.

#### 4.3.1.1.5 Dünnschichtchromatographie: Nachweis des Zerfalls von Chlorpromazin durch Sonnenlicht

Wird CPZ mit Sonnenlicht (UV) bestrahlt, so zerfällt es in verschiedene Photolyseprodukte (siehe 5.2.1). Um die Zersetzungsgeschwindigkeit von CPZ unter den zellulären Bestrahlungsbedingungen in dieser Arbeit zu bestimmen, wurde die Substanz mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (3.2.9) untersucht (Abb. 4.10). Es wurde immer ein gleiches Volumen (5 µl) an Substanzlösung aufgetragen, um die Zersetzung der Substanz zu verfolgen. Dazu wurde die Intensität der Fluoreszenzlöschung des unbestrahlten CPZ gleich 100 % gesetzt und im Vergleich dazu das CPZ-Ergebnis der bestrahlten Proben betrachtet. In Abb. 4.11 ist die Zersetzungsgeschwindigkeit von CPZ während der Bestrahlung dargestellt. Die Bestrahlungsbedingungen richten sich nach denen der zellulären Untersuchungen. Nach 17 min liegt noch 50 % intakte Substanz vor.



**Abb. 4.10** Zersetzung von **Chlorpromazin** während der Bestrahlung mit dem Solarsimulator unter Bedingungen der zellulären Untersuchungen. Angegeben ist die UVA-Bestrahlungsdosis. Die UVA-Stärke der Lampe betrug hier  $0,84 \text{ mW/cm}^2$  ( $200 \text{ mJ/cm}^2$  entsprechen 238 Sekunden Bestrahlungszeit). Es wurden pro Spur 5 µl Substanzlösung aufgetragen.

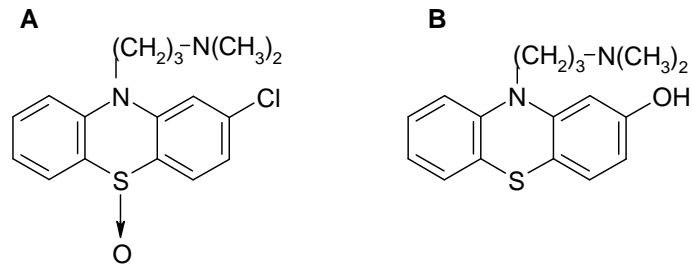


**Abb. 4.11** Zersetzungsgeschwindigkeit von **Chlorpromazin** während der Bestrahlung mit dem Solarsimulator unter Bedingungen der zellulären Untersuchungen. Daten ergeben sich nach Auswertung von **Abb. 4.10**.

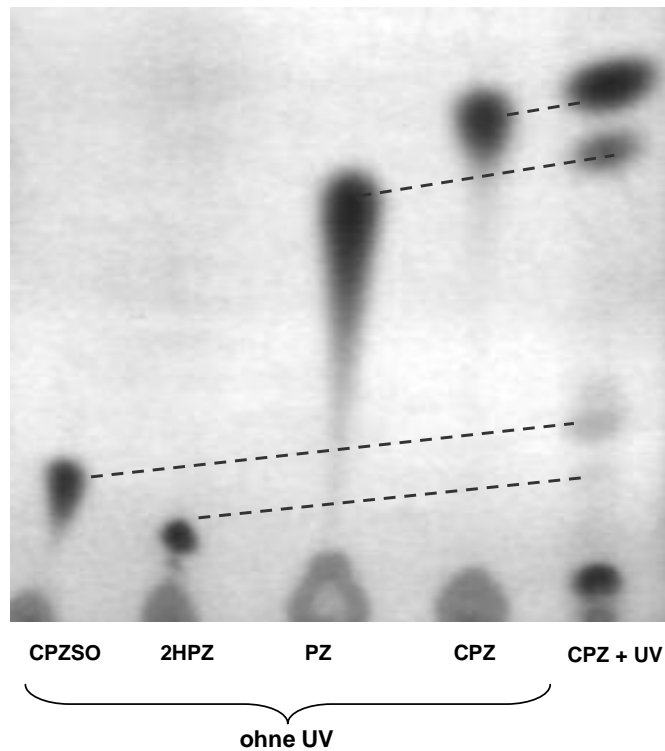
#### 4.3.1.1.6 Nachweis der entstandenen Hauptmetabolite von Chlorpromazin durch Sonnenlicht

Da nachgewiesen werden konnte, dass CPZ eine UV-Bestrahlung benötigt, um protektiv zu wirken, sollten die bei der Bestrahlung entstehenden Metabolite hinsichtlich der Photogenotoxizität untersucht werden. Laut Literatur (Grant and Greene, 1972; Schoonderwoerd et al., 1989) sind die Hauptprodukte nach einer Sonnenlichtbestrahlung von CPZ Promazin (PZ), 2-Hydroxypromazin (2HPZ) und Chlorpromazinsulfoxid (CPZSO). Die beiden letztgenannten Metabolite sind nicht im Handel erhältlich und wurden von Aventis Pharma (Process Development Chemistry, Romainville, Frankreich) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Verwendet werden die Substanzen in der Industrie zur Überprüfung der Reinheit des Arzneistoffs Chlorpromazin. Promazin ist eine Untersuchungssubstanz der Ringstudie und stand so zur Verfügung. Alle drei Metabolite von CPZ wurden in DMSO gelöst und auf die DC-Platte aufgetragen. Verglichen wurde diese Laufstrecken dann mit denen der Zersetzungsprodukte von bestrahltem CPZ (**Abb. 4.13**). Die einzelnen Punkte der bestrahlten Mischung konnten den Punkten der unbestrahlten Vergleichslösungen zugeordnet werden. Unter den zellulären Versuchsbedingungen dieser Arbeit entstehen die erwarteten oben genannten Metabolite, deren Photogenotoxizität deshalb überprüft wurde.





**Abb. 4.12** Strukturformel von **Chlorpromazinsulfoxid (A)** und **2-Hydroxypropazine (B)**.

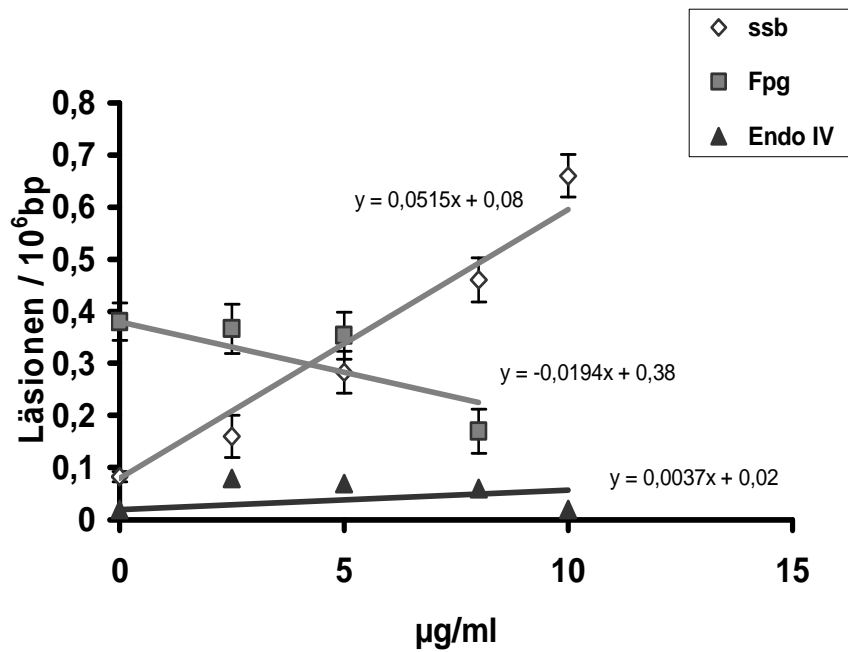


**Abb. 4.13** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der, durch Sonnenlichtbestrahlung entstandenen, Produkte von CPZ. Als Vergleichssubstanzen sind die vermuteten Derivate Chlorpromazinsulfoxid (CPZSO), 2-Hydroxypropazine (2-HPZ) und Promazine (PZ) aufgetragen.

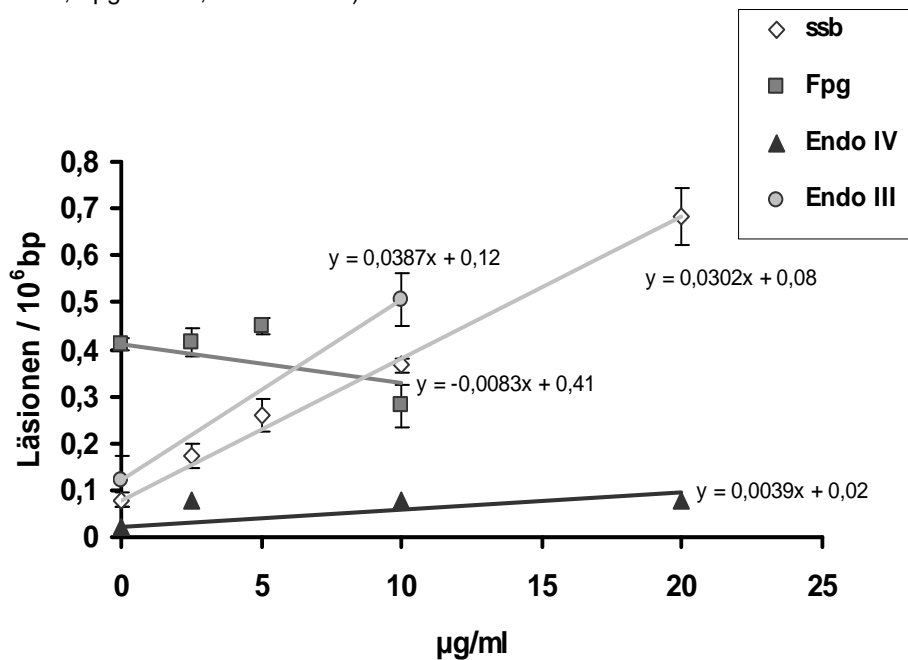
#### 4.3.1.1.7 Induktion von DNA-Modifikationen in V79-Zellen durch Chlorpromazinsulfoxid bzw. 2-Hydroxypromazin und Sonnenlicht

Die CPZ-Zersetzungsprodukte Chlorpromazinsulfoxid und 2-Hydroxypromazin wurden hinsichtlich der Photogenotoxizität in Zellen überprüft. Der Versuch mit V79-Zellen und der jeweiligen Substanz wurde wie in **3.2.6.3** beschrieben durchgeführt. Wie in **Abb. 4.14** dargestellt, verursacht CPZSO plus Sonnenlicht in Zellen konzentrationsabhängig einen linearen Anstieg der Einzelstrangbrüche. Zu beachten ist, dass diese Substanz ab einer Konzentration von 8 µg/ml einen deutlichen Abfall des Spiegels an Fpg-sensitiven Läsionen verursacht. Sie zeigt so einen ähnlichen protektiven Effekt wie CPZ (**Abb. 4.5**). Endo IV-sensitive Läsionen entstehen nicht. Die Prüfung auf Endonuklease III sensitive Läsionen wurde bei 10 µg/ml durchgeführt und es konnten keine solche DNA-Veränderungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

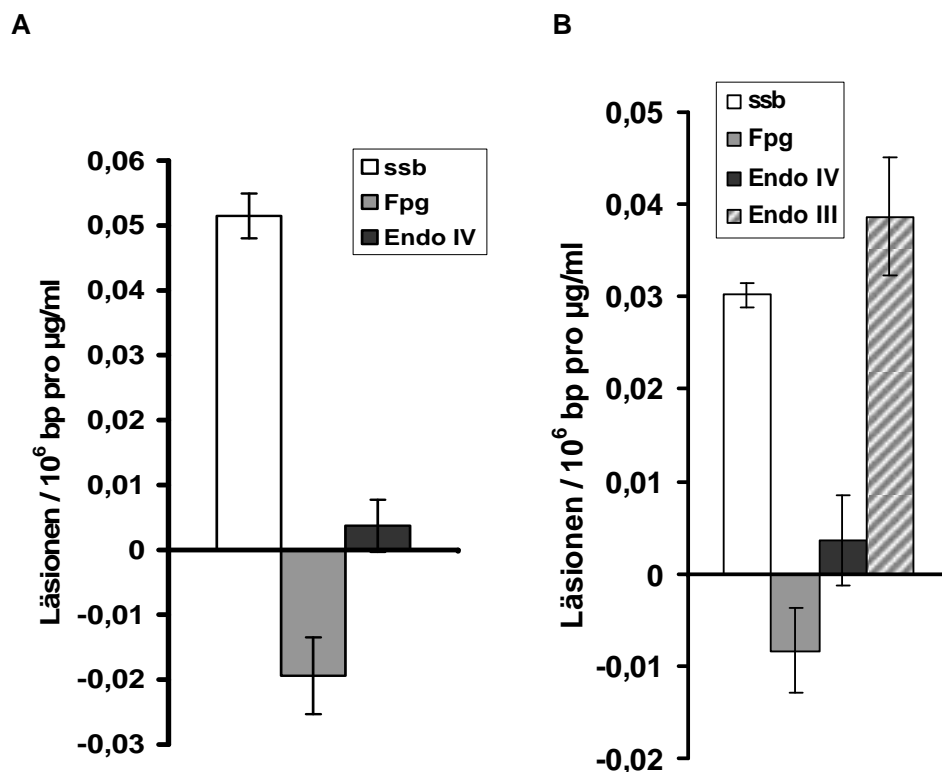
In **Abb. 4.15** ist der konzentrationsabhängige DNA-Schaden durch 2HPZ plus Sonnenlicht dargestellt. Auch hier erkennt man substanzdosisabhängig einen linearen Anstieg von Strangbrüchen. Der protektive Effekt auf die strahlungsinduzierten oxidativen Basenmodifikationen ist hier ebenfalls vorhanden. Im Gegensatz zu CPZSO induziert 2HPZ eine große Anzahl an Endo III-sensitiven Läsionen. In den Schadensprofilen (**Abb. 4.16**) wird deutlich, dass photoaktiviertes CPZSO vorrangig SSB verursacht. Bestrahltes 2HPZ hingegen induziert DNA-Schäden, die durch Endo III erkannt werden, gefolgt von SSB. Bemerkenswert ist, dass beide Substanzen unter diesen Versuchsbedingungen in einer 10fach höheren Konzentration eingesetzt werden müssen als CPZ, um einen Schaden an der zellulären DNA mit der Alkalischen Elution detektieren zu können. Dies bedeutet, dass die untersuchten Metabolite nicht direkt in Zusammenhang mit dem Protektionseffekt auf sonnenlichtbedingte oxidative DNA-Schäden in Zellen durch UV-aktiviertes CPZ stehen.



**Abb. 4.14** DNA-Schäden durch **Chlorpromazinsulfoxid** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=2-4, Fpg: n=2-4, Endo IV n=1).



**Abb. 4.15** DNA-Schäden durch **2-Hydroxypropromazin** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen s.3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=3, Fpg: n=3, Endo IV n=1, Endo III n=3).



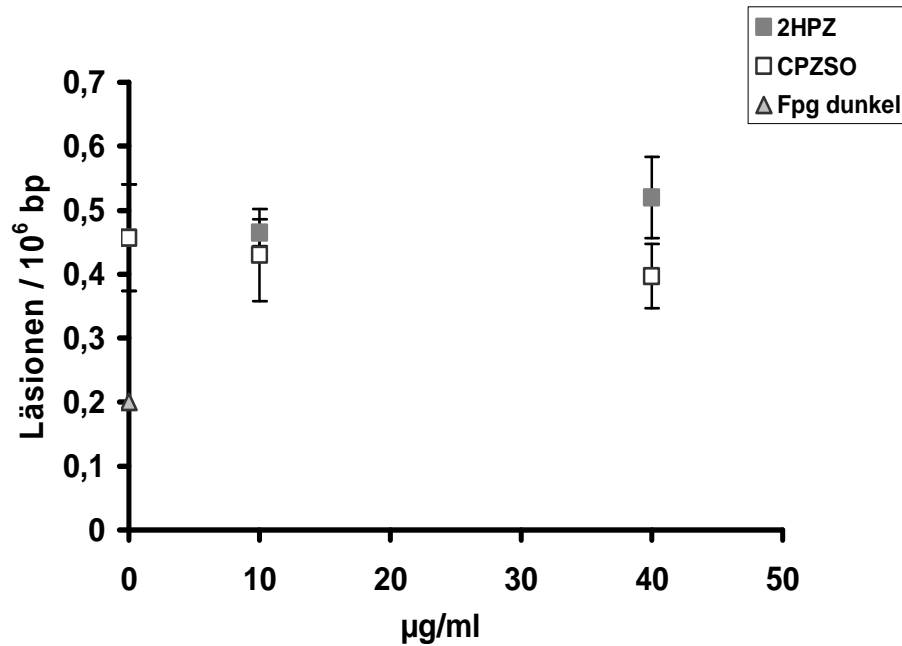
**Abb. 4.16** Induzierte DNA-Schäden durch **Chlorpromazinsulfoxid** (A) und **2-Hydroxypropromazin** (B) plus Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Läsionen/ $10^6$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Substanz in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.14** und **Abb. 4.15**.

#### 4.3.1.1.8 Einfluss von Chlorpromazinsulfoxid bzw. 2-Hydroxypropromazin auf die oxidative DNA-Schädigung durch Licht > 400 nm in Zellen

Die gering vorhandene Protektion vor sonnenlichtbedingten oxidativen DNA-Schäden in Zellen durch relativ hohe Konzentrationen von CPZ-Metabolite (4.3.1.1.7) ist kein Beweis dafür, dass die Metabolite eine Radikalfängereigenschaft besitzen. Die Substanzen könnten durch die UV-Bestrahlung ebenfalls zerstört werden. Somit läge die Verantwortlichkeit für die Protektion bei weiteren Spaltprodukten der CPZ-Metabolite. Um die Wirkung der unveränderten Substanzen zu testen, wurden CPZSO und 2HPZ unter den Bedingungen wie in 4.3.1.1.1 beschrieben, untersucht.

In beiden Fällen ändert sich die Menge an oxidativen Basenmodifikationen, erkannt durch Fpg, während der Behandlung der Zellen mit der Substanz und sichtbarem Licht nicht. Es wurde hier bis in den 100fach höheren Konzentrationsbereich im Vergleich zu CPZ

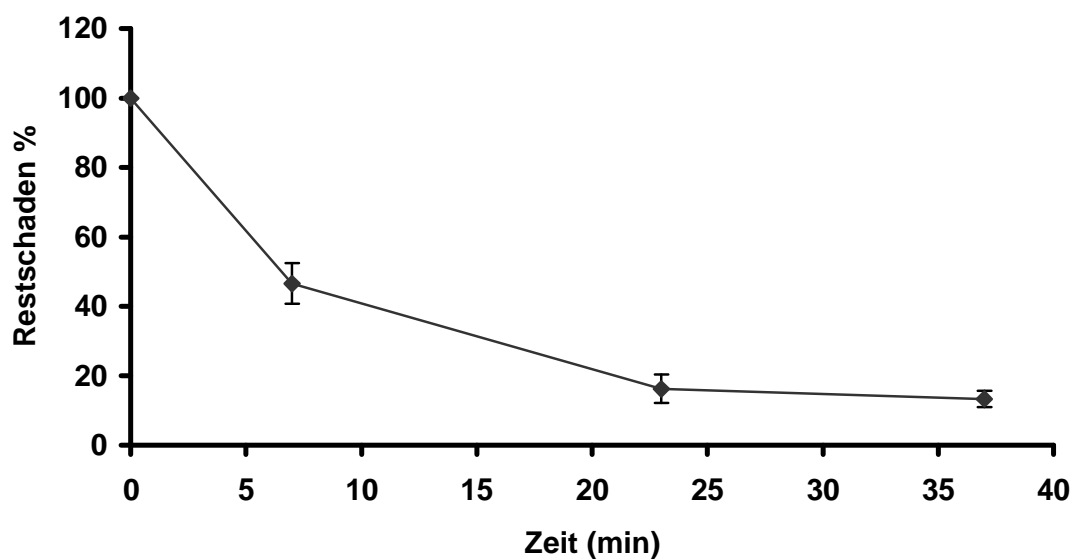
gemessen. Das Überprüfen einer Konzentration, so wie sie im CPZ-Versuch angewendet wurde (0,2 µg/ml), ergab ebenfalls keine Änderung des Spiegels an Fpg-sensitiven Basenmodifikationen (hier nicht gezeigt). CPZSO und 2HPZ sind daher nicht verantwortlich für die Protektion vor sonnenlichtbedingten oxidativen DNA-Schäden in Zellen.



**Abb. 4.17** DNA-Schaden in V79-Zellen durch **Chlorpromazinsulfoxid** und **2-Hydroxypropromazin** plus Bestrahlung mit Licht > 400 nm. Gemessen wurden Fpg-sensitive Läsionen (n=2-3) mittels Alkalischer Elution.

#### 4.3.1.1.9 Reparatur der durch CPZ und Sonnenlicht induzierten Einzelstrangbrüche in V79-Zellen

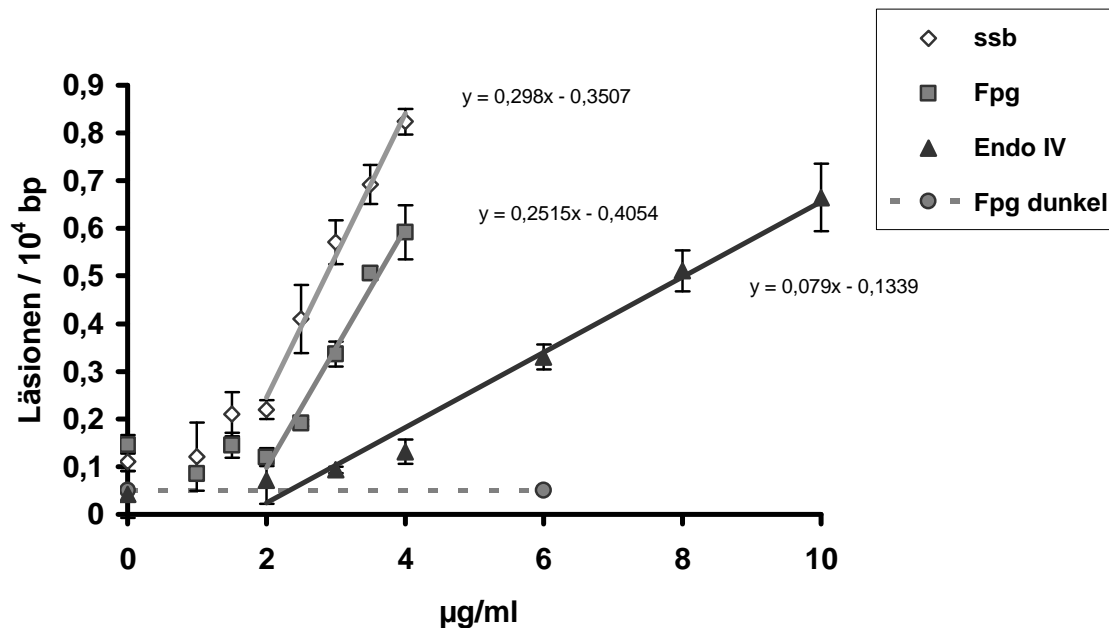
In V79-Zellen wurde die Reparaturgeschwindigkeit von Einzelstrangbrüchen, verursacht durch CPZ und Bestrahlung mit dem Solarsimulator, gemessen. Dazu wurden Messungen mittels Alkalischer Elution zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Schädigung durchgeführt. Das Ausmaß an Strangbrüchen ohne Reparaturzeit ist in **Abb. 4.18** gleich 100 % gesetzt. Die Halbwertszeit der Strangbrüche beträgt danach ca. 5 min.



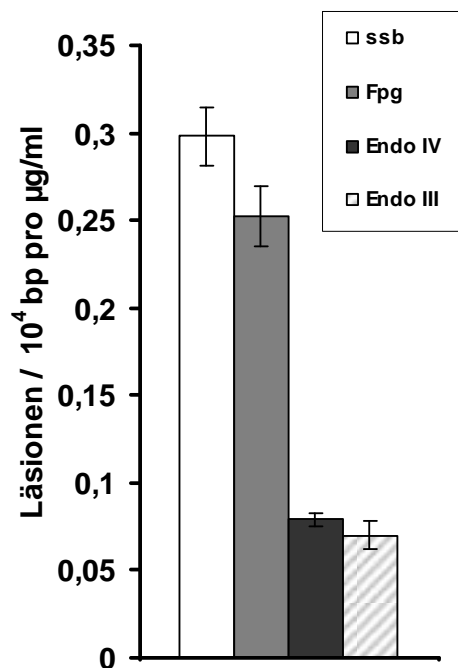
**Abb. 4.18** Reparatur von Einzelstrangbrüchen in V79-Zellen verursacht durch **Chlorpromazin** (0,37 µg/ml) und Bestrahlung mit Sonnenlicht, gemessen mittels Alkalischer Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2) (n=2).

### 4.3.1.2 Charakterisierung des durch Chlorpromazin und Sonnenlicht in zellfreier DNA induzierten Schadens

PM2-DNA wurde in Gegenwart von CPZ mit dem Solarsimulator (3.2.2.2) bestrahlt (siehe 3.2.7.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo IV-sensitiven Läsionen gemessen. Ab einer Konzentration von 2 µg/ml CPZ steigt der jeweilige DNA-Schaden linear an (Abb. 4.19). Im Konzentrationsbereich von 0-2 µg/ml ist kein induzierter Schaden vorhanden. Es zeigt sich ein „Hockey-stick“-artiger Verlauf der Kurven. Wie in Abb. 4.20 verdeutlicht, entstehen vor allem Einzelstrangbrüche, dicht gefolgt von Fpg-sensitiven Läsionen. Das Ausmaß der Endo IV- und Endo III-sensitiven Schäden ist gleich groß, aber deutlich geringer als das der anderen DNA-Schäden. Die Bestimmung der Endo III-sensitiven Läsionen erfolgte lediglich bei 3 µg/ml (Abb. 4.20), daher ist das Ergebnis nicht in Abb. 4.19 enthalten.



**Abb. 4.19** DNA-Schäden durch **Chlorpromazin** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (n=2-6). [1 µg/ml ≙ 2,8 µM]

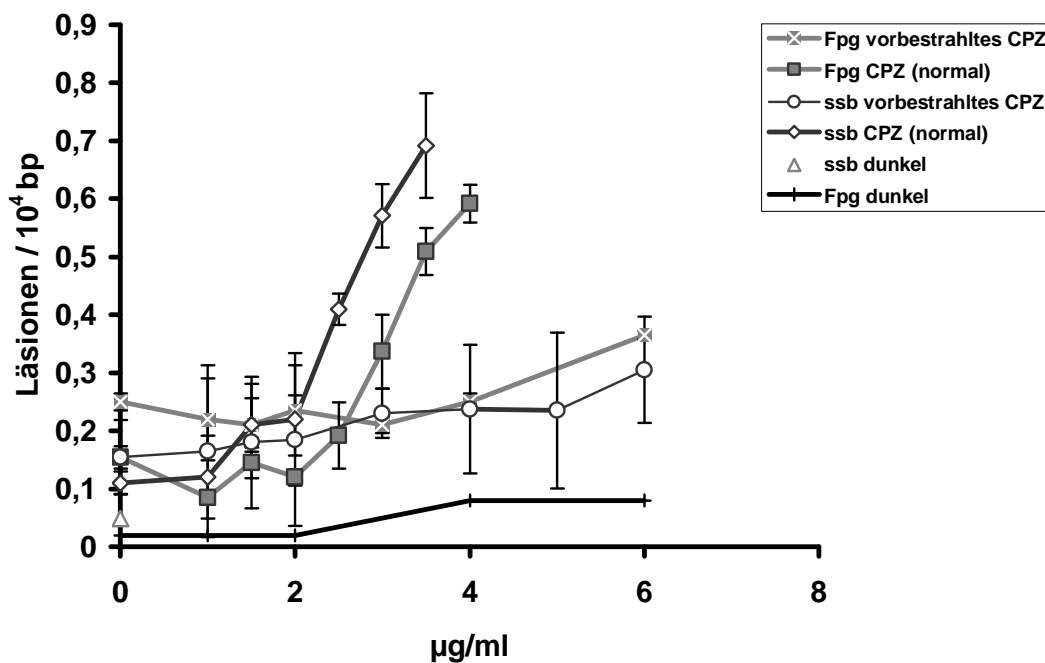


**Abb. 4.20** Induzierte DNA-Schäden durch **Chlorpromazin** und Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/ $10^4$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Chlorpromazin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen der linearen Bereiche in **Abb. 4.19** Zusätzlich ist hier der Endo III-sensitive Schaden dargestellt (n=3 bei 1 Konzentration).



#### 4.3.1.2.1 Einfluss der Vorbestrahlung von Chlorpromazin auf den zellfreien DNA-Schaden

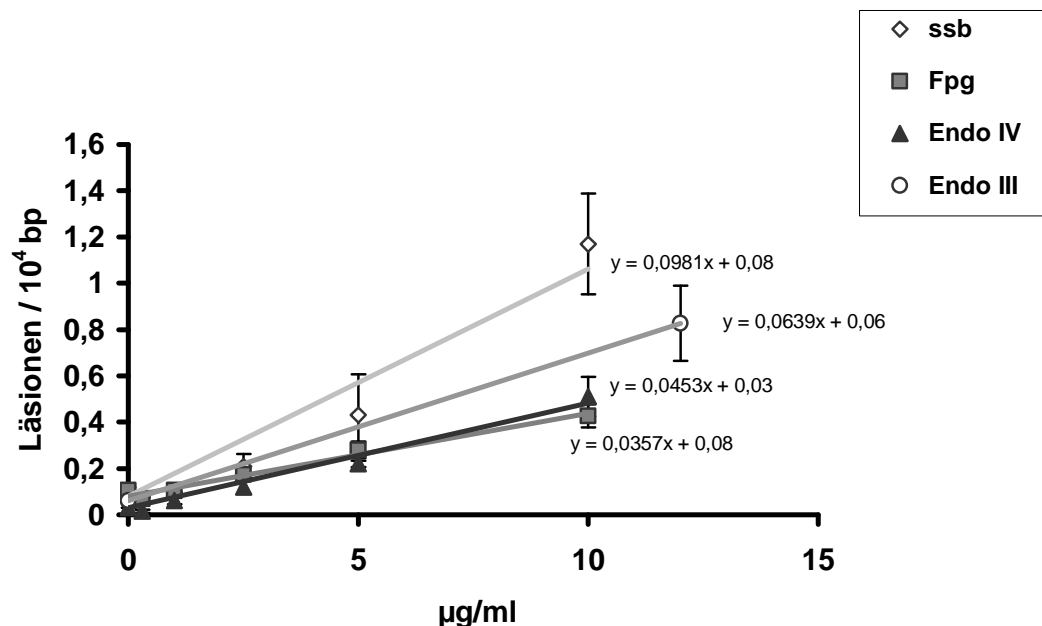
Um herauszufinden, ob CPZ nach der Bestrahlung im PM2-Assay noch photogenotoxisches Potential besitzt, wurde die zellfreie DNA mit vorbestrahltem CPZ und Sonnenlicht inkubiert. Die Vorbestrahlung der Substanz ohne DNA erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie im Assay mit DNA. Wie in **Abb. 4.21** ersichtlich, ist die zerstrahlte Substanz kaum in der Lage, einen DNA-Schaden zu verursachen.



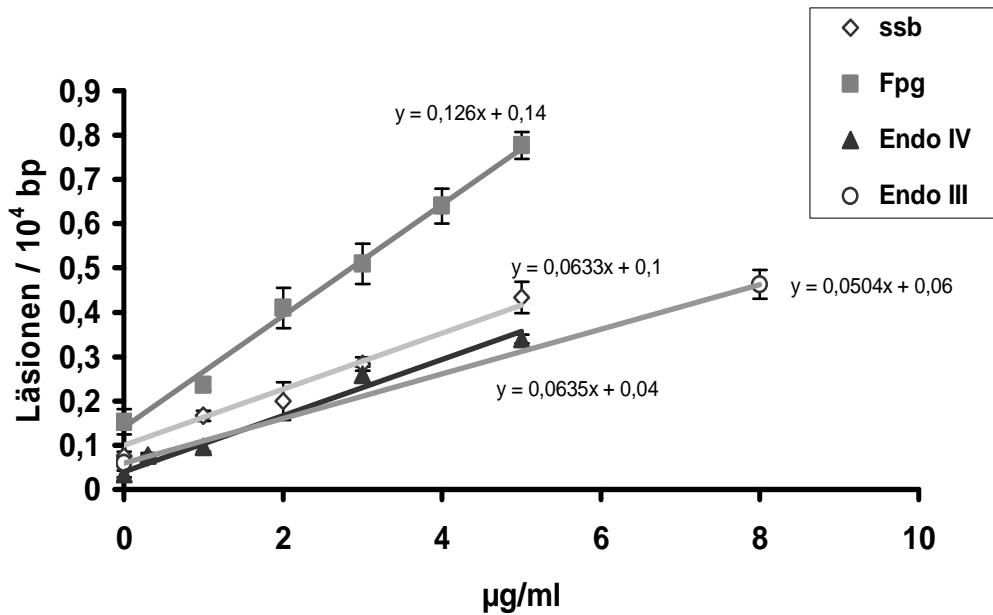
**Abb. 4.21** Vergleich des konzentrationsabhängigen Verlaufs der Menge an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen mit und ohne Vorbestrahlung des **Chlorpromazins**. Die Vorbestrahlung der Substanz erfolgte unter gleichen Bedingungen wie im PM2-Versuch (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die so vorbestrahlte Substanz wurde mit DNA nochmals unter den gleichen Bedingungen bestrahlt.

#### 4.3.1.2.2 Induktion zellfreier DNA-Modifikationen durch Chlorpromazinsulfoxid bzw. 2-Hydroxypromazin und Sonnenlicht

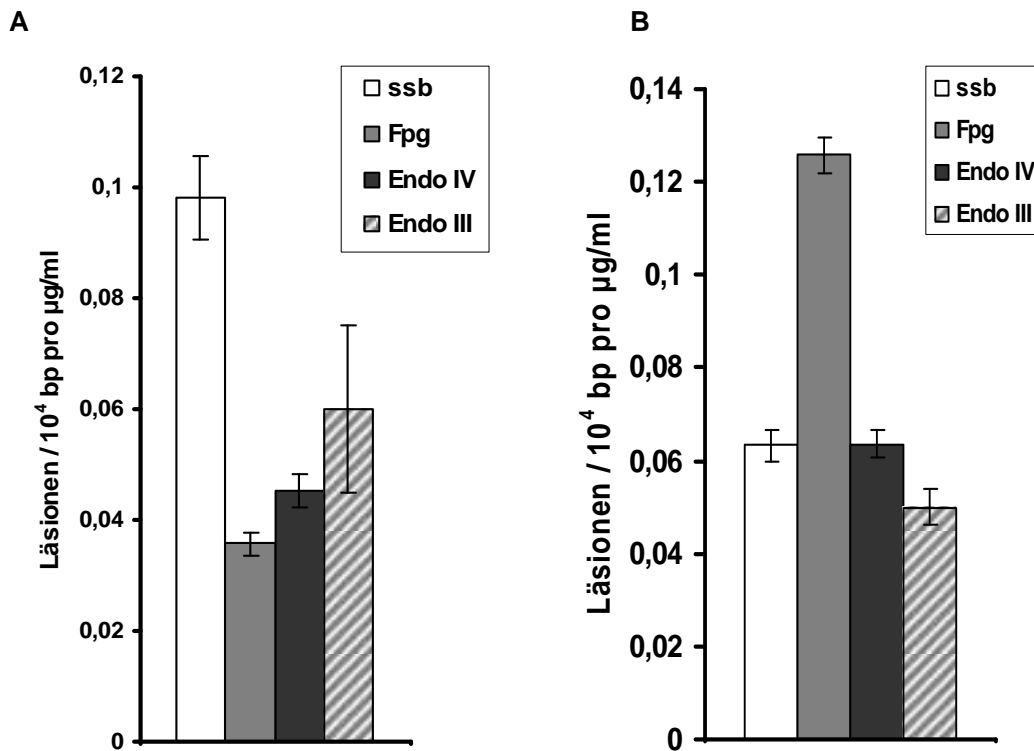
Die beiden Photoprodukte von CPZ, Chlorpromazinsulfoxid und 2-Hydroxypromazin wurden ebenfalls hinsichtlich der zellfreien DNA-Schädigung untersucht (3.2.7.2). CPZSO verursacht konzentrationsabhängig einen linearen Anstieg der Einzelstrangbrüche (Abb. 4.22). Auffällig ist die große Menge an Endo III-sensitiven Schäden in der DNA. Fpg- und Endo IV-sensitive Läsionen entstehen überraschenderweise beide nur in geringem Ausmaß. Im Falle des 2HPZ zeigt sich ein vollständig anderes Schadensprofil (Abb. 4.24). Dominierend sind hier die Fpg-sensitiven Läsionen. Einzelstrangbrüche und Schäden, erkannt durch Endo IV, entstehen in gleicher Menge und sind etwa halb so häufig wie die oxidativen Basenmodifikationen erkannt durch Fpg. Endo III-sensitive Läsionen haben den geringsten Anteil am DNA-Schaden. In allen Fällen nimmt der Schaden in PM2-DNA durch 2HPZ konzentrationsabhängig zu (Abb. 4.23). Bemerkenswert ist, dass es sich hier um den gleichen Konzentrationsbereich handelt, wie bei den zellfreien Untersuchungen von CPZ. Im Gegensatz zu den zellulären Experimenten ist also keine Dosiserhöhung der beiden Metabolite notwendig.



**Abb. 4.22** DNA-Schäden durch **Chlorpromazinsulfoxid** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo III- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (n=2-4).



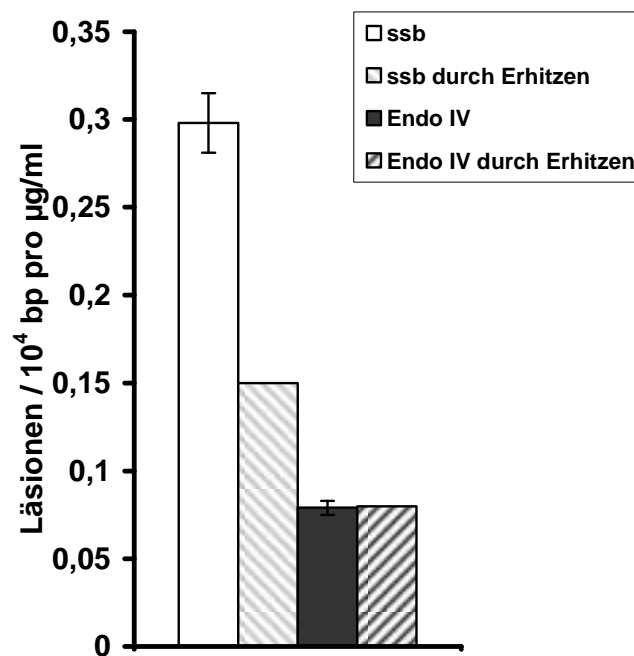
**Abb. 4.23** DNA-Schäden durch **2-Hydroxypropazine** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo III- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (n=3, Endo IV n=1).



**Abb. 4.24** Induzierte DNA-Schäden durch **Chlorpromazine** (A) und **2-Hydroxypropazine** (B) plus Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/10<sup>4</sup> bp pro µg/ml Substanz in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.22** und **Abb. 4.23**.

#### 4.3.1.2.3 Induktion thermolabiler DNA-Modifikationen durch Chlorpromazin und Sonnenlicht

Alkylierungen von DNA-Basen durch Chemikalien können oft durch Überführen dieser Alkylierungsprodukte in Einzelstrangbrüche oder AP-Läsionen indirekt sichtbar gemacht werden. Dies geschieht durch Erhitzen der geschädigten DNA im Wasserbad auf 60 °C für 50 min. Dadurch wird die Hydrolyse der genannten Produkte beschleunigt und man erhält so die Zahl sogenannter thermolabiler Läsionen. In **Abb. 4.25** sind für CPZ die zusätzlich nach dieser Behandlung gemessenen Strangbrüche und Endo IV-sensitiven Läsionen gezeigt. Durch das Erhitzen der DNA erhält man 50 % zusätzliche Strangbrüche und 100% zusätzliche AP-Läsionen.

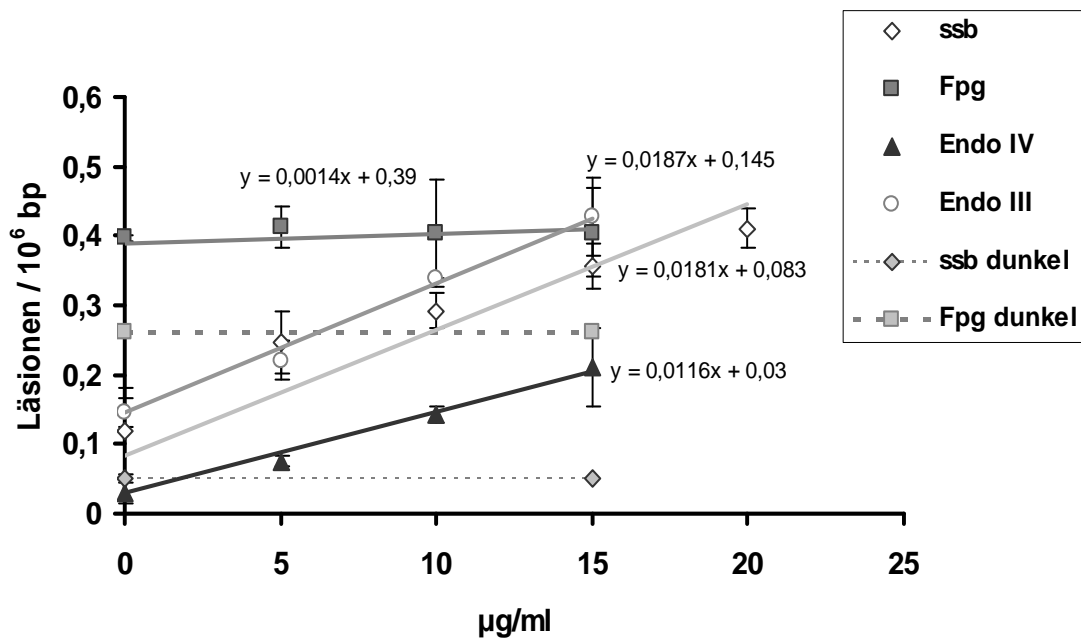


**Abb. 4.25** Nachweis der Alkylierung von DNA-Basen in PM2-DNA durch **Chlorpromazin** und Bestrahlung mit dem Solarsimulator (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Der Nachweis erfolgt hier durch Erhitzen der DNA in BE1-Puffer auf 60 °C für 50 min und die dadurch beschleunigte Hydrolyse von Alkylverbindungen. Dies führt zu Strangbrüchen oder AP-Läsionen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt hier in Läsionen/10<sup>4</sup> bp pro µg/ml.

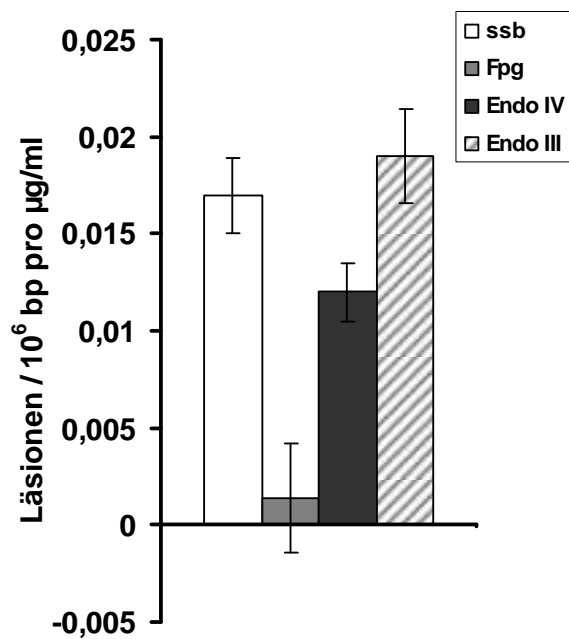
### 4.3.2 Promazin

#### 4.3.2.1 Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Promazin und Sonnenlicht

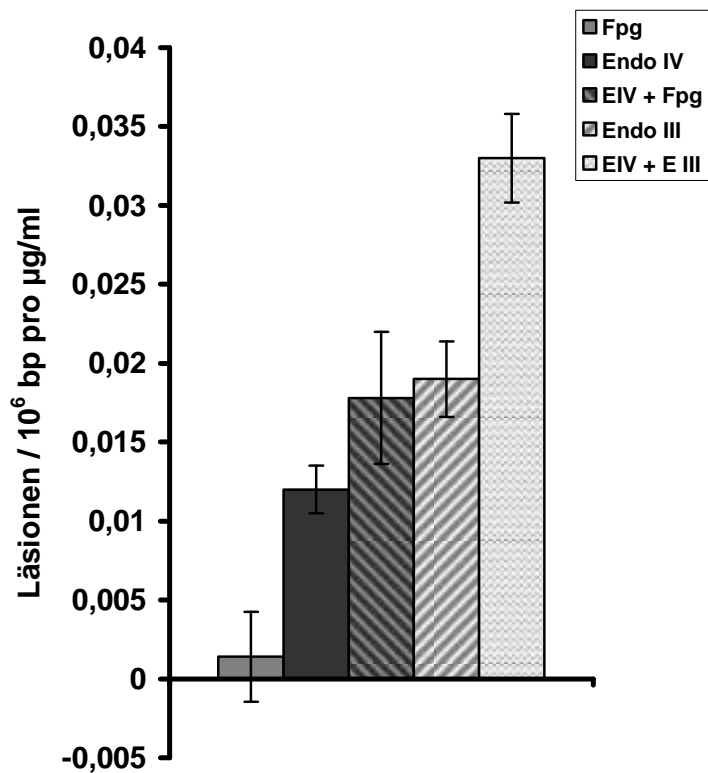
Die photogenotoxische Wirkung von Promazin und Sonnenlicht in V79-Zellen wurde in ähnlicher Weise wie die von CPZ untersucht (3.2.6.3). Promazin verursacht in Zellen einen dosisabhängigen linearen Anstieg von Strangbrüchen, Endo III- und Endo IV-sensitiven DNA-Schäden (Abb. 4.26). Die Induktion von Fpg-sensitiven oxidativen Purinmodifikationen geschieht praktisch nicht. In Abb. 4.27 wird verdeutlicht, dass neben SSB überraschenderweise vorrangig Endo III-sensitive Läsionen gebildet werden. Auch die Bildung von AP-Läsionen ist sehr hoch. Um die Art der, durch Endo III erkannten, Schäden näher zu charakterisieren, wurden zelluläre Untersuchungen mit Enzymkombinationen durchgeführt (Abb. 4.28). Diese konnten zeigen, dass es sich bei den AP-Läsionen um 1'oxidierte AP-Läsionen handelt, da die Menge an Läsionen erkannt durch Fpg und Endo IV in der Kombination der beiden Enzyme additiv ist (siehe 3.2.6.1). Bei Einsatz der Kombination von Endo III und Endo IV verhält es sich ebenso. Die Anzahl der, durch die einzelnen Enzyme allein erkannten, Schäden wird in der Enzymkombination addiert. Das bedeutet, es existiert hier zwischen den erkannten Schäden keine Schnittmenge, Endo III detektiert hier ausschließlich Dihydropyrimidine.



**Abb. 4.26** DNA-Schäden durch **Promazin** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=2-5, Fpg: n=3, Endo IV: n=3). [1 µg/ml  $\equiv$  3,1 µM]



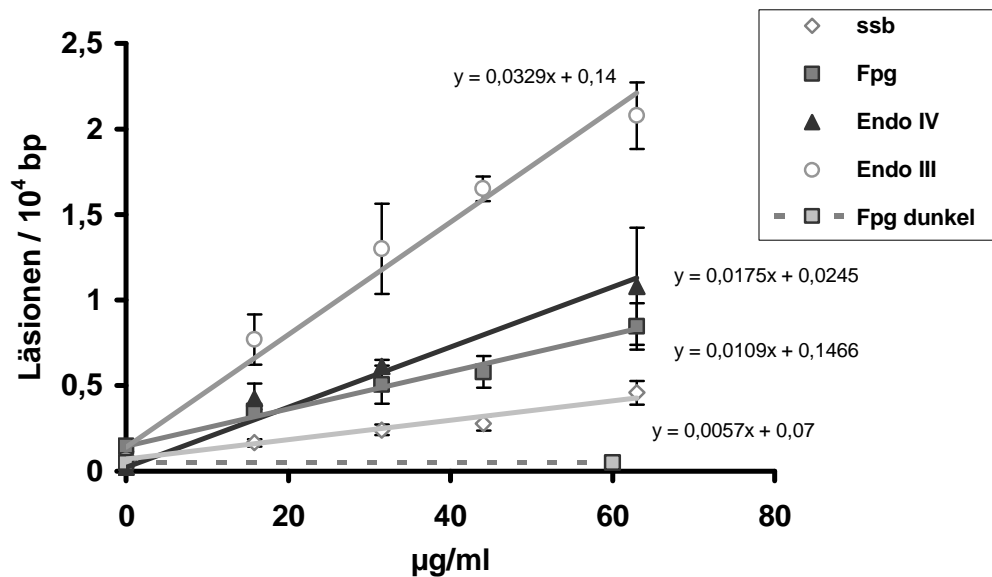
**Abb. 4.27** Induzierte DNA-Schäden durch **Promazin** und Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Läsionen/ $10^6$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Promazin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.26**.



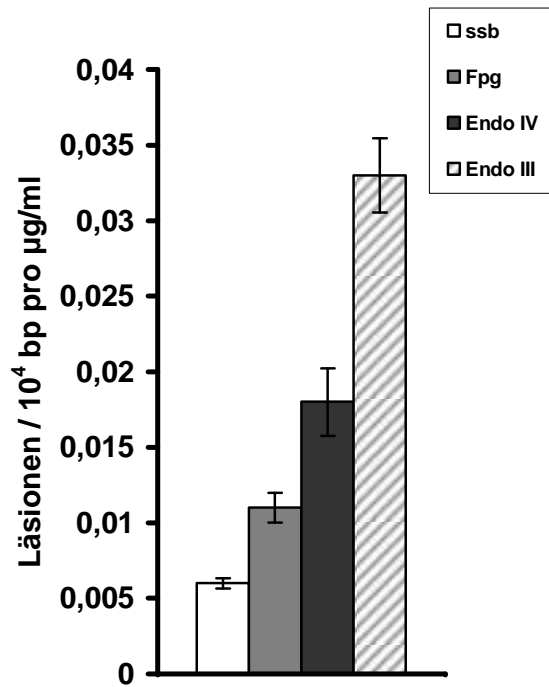
**Abb. 4.28** Schadensprofil in V79-Zellen durch **Promazin** und Sonnenlicht. Hier erfolgte der Einsatz von Enzymkombinationen zur näheren Charakterisierung des Profils in **Abb. 4.27**.

### 4.3.2.2 Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Promazin und Sonnenlicht

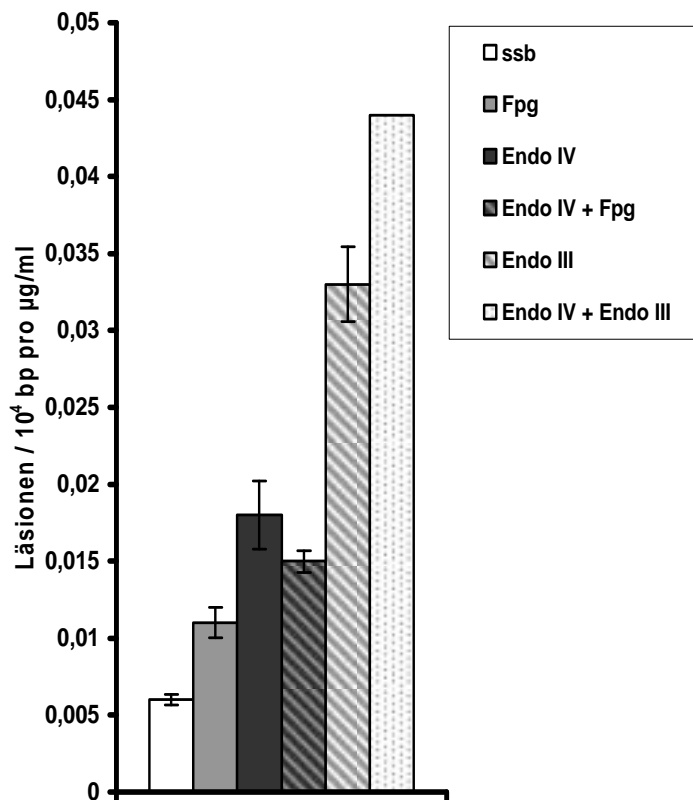
Unter zellfreien Bedingungen kommt es bei der Inkubation von DNA mit Promazin unter Sonnenlichtbestrahlung (3.2.7.2) zur Entstehung einer sehr großen Menge an Endo III-sensitiven Läsionen, die dosisabhängig linear ansteigen (Abb. 4.29). Einen linearen Anstieg kann man auch bei den AP-Läsionen, den oxidativen Purinmodifikationen und bei den Strangbrüchen beobachten. Letztere entstehen in äußerst geringem Umfang (Abb. 4.30). Vorrangig werden hier, wie auch unter zellulären Bedingungen, Endo III-sensitive Läsionen und AP-Stellen gebildet. Da die Endonuklease III deutlich mehr Schäden erkennt als Fpg, kann man daraus schließen, dass es sich bei der Differenz um Dihydropyrimidine handelt. In Abb. 4.31 ist der Schaden, erkannt durch verschiedene Enzymkombinationen, dargestellt. Die Kombination von Fpg und Endo IV zeigt, dass es sich in etwa um das gleiche Schadensausmaß handelt, wie bei Einsatz von Endo IV alleine. Oxidative Purinmodifikationen (wie beispielsweise 8-Hydroxyguanin) entstehen nicht, da ansonsten aus dem Einsatz der Enzymkombination Fpg und Endo IV der additive Wert resultieren müsste. Es entstehen reguläre, 4'oxidierte sowie 1'oxidierte AP-Läsionen. Letztere werden auch durch den Einsatz der Kombination aus Endo III und Endo IV identifiziert, da dieser Schaden etwas höher ist, als der erkannt durch Endo III allein.



**Abb. 4.29** DNA-Schäden durch **Promazin** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen s.3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg-, Endo III- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (SSB: n=5-9, Fpg: n=3-4, Endo IV: n=4, Endo III: n=3). [1µg/ml  $\equiv$  3,1 µM]



**Abb. 4.30** Induzierte DNA-Schäden durch **Promazin** und Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/ $10^4$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Promazin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.29**.

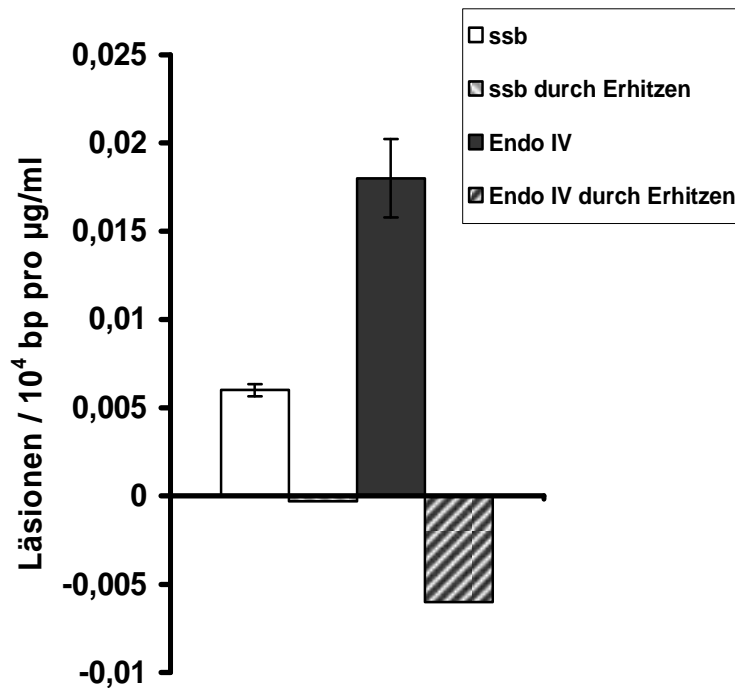


**Abb. 4.31** Schadensprofil in PM2-DNA geschädigt durch **Promazin** und Sonnenlicht. Hier erfolgte der Einsatz von Enzymkombinationen zur näheren Charakterisierung des Profils in **Abb. 4.30**.



#### 4.3.2.2.1 Induktion thermolabiler DNA-Modifikationen durch Promazin und Sonnenlicht

Promazin wurde, wie in 4.3.1.2.3 beschrieben, hinsichtlich einer Alkylierungsfähigkeit der DNA-Basen untersucht. Wie in **Abb. 4.32** gezeigt, entstehen beim Schädigen der DNA mit Promazin und Sonnenlicht keine thermolabilen Modifikationen, da keine zusätzlichen Einzelstrangbrüche oder AP-Läsionen nach dem Erhitzen der geschädigten DNA detektiert werden. Es kann angenommen werden, dass Promazin unter Bestrahlung nicht zur Bildung von DNA-Addukten führt. Eine Mindererkennung von Läsionen wie sie für Endo IV-sensitive Modifikationen (AP-Läsionen) beobachtet wurde, könnte möglicherweise auf eine chemische Reaktion der DNA mit Aminen des Puffers zurückzuführen sein (Häring et al., 1994).

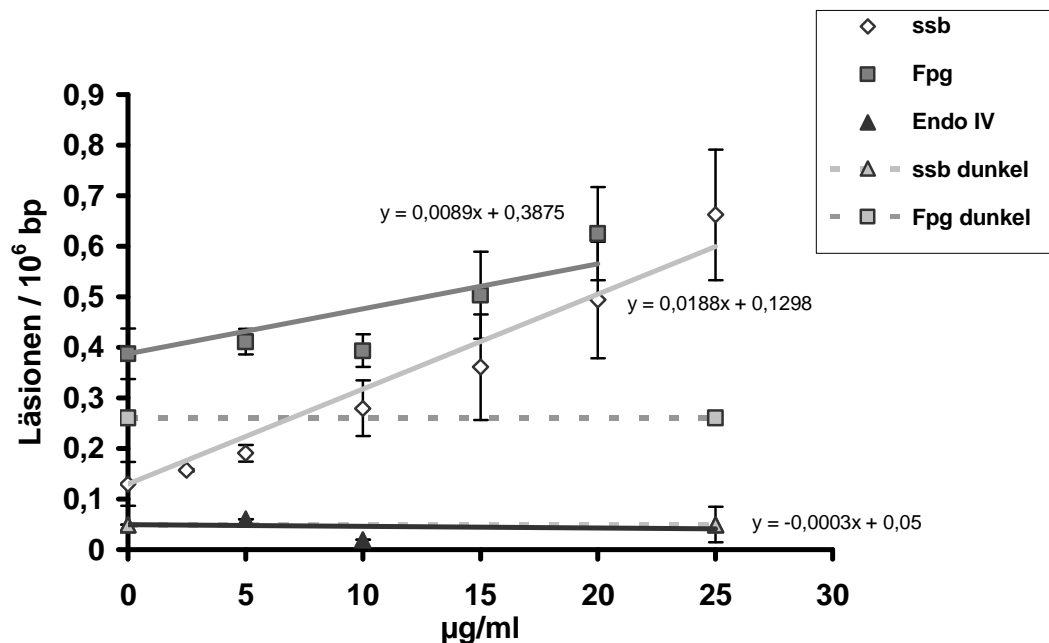


**Abb. 4.32** Nachweis der Alkylierung von DNA-Basen in PM2-DNA durch **Promazin** und Bestrahlung mit dem Solarsimulator (Bestrahlungsbedingungen s.3.2.2.2). Der Nachweis erfolgt hier durch Erhitzen der DNA in BE1-Puffer auf 60 °C für 50 min und die dadurch beschleunigte Hydrolyse von Alkylverbindungen.

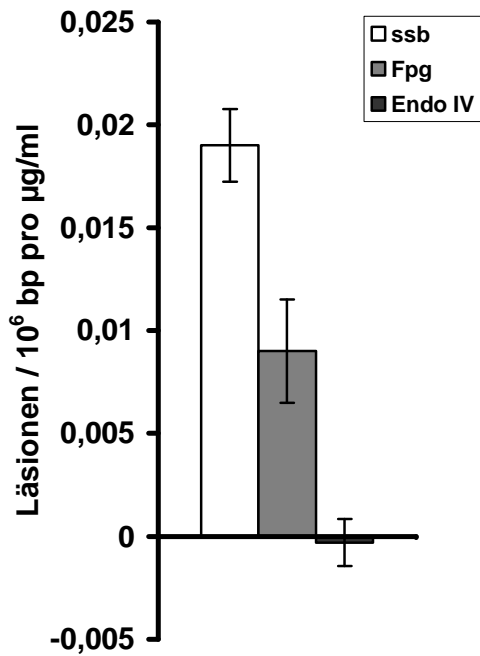
### 4.3.3 Lomefloxacin

#### 4.3.3.1 Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Lomefloxacin und Sonnenlicht

Das Fluorochinolon Lomefloxacin (LOF) wurde auf Photogenotoxizität in V79-Zellen getestet (3.2.6.3). In **Abb. 4.33** ist die Zahl der einzelnen DNA-Schäden in Abhängigkeit von der LOF-Konzentration gezeigt. Die Menge der Einzelstrangbrüche nimmt konzentrationsabhängig, linear zu. Die Zahl der Fpg-sensitiven Läsionen steigt nur mäßig an, Endo IV-sensitive AP-Läsionen werden nicht gebildet. In **Abb. 4.34** wird deutlich, dass ca. doppelt so viele SSB entstehen, wie Fpg-sensitive oxidative Basenmodifikationen.



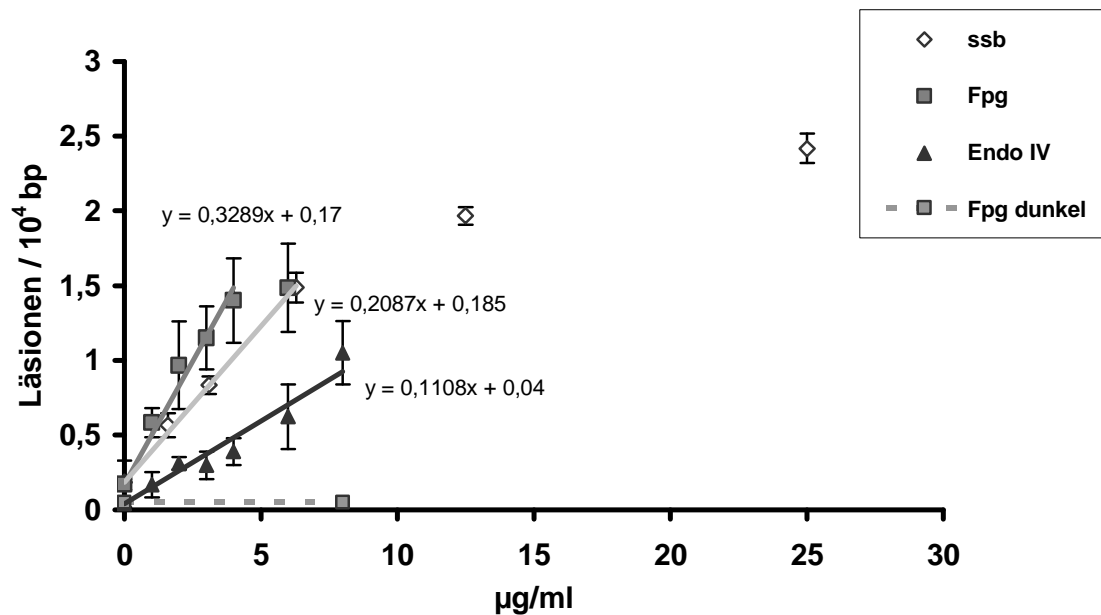
**Abb. 4.33** DNA-Schäden durch **Lomefloxacin** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=4-5, Fpg: n=3-4, Endo IV n=1). [1µg/ml ≅ 2,6 µM]



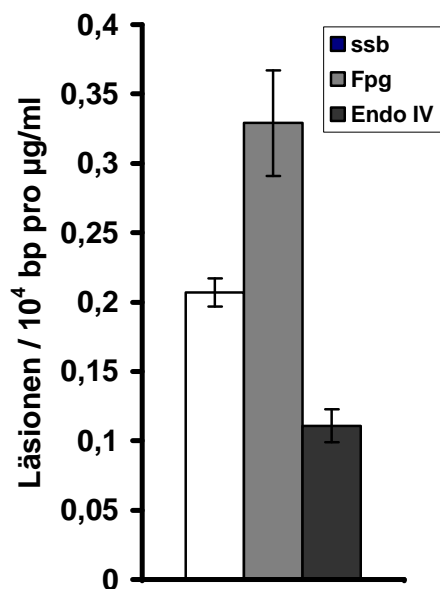
**Abb. 4.34** Induzierte DNA-Schäden durch **Lomefloxacin** und Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Läsionen/ $10^6$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Lomefloxacin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.33**.

#### 4.3.3.2 Charakterisierung des Schadens durch Lomefloxacin und Sonnenlicht an zellfreier DNA

Bei der Induktion des DNA-Schadens in PM2-DNA durch Lomefloxacin und Sonnenlicht (3.2.7.2) entstehen vor allem Fpg-sensitive Basenmodifikationen (**Abb. 4.36**), gefolgt von Strangbrüchen und Endo IV-sensitiven Läsionen. In **Abb. 4.35** wird gezeigt, dass diese alle linear in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration ansteigen.



**Abb. 4.35** DNA-Schäden durch **Lomefloxacin** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (SSB: n=3-4, Fpg: n=3-4, Endo IV: n=3-4). [1 µg/ml ≙ 2,6 µM]

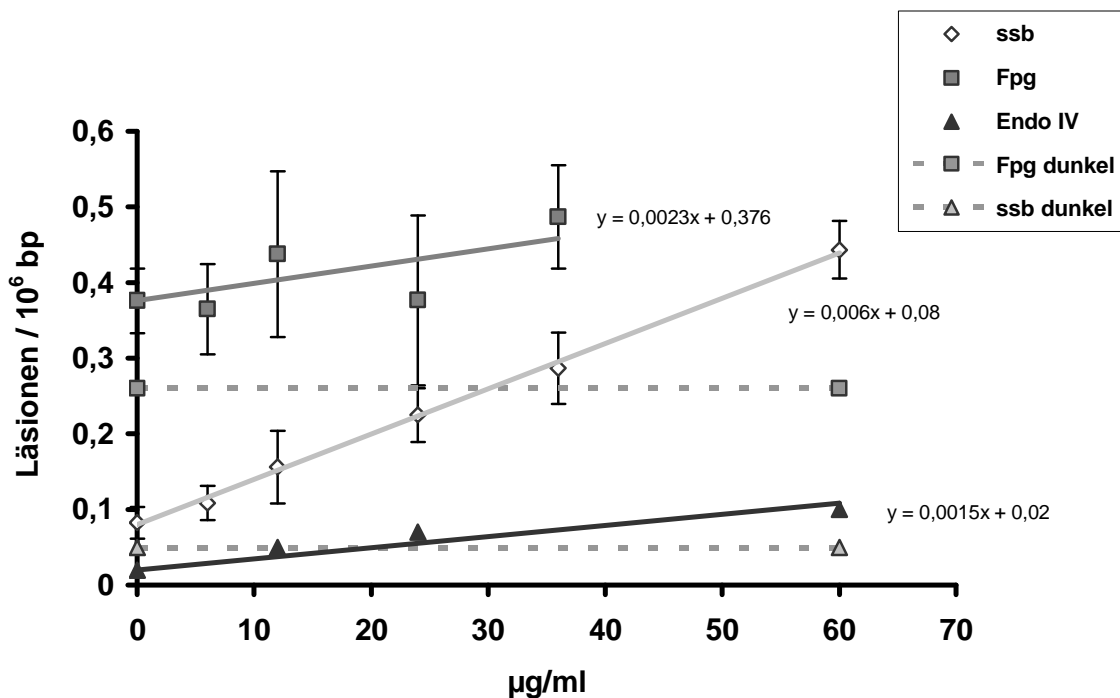


**Abb. 4.36** Induzierte DNA-Schäden durch **Lomefloxacin** und Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/10<sup>4</sup> bp pro µg/ml Lomefloxacin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.35**.

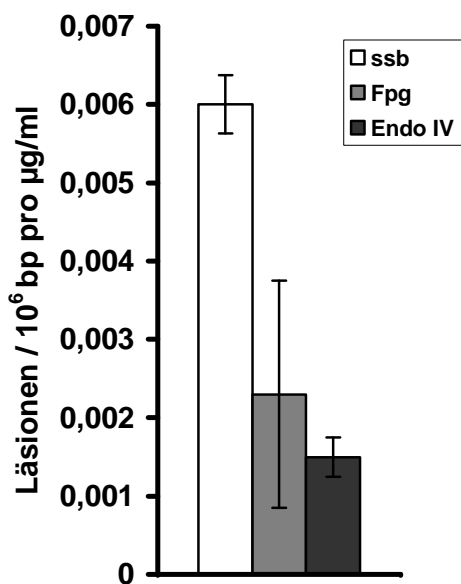
### 4.3.4 Ciprofloxacin

#### 4.3.4.1 Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Ciprofloxacin und Sonnenlicht

Der DNA-Schaden in V79-Zellen verursacht durch das Fluorochinolon Ciprofloxacin (CIF) (3.2.6.3) ist stark geprägt von der Entstehung der Einzelstrangbrüche (Abb. 4.38). Es kommt auch hier wie bei Lomefloxacin zu einem linearen, substanzdosisabhängigen Anstieg der Strangbrüche (Abb. 4.37). Die Zahl der oxidativen Purinmodifikationen steigt nur wenig an, es sind wenige AP-Läsionen vorhanden. Die letztgenannten beiden Formen der DNA-Schäden entstehen in ähnlich hohem Ausmaß.



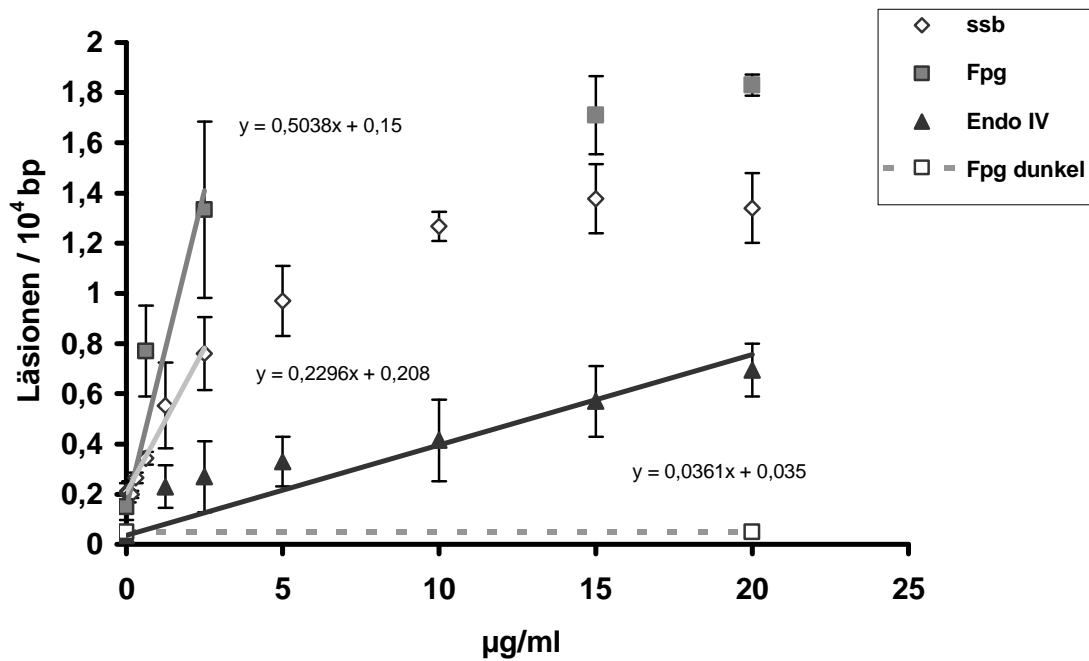
**Abb. 4.37** DNA-Schäden durch **Ciprofloxacin** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=3-4, Fpg: n=3-4, Endo IV n=1). [1 µg/ml ≙ 3,0 µM]



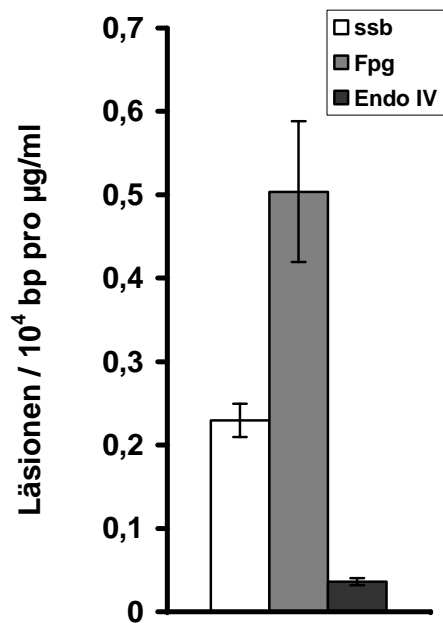
**Abb. 4.38** Induzierte DNA-Schäden durch **Ciprofloxacin** und Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Läsionen/ $10^6$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Ciprofloxacin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.37**.

#### 4.3.4.2 Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Ciprofloxacin und Sonnenlicht

Im zellfreien Versuch (3.2.7.2) zeigt Ciprofloxacin plus Sonnenlicht wie Lomefloxacin eine hohe Induktion von Fpg-sensitiven Läsionen (**Abb. 4.40**). Diese steigen zunächst linear an, zeigen jedoch beide im Konzentrationsbereich über  $10 \mu\text{g/ml}$  Substanz eine Sättigung (**Abb. 4.39**). Eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wird für die Strangbrüche beobachtet. Es entstehen nur sehr wenige AP-Läsionen.



**Abb. 4.39** DNA-Schäden durch **Ciprofloxacin** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (SSB: n = 2-6, Fpg: n = 2-4, Endo IV: n = 2). [1µg/ml ≙ 3,0 µM]

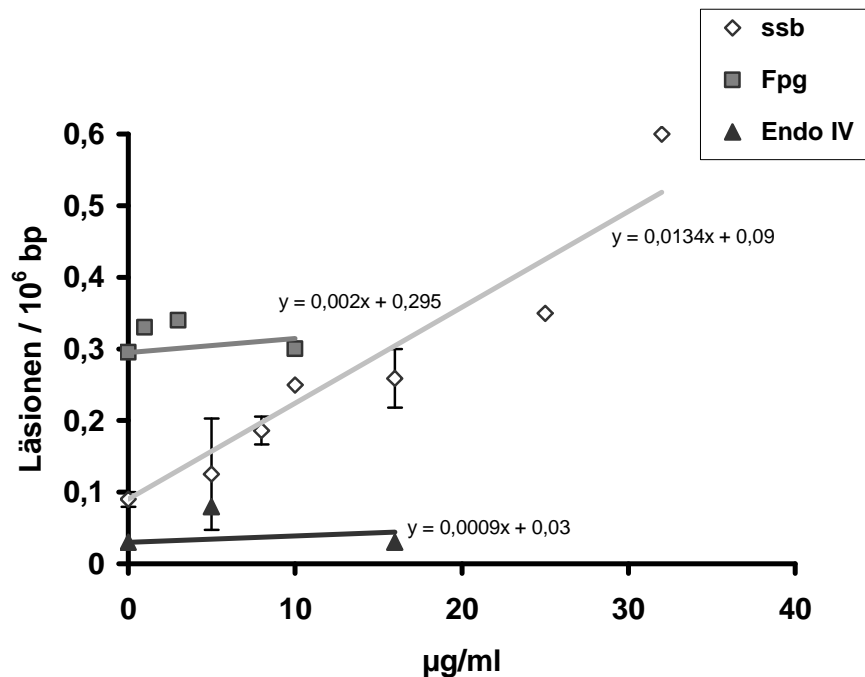


**Abb. 4.40** Induzierte DNA-Schäden durch **Ciprofloxacin** und Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/10<sup>4</sup> bp pro µg/ml Ciprofloxacin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.39**.

### 4.3.5 Doxycyclin

#### 4.3.5.1 Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Doxycyclin und Sonnenlicht

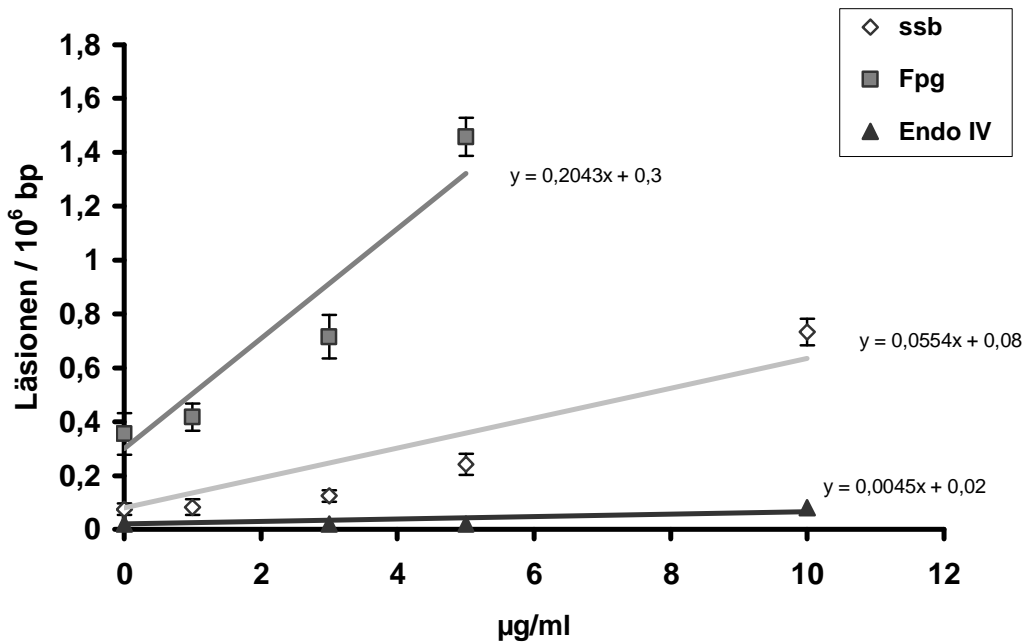
Doxycyclin (DXC) wurde auf Grund der vorgeschriebenen Bedingungen der Ringstudie zunächst in Behandlungsmedium (Zellkulturmedium ohne Phenolrot) gelöst (Standardbedingungen). In sehr hoher Konzentration der Stammlösung war die Lösung klar. Beim Herstellen der Verdünnungsreihe kam es jedoch zum Ausfallen der Substanz. Dies ist durch die Komplexbildung der Substanz mit Calcium- und Magnesiumionen des verwendeten Mediums erklärbar. Die homogene Suspension wurde in den Versuchen eingesetzt (siehe 3.2.6.3). Wie zu erwarten, wurde eine nur geringe zelluläre Schädigung beobachtet (**Abb. 4.41**). DXC wurde deshalb auch in einem Calcium- und Magnesium-freien Puffer (PBS/CMF) gelöst, verdünnt und bestrahlt (**Abb. 4.42**). Unter den Bedingungen konnte eine relativ hohe Induktion von konzentrationsabhängig linear ansteigenden oxidativen Purinmodifikationen nachgewiesen werden (**Abb. 4.43**). Es entstehen Einzelstrangbrüche in nur geringer Menge und fast keine AP-Läsionen.



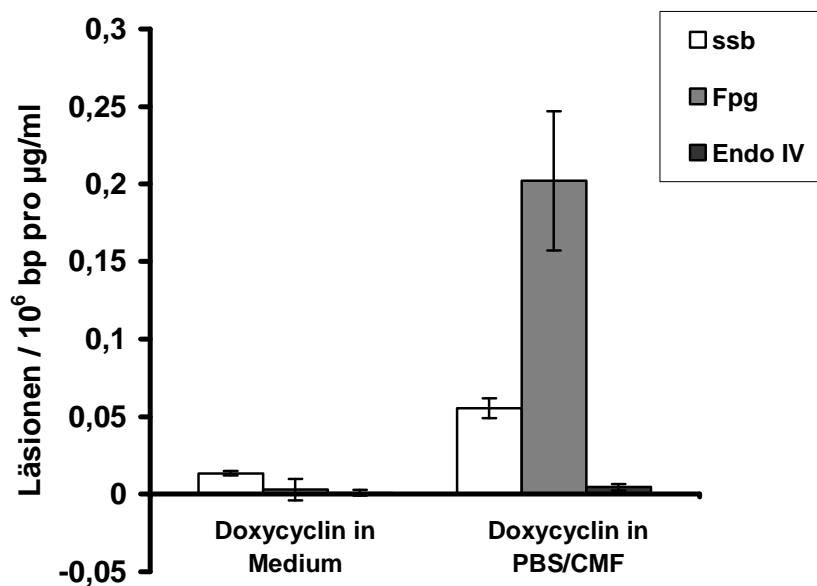
**Abb. 4.41** DNA-Schäden durch **Doxycyclin** in Behandlungsmedium (Kulturmedium ohne Phenolrot) und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder. [1 µg/ml  $\equiv$  1,9 µM]

Anm.: Diese Daten können auf Grund der Präzipitation der Substanz nicht zur Charakterisierung des Schadens verwendet werden, jedoch für die Korrelation mit den Daten des Mikrokerntests (siehe 4.6.2), da diese mit Behandlungsmedium ermittelt wurden.





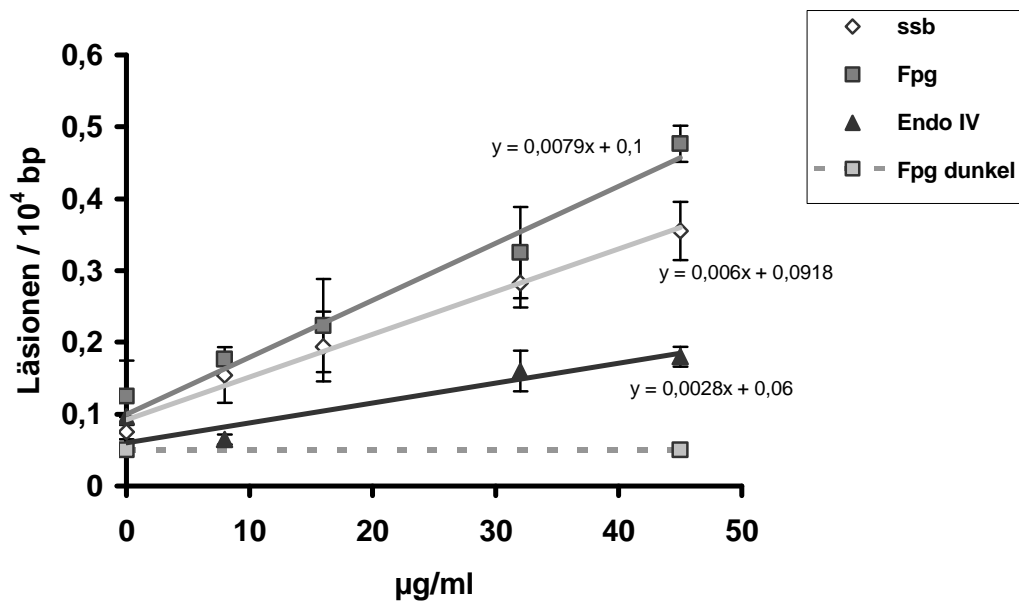
**Abb. 4.42** DNA-Schäden durch **Doxycyclin** in **PBS/CMF** (Calcium- und Magnesium-freier Puffer) und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=3-5, Fpg: n=3-4, Endo IV n=1). [1µg/ml  $\equiv$  1,9 µM]



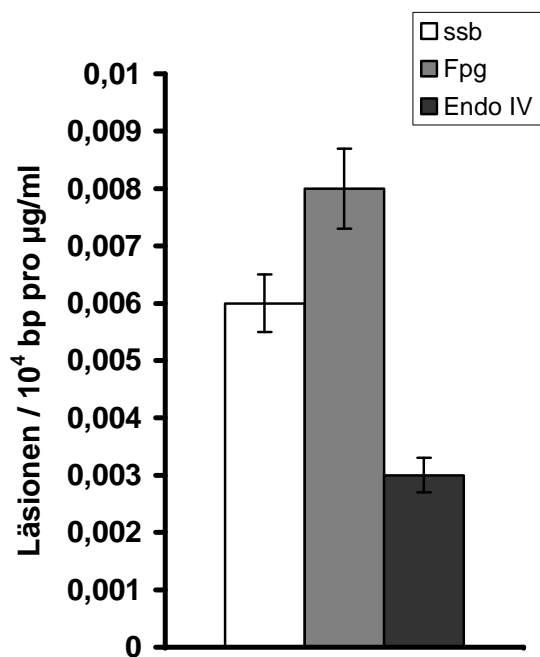
**Abb. 4.43** Induzierte DNA-Schäden durch **Doxycyclin** und Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Lesionen/10<sup>6</sup> bp pro µg/ml Doxycyclin in je einem Schadensprofi für die Bestrahlung in Medium und in PBS/CMF. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.41** und **Abb. 4.42**.

### 4.3.5.2 Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Doxycyclin und Sonnenlicht

Unter zellfreien Bedingungen wurde ausschließlich in Phosphatpuffer bestrahlt (3.2.7.2), so dass es hier zu keinerlei Schwierigkeiten hinsichtlich der Löslichkeit kam. Das Schadensprofil (Abb. 4.45) wird hier ebenfalls dominiert von Fpg-sensitiven oxidativen DNA-Modifikationen, die Induktion von Einzelstrangbrüchen ist bei der Schädigung von zellfreier DNA jedoch relativ hoch. Die Anzahl der AP-Läsionen beträgt etwas mehr als ein Drittel der Menge an oxidativen Purinmodifikationen.



**Abb. 4.44** DNA-Schäden durch **Doxycyclin** und Sonnenlicht in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen s.3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (SSB: n=3-7, Fpg: n=2-3, Endo IV: n=2). [ $1\mu\text{g/ml} \equiv 1,9\mu\text{M}$ ]

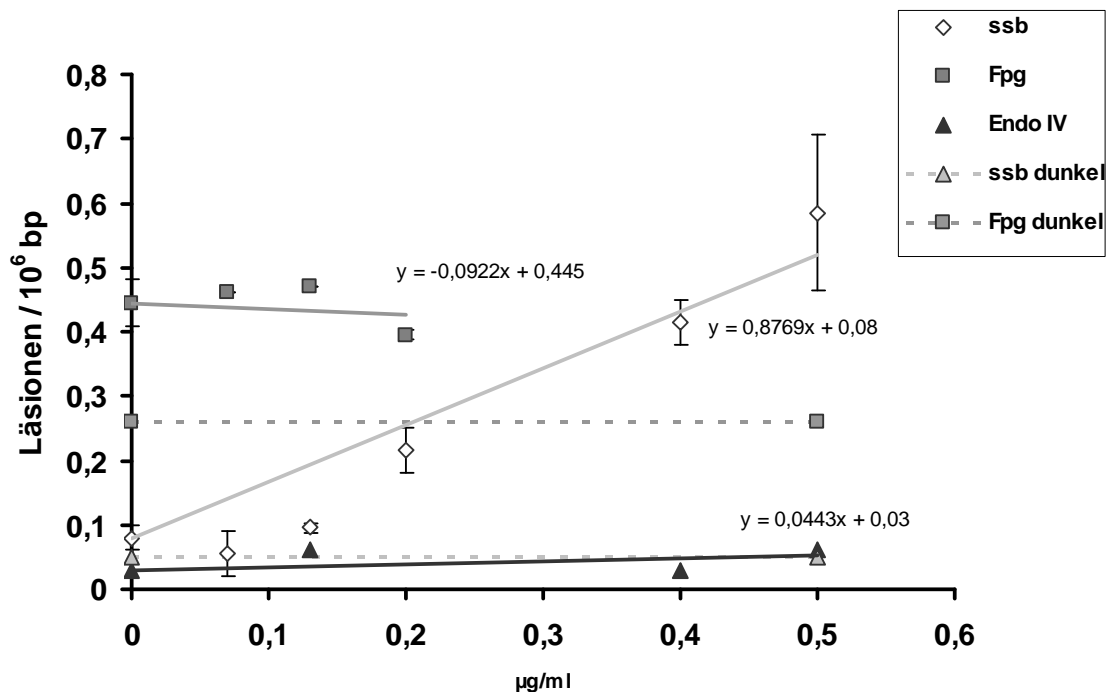


**Abb. 4.45** Induzierte DNA-Schäden durch **Doxycyclin** und Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/10<sup>4</sup> bp pro µg/ml Doxycyclin in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.44**.

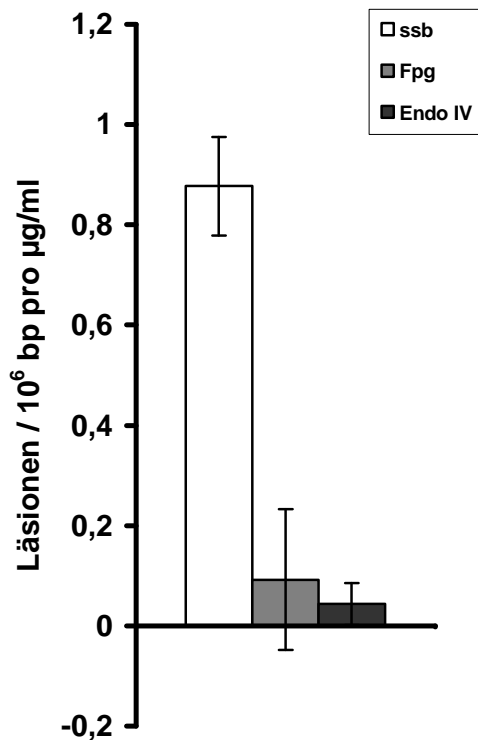
### 4.3.6 Methylenblau

#### 4.3.6.1 Charakterisierung des zellulären DNA-Schadens durch Methylenblau und Sonnenlicht

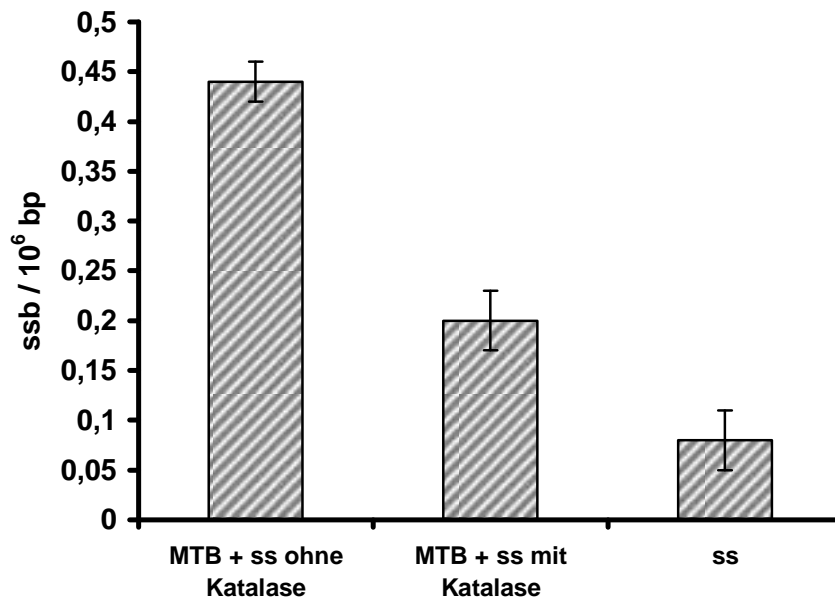
Methylenblau verursacht unter den Behandlungsbedingungen der Ringstudie (siehe 3.2.6.3) in Zellen keine Fpg-sensitiven Läsionen (Abb. 4.46, Abb. 4.47). Es entstehen viele Einzelstrangbrüche und kaum AP-Läsionen. Dieses Schadensspektrum ist wegen den Befunden über MTB in früheren Untersuchungen an zellfreier DNA (siehe auch Diskussion, 5.2.4.1) unerwartet und spricht gegen eine Aufnahme der Substanz in die Zelle. Die sich daraus ergebende Vermutung, dass die Generation der Strangbrüche durch außerhalb der Zelle gebildete reaktive Verbindungen, insbesondere  $\text{H}_2\text{O}_2$ , induziert wird, wurde durch Versuche in Gegenwart von Katalase überprüft. Die in Abb. 4.48 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Induktion von Einzelstrangbrüchen an der zellulären DNA tatsächlich ausschließlich auf eine Schädigung von außen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (respektive Hydroxylradikale) zurückzuführen ist.



**Abb. 4.46** DNA-Schäden durch **Methylenblau** und Sonnenlicht in V79-Zellen, gemessen mit der Alkalischen Elution (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Die Werte auf der Ordinate (0 µg/ml) geben die durch die Bestrahlung allein induzierten Schäden plus Untergrundspiegel wieder (SSB: n=2-3, Fpg: n=2, Endo IV n=1). [1µg/ml  $\equiv$  3,1 µM]



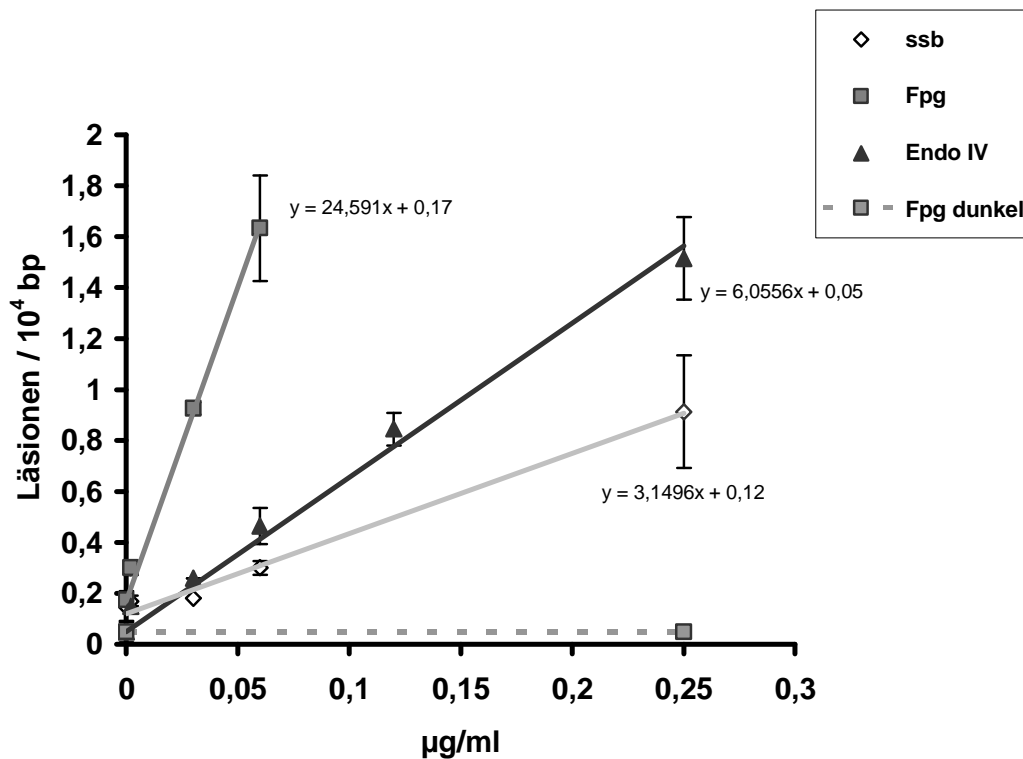
**Abb. 4.47** Induzierte DNA-Schäden durch **Methylenblau** und Sonnenlicht in V79-Zellen. Dargestellt sind Läsionen/ $10^6$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$  Methylenblau in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.46**.



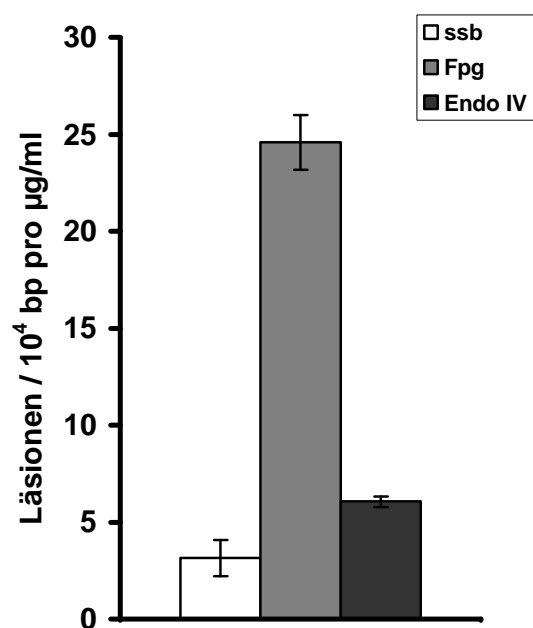
**Abb. 4.48** Nachweis der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Induktion von Einzelstrangbrüchen in Zellen generiert durch photoaktiviertes **Methylenblau (MTB)**. Der Nachweis erfolgte durch Einsatz von  $0,4 \mu\text{g/ml}$  Methylenblau und  $315 \text{ U/ml}$  Katalase. Der SSB-Schaden durch die Bestrahlung mit dem Solarsimulator allein (ss) wurde nicht abgezogen ( $n=2$ ).

### 4.3.6.2 Charakterisierung des zellfreien DNA-Schadens durch Methylenblau und Sonnenlicht

Die Ergebnisse der zellfreien Untersuchungen an PM2-DNA (3.2.7.2) bestätigen die bisher schon bekannten Daten (siehe Diskussion, 5.2.4.1): Hier entstehen sehr große Mengen an Fpg-sensitiven Läsionen und Einzelstrangbrüchen. AP-Läsionen werden in nur geringem Ausmaß induziert (Abb. 4.49, Abb. 4.50).



**Abb. 4.49** DNA-Schäden durch **Methylenblau** und **Sonnenlicht** in PM2-DNA, gemessen mit dem DNA-Relaxationsassay (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). Es wurde die Menge an SSB, Fpg- und Endo IV-sensitiven Läsionen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (SSB: n=2-3, Fpg: n=2-3, Endo IV: n=2-3). [1 µg/ml ≙ 3,1 µM]



**Abb. 4.50** Induzierte DNA-Schäden durch **Methylenblau** und Sonnenlicht in PM2-DNA. Dargestellt sind Läsionen/10<sup>4</sup> bp pro µg/ml Methylenblau in einem Schadensprofil. Die Werte ergeben sich aus den Geradensteigungen in **Abb. 4.49**.

#### **4.4 Einfluss von verschiedenen Zusätzen im PM<sub>2</sub>-Assay auf den zellfreien DNA-Schaden verursacht durch die Photosensibilisatoren und Sonnenlicht**

Um den Schadensmechanismus durch eine Substanz an der DNA genauer zu untersuchen und die bei der Schädigung verantwortlichen reaktiven Sauerstoffspezies zu identifizieren, können bestimmte Zusätze während einer Schädigung zugegeben werden. Diese Zusätze sind in der Lage bestimmte schädigende Mediatoren, generiert durch die zu untersuchende Substanz, in ihrer Wirkung zu hemmen oder zu fördern. Eingesetzt wurden in dieser Arbeit Natriumazid, welches Singulett-Sauerstoff quencht, D<sub>2</sub>O, das die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff erhöht und *tert*-Butanol, ein guter Radikalfänger für Hydroxylradikale. Durch den Einsatz von enzymatischen Antioxidantien wie Katalase und Superoxiddismutase (SOD) lässt sich die Beteiligung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Superoxid feststellen. SOD zersetzt Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Einerseits kommt es also bei der Beteiligung einer solchen Spezies zu einem Quenchen des Schadens durch die SOD, andererseits kann es durch das gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erneut zu einer Schadensanhebung kommen. In **Tab. 4.3** sind die Einflüsse der verschiedenen Zusätze bei der Schädigung von PM<sub>2</sub>-DNA durch Photosensibilisatoren und Sonnenlicht zusammengestellt. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Diskussionsteil dieser Arbeit besprochen.



**Tab. 4.3** Einfluss von verschiedenen Zusätzen auf den zellfreien DNA-Schaden durch Photosensibilisatoren und Sonnenlicht. Die Zahl der Modifikationen ohne Zusatz wird als 100 % angenommen. Signifikante Einfüsse ( $p < 0,006$ ) sind durch Fettdruck kenntlich gemacht.

	SSB (%)						Fpg (%)						Endo III	Endo IV
	CPZ (2 µg/ml)	LOF (4 µg/ml)	CIF (5 µg/ml)	PZ (32 µg/ml)	DXC (45 µg/ml)	MTB (0,3 µg/ml)	CPZ (2 µg/ml)	LOF (4 µg/ml)	CIF (5 µg/ml)	PZ (32 µg/ml)	DXC (45 µg/ml)	MTB (0,3 µg/ml)		
<b>Azid (10µM)</b>	125 ± 13	150 ± 15	103 ± 7	102 ± 8	123 ± 0	<b>48 ± 10</b>	100 ± 20	70 ± 4	93 ± 13	99 ± 5	90 ± 14	<b>30 ± 8</b>		
<b>D<sub>2</sub>O- Puffer</b>	<b>189 ± 26</b>	80 ± 5	-	<b>208 ± 15</b>	105 ± 6	<b>400 ± 67</b>	150 ± 33	136 ± 22	-	<b>226 ± 21</b>	99 ± 14	<b>514 ± 63</b>		
<b>γ-Butanol (5%)</b>	<b>35 ± 6</b>	<b>8 ± 1</b>	<b>7 ± 0</b>	<b>54 ± 5</b>	99 ± 6	106 ± 7	<b>26 ± 8</b>	<b>24 ± 1</b>	<b>28 ± 3</b>	<b>31 ± 6</b>	94 ± 5	90 ± 10		
<b>Katalase (315 U/ml)</b>	117 ± 17	160 ± 17	88 ± 2	100 ± 17	93 ± 5	88 ± 7	95 ± 20	107 ± 0	62 ± 13	103 ± 8	95 ± 2	120 ± 22		
<b>SOD (20µg/ml)</b>	<b>221 ± 31</b>	91 ± 6	<b>32 ± 4</b>	<b>713 ± 74</b>	82 ± 9	116 ± 17	105 ± 16	86 ± 7	<b>29 ± 5</b>	<b>385 ± 77</b>	<b>373 ± 74</b>	125 ± 22	92 ± 23	<b>210 ± 57</b>
<b>SOD (20µg/ml) + Katalase (315 U/ml)</b>				<b>682 ± 65</b>						138 ± 28			71 ± 1	96 ± 3

## **4.5 Nachweis der Photogenotoxizität mit Hilfe des Comet Assays und des Mikrokerntests (Ringstudie)**

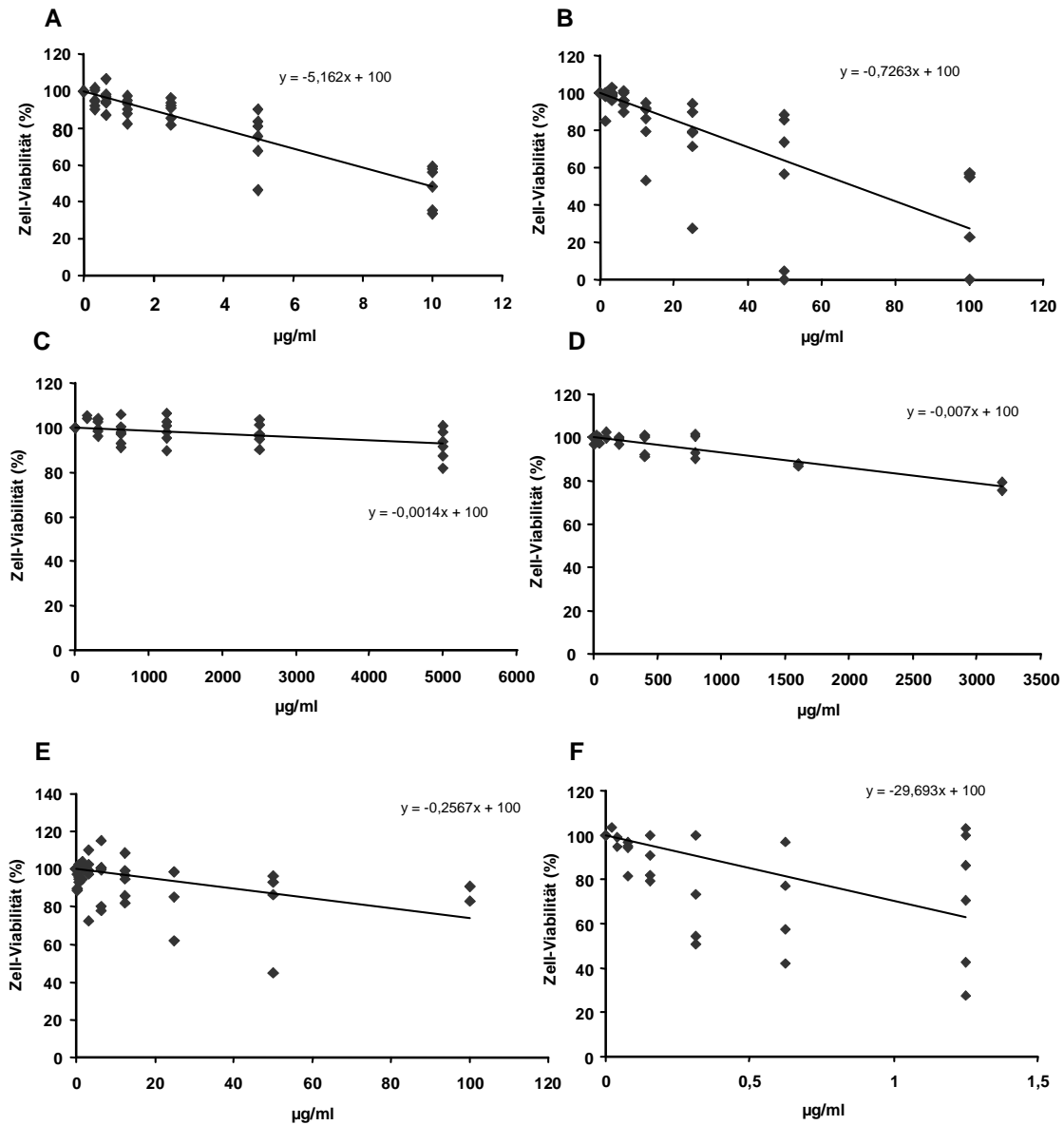
In den folgenden Kapiteln werden Versuchsergebnisse der an der Ringstudie teilnehmenden Laboratorien zusammengestellt. Gezeigt werden die gemittelten Daten der in dieser Arbeit näher untersuchten sechs Photosensibilisatoren. Diese sollen mit den bisher vorgestellten Daten korreliert werden (siehe **4.6**).

### **4.5.1 Untersuchungen zur Cytotoxizität photoaktivierter Photosensibilisatoren (Trypanblaufärbung)**

Die toxische Auswirkung der Substanzen der Ringstudie plus Sonnenlicht auf V79-Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblau-Tests nachgewiesen (siehe **3.2.4.4**). Die Behandlungsbedingungen richteten sich nach dem Comet Assay (siehe **3.2.2.2**), da die geschädigten Zellen aus dem Comet-Versuch zum Testen der Toxizität entnommen wurden. In **Abb. 4.51** sind die Ergebnisse für die sechs Photosensibilisatoren dieser Arbeit gezeigt. Zur Ermittlung eines Wertes für die jeweilige Toxizität wurden die Daten aller Laboratorien, die diese Substanzen getestet haben, in einem Diagramm dargestellt und eine Ausgleichsgerade errechnet. Dargestellt ist die Anzahl an lebenden Zellen nach der Schädigung in Bezug auf die Anzahl lebender Zellen ohne Schädigung (Kontrollwert).

Alle Substanzen wirken toxisch, wobei die Reduktion der lebenden Zellen bei der Behandlung mit Methylenblau (**Abb. 4.51**) am stärksten ist. Bei der Auswertung der Ergebnisse von Methylenblau fiel auf, dass es in einem Labor möglich war, diesen Photosensibilisator bis zu einer Konzentration von 40 µg/ml zu testen. Würden diese Ergebnisse hier berücksichtigt, so würde die Toxizität sehr gering ausfallen. Da in diesem Konzentrationsbereich jedoch keine weiteren Daten anderer Teilnehmer vorliegen, wurde die Mittelung der Einzelwerte nur bis zu einer Konzentration von 1,25 µg/ml vorgenommen. Eine solche Unstimmigkeit der Testergebnisse deutet auf eine hohe Empfindlichkeit der Substanz hin, bei deren Untersuchung streng auf Lichtausschluss vor der Schädigung geachtet werden sollte. Eine toxische Wirkung auf die Zelle durch die bereits erläuterten, außerhalb der Zelle ablaufenden Mechanismen steht zur Diskussion (siehe **Abb. 4.48**).

Die beiden Fluorochinolone zeigen nur geringe Toxizität auf die Zellen (**Abb. 4.51**). Die toxische Wirkung des Doxycyclins ist ebenfalls relativ gering, vermutlich wegen der Präzipitation der Substanz in Behandlungsmedium (Calcium- und Magnesium-haltiges Zellkulturmedium ohne Phenolrot) während der Schädigung (siehe auch **Abb. 4.42**).



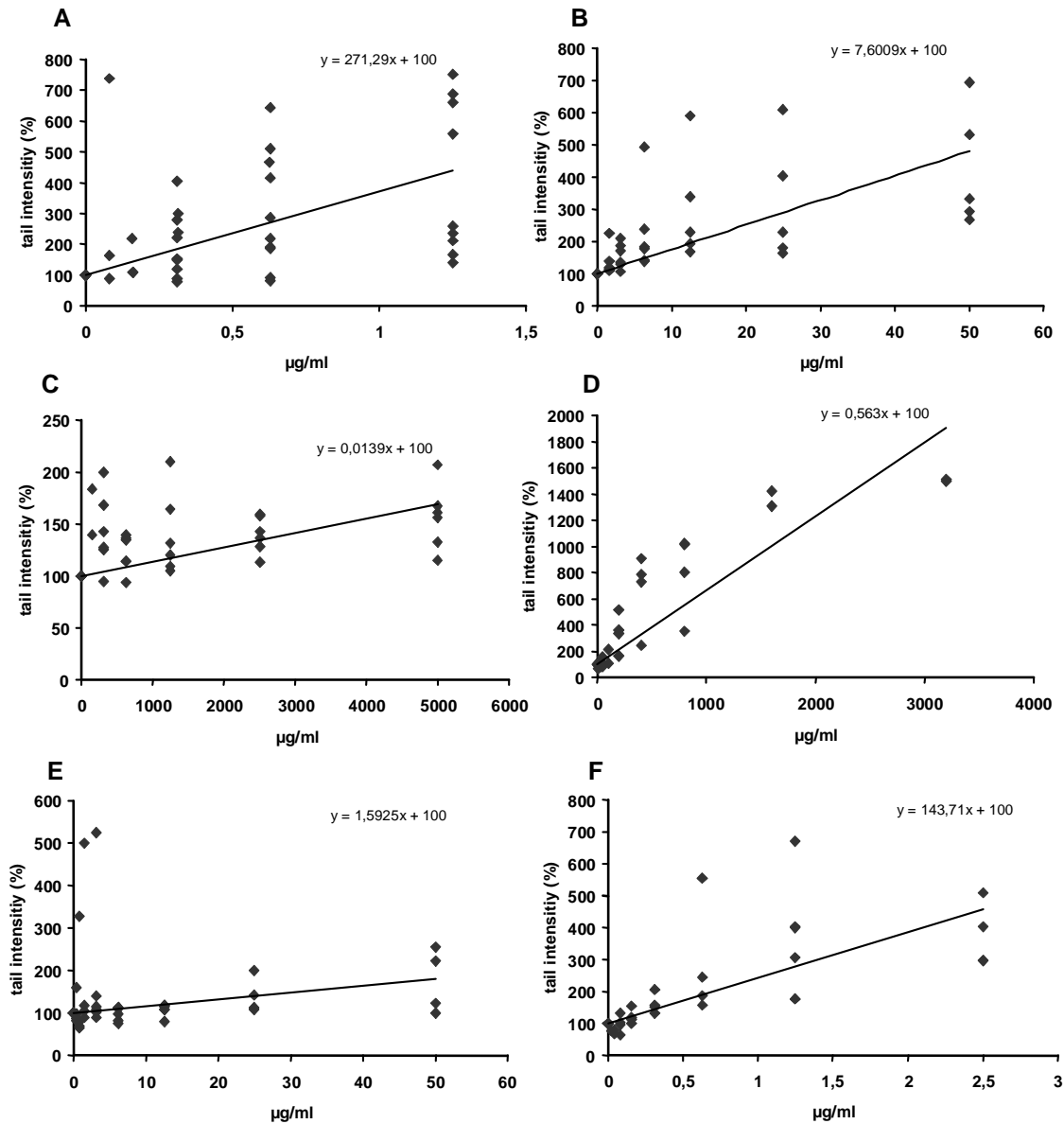
**Abb. 4.51** Toxizität (Trypanblaufärbung) von Photosensibilisatoren und Bestrahlung mit dem Solarsimulator in V79-Zellen (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2, Comet Assay). Gezeigt ist die Anzahl der vitalen Zellen relativ zum Kontrollwert ohne Schädigung. (A) **Chlorpromazin** (Daten von Uni-Mainz, Bfarm, Bayer); (B) **Promazin** (Daten von Cosmital, Novartis, RCC); (C) **Lomefloxacin** (Daten von Cosmital, Novartis, Bayer); (D) **Ciprofloxacin** (Daten von Cosmital, Bfarm); (E) **Doxycyclin** (Daten von Cosmital, Bayer, RCC); (F) **Methylenblau** (Daten von Cosmital, Bfarm, RCC).

#### **4.5.2 Kometenbildung bei V79-Zellen nach Behandlung mit Photosensibilisatoren und Sonnenlicht**

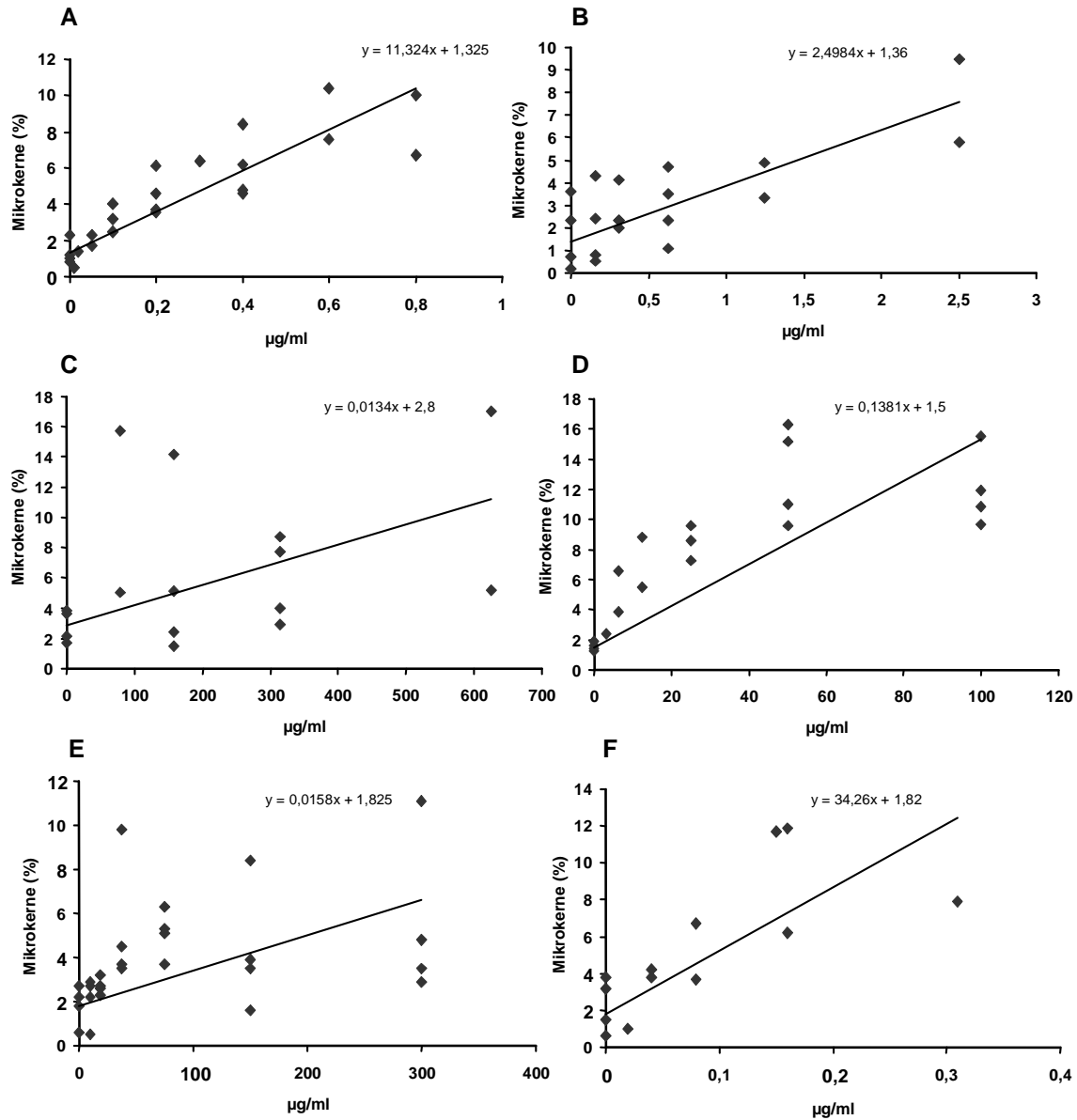
Im Comet Assay wurden die Untersuchungssubstanzen plus Sonnenlicht hinsichtlich der DNA-Strangbruchrate in V79-Zellen untersucht (siehe 3.2.4). In **Abb. 4.52** sind die Ergebnisse in Form der Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes (*tail intensity*, TI) gezeigt.

#### **4.5.3 Mikrokerne in V79-Zellen nach Behandlung mit Photosensibilisatoren und Sonnenlicht**

Zur Ermittlung der Mikrokerndaten der in dieser Arbeit untersuchten Photosensibilisatoren, wurden die Ergebnisse aus zwei Laboratorien gemittelt, die alle sechs Substanzen untersuchten. Dies sind die Daten von Bfarm und Bayer, welche in **Abb. 4.53** dargestellt sind. Für die Messwerte wurde jeweils eine Ausgleichsgerade berechnet. In allen Abbildungen ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg dieser Geraden erkennbar.



**Abb. 4.52** Induktion von DNA-Strangbrüchen in V79 Zellen durch Photosensibilisatoren und Bestrahlung mit dem Solarsimulator (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2) gemessen mit dem Comet Assay als *tail intensity*. Angegeben sind die Werte in Bezug auf das Ergebnis in ungeschädigten Zellen (bestrahlt, ohne Substanz). (A) **Chlorpromazin** (Daten von Uni Mainz, Novartis, Bayer, Bfarm, RCC); (B) **Promazin** (Daten von Cosmital, Novartis, RCC); (C) **Lomefloxacin** (Daten von Cosmital, Novartis, Bayer); (D) **Ciprofloxacin** (Daten von Bfarm, Cosmital); (E) **Doxycyclin** (Daten von Bayer, Cosmital, RCC); (F) **Methylenblau** (Daten von Bfarm, Cosmital, RCC).



**Abb. 4.53** Induktion von Mikrokernen in V79-Zellen durch Photosensibilisatorne und Bestrahlung mit dem Solarsimulator (Bestrahlungsbedingungen siehe 3.2.2.2). (A) **Chlorpromazin**; (B) **Promazin**; (C) **Lomefloxacin**; (D) **Ciprofloxacin**; (E) **Doxycyclin**; (F) **Methylenblau**.

#### 4.6 Korrelationen der Ergebnisse von Comet Assay, Mikrokerntest und Cytotoxizitätstest mit Art und Ausmaß der DNA-Schädigung

In **Tab. 4.4** sind die pro Konzentrationseinheit von den verschiedenen Photosensibilisatoren induzierten DNA-Schäden mit Mikrokernen und Cytotoxizität zusammengestellt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Generierung von Mikrokernen bzw. Toxizität und den DNA-Schäden zu erkennen, sind die jeweilige Korrelationen im folgenden graphisch dargestellt.

**Tab. 4.4** Zahl der pro Konzentrationseinheit induzierten zellulären DNA-Modifikationen, Mikrokern, *tail intensity* (Comet Assay) und Zellviabilität (Viab) für die verschiedenen Testsubstanzen. Zu beachten ist die Angabe der Läsionen/ $10^8$  bp pro  $\mu\text{g/ml}$ .

	SSB / $10^8$ bp pro $\mu\text{g/ml}$	Fpg / $10^8$ bp pro $\mu\text{g/ml}$	Endo IV / $10^8$ bp pro $\mu\text{g/ml}$	Endo III / $10^8$ bp pro $\mu\text{g/ml}$	MN (%) pro ( $\mu\text{g/ml}$ )	TI (%) pro ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viab (%) pro ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>CPZ</b>	124 $\pm$ 9	-66 $\pm$ 20	2,6 $\pm$ 1,5	nicht best.	11,3 $\pm$ 1,1	271,29 $\pm$ 58,04	5,16
<b>PZ</b>	1,7 $\pm$ 0,2	0,14 $\pm$ 0,28	1,2 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,4	7,60 $\pm$ 1,24	0,73
<b>LOF</b>	1,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,3	-0,03 $\pm$ 0,12	nicht best.	0,010 $\pm$ 0,006	0,014 $\pm$ 0,002	0,0014
<b>CIF</b>	0,60 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,15	0,15 $\pm$ 0,03	nicht best.	0,14 $\pm$ 0,02	0,563 $\pm$ 0,054	0,007
<b>DXC *1)</b>	5,5 $\pm$ 0,7	20,2 $\pm$ 4,5	0,45 $\pm$ 0,2	nicht best.	nicht best.	nicht best.	nicht best.
<b>DXC *2)</b>	1,4 $\pm$ 0,2	0,29 $\pm$ 0,69	0,09 $\pm$ 0,17	nicht best.	0,020 $\pm$ 0,004	1,59 $\pm$ 1,01	0,257
<b>MTB</b>	87 $\pm$ 10	9 $\pm$ 14	4,4 $\pm$ 4,2	nicht best.	34 $\pm$ 9	143,71 $\pm$ 23,4	29,69

\*1) DXC in Phosphatpuffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$

\*2) DXC in  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -haltigem Medium

#### **4.6.1 Korrelation der Ergebnisse des Comet Assays mit dem Ausmaß der DNA-Schäden**

Die Ergebnisse der zellulären DNA-Schadensanalyse mittels Alkalischer Elution wurden mit denen des Comet Assays in der "Ringstudie" verglichen (siehe **Tab. 4.4**, **Abb. 4.54**). Aus den Messparametern des Comet Assays wurde die *tail intensity* (TI) ausgewählt. Es ist jedoch anzumerken, dass der Anteil an UVB während der Bestrahlung der Zellen unter den Bedingungen des Comet Assays fast doppelt so hoch ist, wie unter den Bedingungen der Alkalischen Elution und des Mikrokerntests (siehe **3.2.2.2**). Der Anteil an UVA-Strahlung ist in beiden Fällen gleich groß. Die graphische Darstellung verdeutlicht, dass sich Einzelstrangbrüche sowie AP-Läsionen gut mit der tail intensity korrelieren lassen.

#### **4.6.2 Korrelation der Ergebnisse des Mikrokerntests mit Art und Ausmaß der DNA-Schäden**

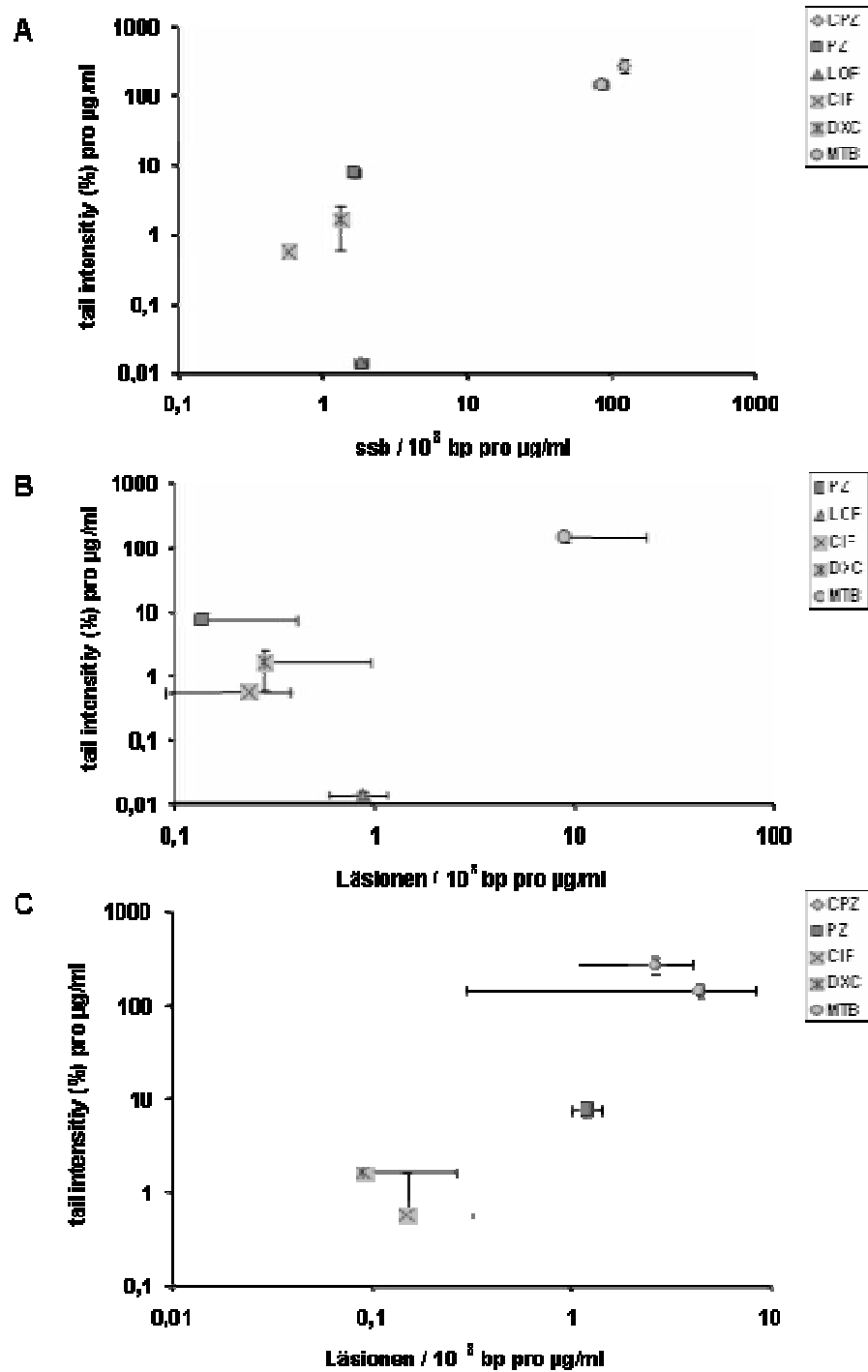
In analoger Weise wie für den Comet Assay wurden in **Abb. 4.55** die Ergebnisse der zellulären DNA-Schadensanalyse mit den Daten des Mikrokerntests korreliert (siehe **Tab. 4.4**), um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Induktion einer speziellen DNA-Modifikation und der Ausbildung von Mikrokernen feststellen zu können. Die Daten des Mikrokerntests stammen hier von Bayer und Bfarm, da diese Labors alle in dieser Arbeit untersuchten Testsubstanzen vermessen haben. So sollte der Einfluss systematischer Fehler durch unterschiedliche Auswertetechniken in den Labors möglichst gering gehalten werden. Die beste Korrelation liefert die Gegenüberstellung von Mikrokernen mit den AP-Läsionen. Eine weniger gute Korrelation findet man bei den Strangbrüchen und im Falle der Fpg-sensitiven Läsionen fehlt der Zusammenhang mit den Mikrokernen völlig.

#### **4.6.3 Korrelation Phototoxizität mit Photogenotoxizität**

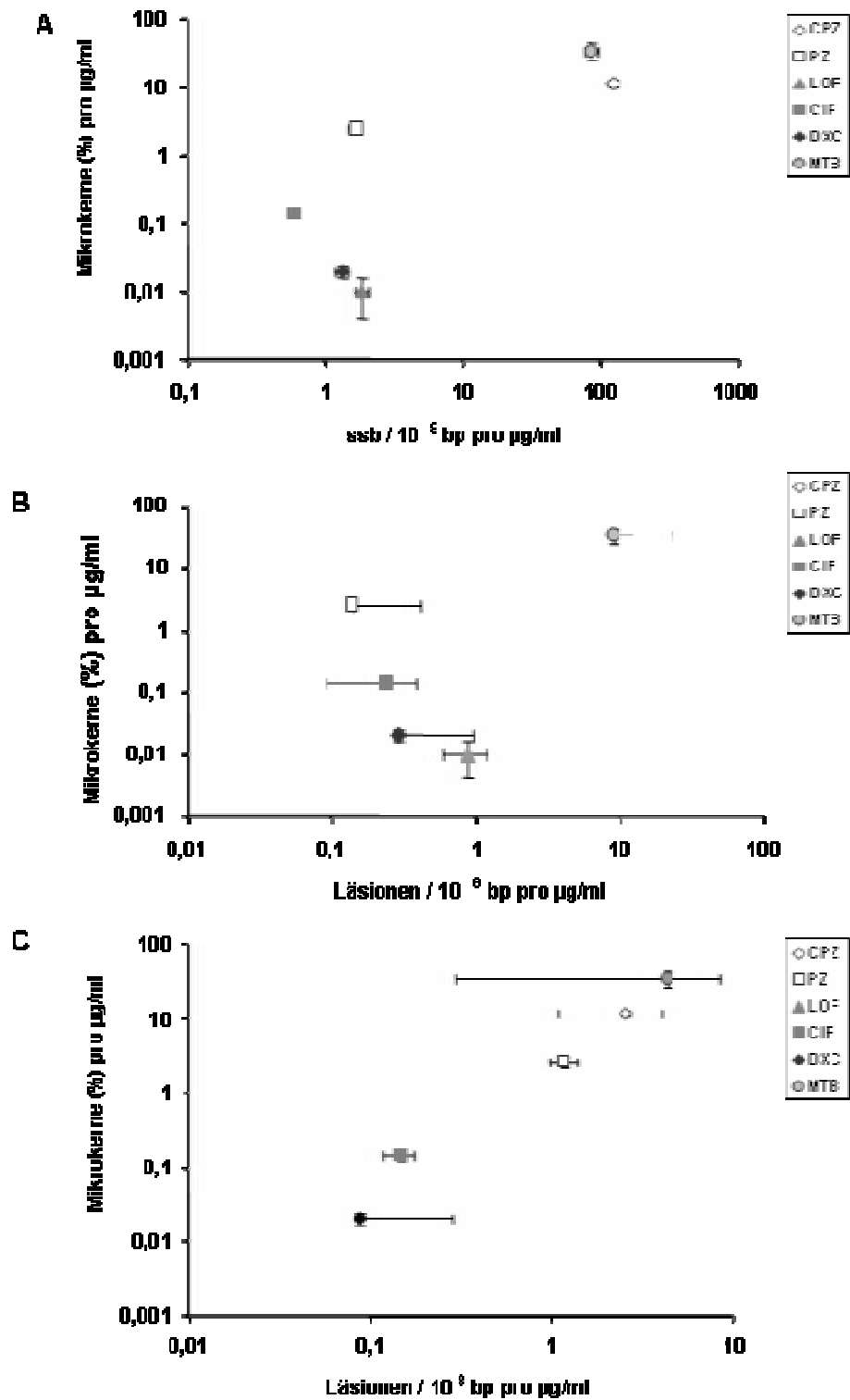
In **Abb. 4.56** sind schließlich die Ergebnisse der Alkalischen Elution mit Daten der Prüfungen auf Phototoxizität (Trypanblautest) korreliert (siehe **Tab. 4.4**). Untersucht wurde, ob die Phototoxizität eines Photosensibilisators mit der Photogenotoxizität zusammenhängt. Die Zellen für den Phototoxizitätstest wurden dem jeweiligen Comet-Assay-Experiment entnommen wurden. Der Anteil an UVB während der Bestrahlung der Zellen unter den Bedingungen des Comet Assays ist fast doppelt so hoch, wie unter den Bedingungen der Alkalischen Elution (siehe **3.2.2.2**). Der Anteil an UVA-Strahlung ist in beiden Fällen gleich groß.

Die Gegenüberstellungen zeigen, dass die Induktion von Fpg-sensitiven Modifikationen in der DNA mit der höchsten Zelltoxizität verbunden ist.

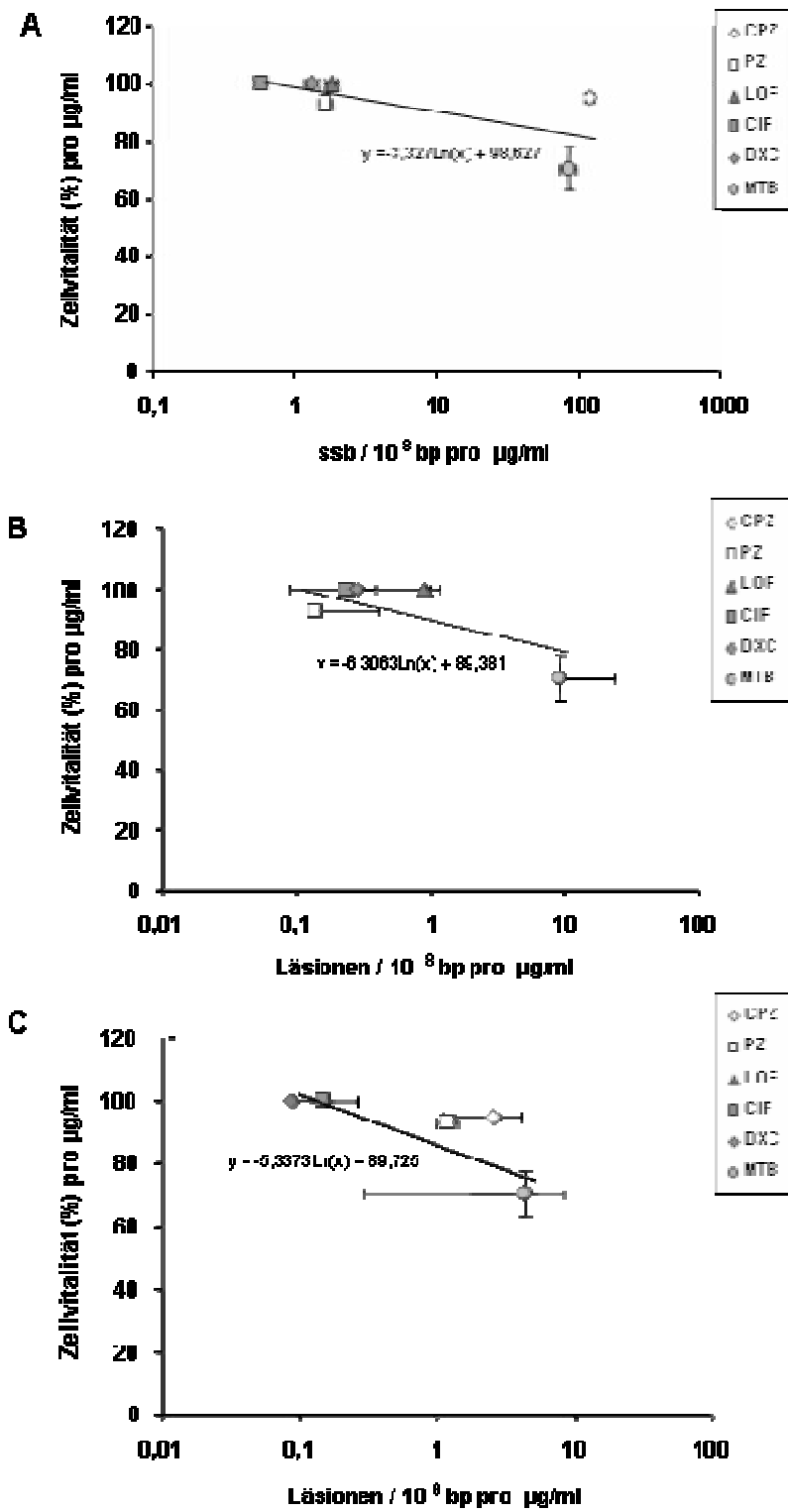




**Abb. 4.54** Zusammenhang zwischen Anzahl der Läsionen in der DNA (Alkalische Elution) und der tail intensity (TI; Comet Assay) pro  $\mu\text{g/ml}$  Substanz (logarithmischer Maßstab). (A) **SSB**/TI; (B) **Fpg**-sensitive Läsionen/TI (Wert für CPZ nicht darstellbar); (C) **Endo IV**-sensitive Läsionen/TI (Wert für LCF nicht darstellbar).



**Abb. 4.55** Korrelation von Daten der Alkalischen Elution und des Mikrokerntests. Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen Anzahl der DNA-Läsionen und Mikrokerne pro  $\mu\text{g/ml}$  Substanz (logarithmischer Maßstab). (A) **SSB**/Mikrokerne; (B) **Fpg**-sensitive Läsionen/Mikrokerne (Wert für CPZ nicht darstellbar); (C) **Endo IV**-sensitive Läsionen/ Mikrokerne (Wert für LOF nicht darstellbar).



**Abb. 4.56** Zusammenhang zwischen Anzahl der Einzelstrangbrüche und Zellvitalität pro µg/ml Substanz. (halblogarithmische Darstellung). (A) **SSB**/Zellvitalität; (B) **Fpg**-sensitive Läsionen/Zellvitalität (Wert für CPZ nicht darstellbar); (C) **Endo IV**-sensitive Läsionen/ Zellvitalität (Wert für LOF nicht darstellbar).

## 5 Diskussion

### ***5.1 Hintergrundspiegel von DNA-Schäden und Schäden durch Sonnenlicht allein in V79-Zellen***

Wie in **Abb. 4.1** gezeigt, sind in V79-Zellen im ungeschädigten Zustand vor allem Fpg-sensitive Läsionen vorhanden (ca. 0,26 Läsionen/10<sup>6</sup> bp). Diese Schäden wurden in früheren Arbeiten beispielsweise in AS 52-Zellen (Ovarienzellen des chinesischen Hamsters) (Mahler, 1999) in etwa gleichem Ausmaß (0,24 Läsionen/10<sup>6</sup> bp) nachgewiesen. Das sehr geringe Ausmaß an Einzelstrangbrüchen, Endo IV- und T4 Endo V-sensitiven Läsionen ist ebenfalls in beiden Zellarten des chinesischen Hamsters vorhanden. Auch ungeschädigte Lymphocyten und andere Säugerzellen besitzen hauptsächlich Fpg-sensitive Läsionen in der DNA (Pflaum et al., 1997; Pflaum et al., 1998).

Das künstlich erzeugte Sonnenlicht verursacht in V79-Zellen neben vielen Pyrimidindimeren auch oxidative Basenmodifikationen. Diese sind überwiegend Fpg-sensitive Purinmodifikationen (u.a. 8-oxoG) (**Abb. 4.2**). Hier zu erwähnen ist, dass diese Modifikationen nicht durch den UV-Anteil induziert werden, sondern, wie Untersuchungen mit Kantenfiltern zeigen, ganz überwiegend durch längerwellige Strahlung (> 400 nm) (Daten hier nicht gezeigt). Dies ist im Einklang mit eigenen früheren Untersuchungen, nach denen die Anregung eines endogenen Chromophors der Zellen für diese oxidative Basenmodifikationen verantwortlich ist (Pflaum et al., 1994).

Werden die Zellen in D<sub>2</sub>O statt in Behandlungsmedium bestrahlt, so steigt der Fpg-sensitive Schaden deutlich an (**Abb. 4.4**). D<sub>2</sub>O verlängert die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff, was bei dessen Anwesenheit zu einem erhöhten oxidativen DNA-Schaden führt. Die Bestrahlung mit Sonnenlicht induziert demnach in V79-Zellen Singulett-Sauerstoff, welcher mindestens zum Teil für die oxidativen DNA-Schäden verantwortlich ist.

## **5.2 DNA-Schäden durch Photosensibilisatoren**

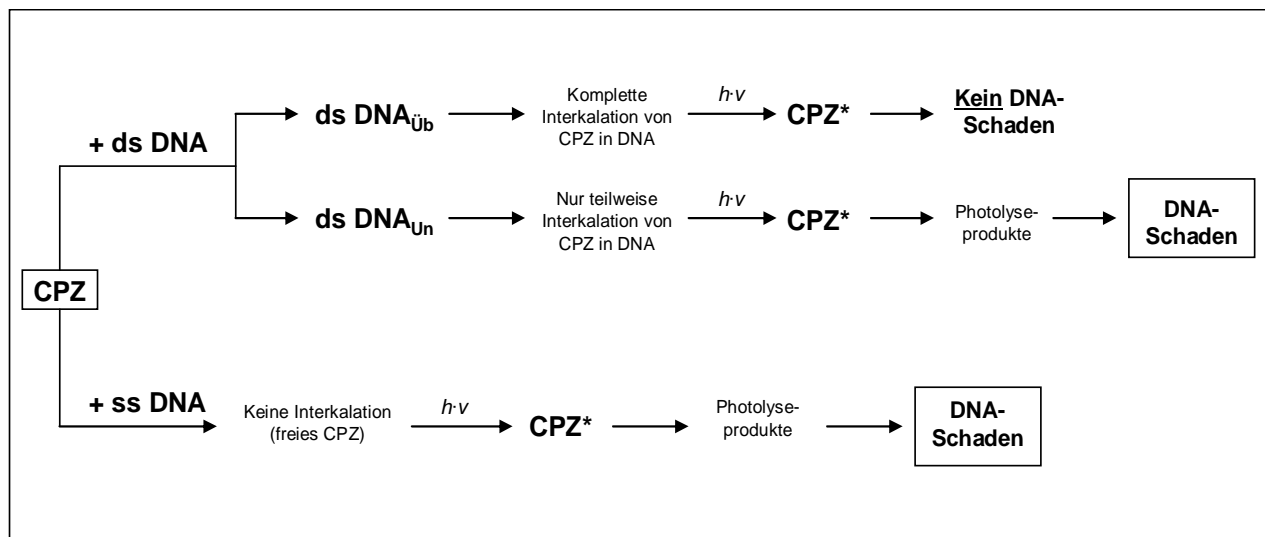
### **5.2.1 Phenothiazine: Chlorpromazin, Promazin, Chlorpromazin-sulfoxid, 2-Hydroxypromazin**

#### **5.2.1.1 DNA-Schädigung durch Chlorpromazin**

Durch die Schädigung zellfreier DNA mit Chlorpromazin (CPZ) plus Sonnenlicht, entstehen vor allem Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen (**Abb. 4.20**). Endonuklease III und -IV-sensitive Schäden entstehen im etwa gleich geringeren Ausmaß. Die Dominanz von SSB im Schadensprofil von CPZ ist überraschend, da im Falle vieler anderer (sowohl Typ-I als auch Typ-II) Photosensibilisatoren (wie z.B. Riboflavin und Rose Bengal) die oxidativen Basenmodifikationen überwiegen und Einzelstrangbrüche nur in sehr geringem Maß auftreten (Epe et al., 1993; Epe et al., 1993a). Die Entstehung von SSB durch angeregtes CPZ, in einem für einen Photosensibilisator unüblich hohen Ausmaß, wurde in anderen Studien ebenfalls gezeigt (Day and Dimattina, 1977; Fujita et al., 1981; Decuyper et al., 1984; Piette, 1987; Fujita and Matsuo, 1988). In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von oxidativen Purinmodifikationen, da die Endonuklease IV einen weitaus geringeren Schaden erkennt als Fpg (siehe **Tab. 4.1**). Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Schädigung der DNA mit CPZ plus Bestrahlung mit dem Solarsimulator eine Alkylierung der DNA verursacht, welche durch Erhitzen beschleunigt hydrolysiert und als thermolabile Läsionen in Form von AP-Läsionen und SSB detektiert werden können (**Abb. 4.25**). Dies ist im Einklang mit der, in der Literatur beschriebenen, Entstehung von DNA-Addukten (Kahn and Davies, 1970; Grant and Greene, 1972; Rosenthal et al., 1978; Decuyper et al., 1984). In anderen Studien konnten Guanin-Phenothiazin-Addukte nachgewiesen werden (Fujita et al., 1981a; Piette, 1987). Diese sind durch Fluoreszenz nachweisbar und entstehen durch die Chlor-Abspaltung von CPZ und anschließende Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C-2 des Phenothiazinrings und dem C-8 des Purinringes von GMP (Ciulla et al., 1986).

Die Abhängigkeit des Schadensausmaßes von der Substanzkonzentration weist eine Besonderheit auf: entgegen dem erwarteten linearen Anstieg der Kurven, zeigt sich hier ein „hockey-stick“-artiger Verlauf (**Abb. 4.19**). Es scheint, als ob die Schädigung erst ab einer bestimmten Konzentration (stöchiometrisches Verhältnis 1:1 zur DNA) von CPZ stattfinden kann. Erklärt werden kann dies durch die in der Literatur beschriebene Interkalation von CPZ in zellfreie DNA. Wird CPZ in Gegenwart einer hohen Konzentration zellfreier, doppelsträngiger DNA bestrahlt, so beobachtet man eine geringere Photolyse des CPZ als bei der Bestrahlung mit wenig oder ohne DNA. Das CPZ-Molekül wird offensichtlich durch Interkalation in die DNA vor der Photolyse geschützt (Kochevar et al., 1984). Interkaliertes CPZ ist deshalb auch nicht fähig, Photoaddukte mit der DNA zu bilden (Kochevar et al.,

1998). Dazu passt die Beobachtung, dass CPZ mit einzelsträngiger DNA mehr Addukte bildet als mit doppelsträngiger (Kahn and Davies, 1970; Grant and Greene, 1972; Rosenthal et al., 1978; Decuyper et al., 1984). Der Kurvenverlauf bei der Untersuchung des zellfreien DNA-Schadens durch photoaktiviertes CPZ beweist somit, dass die Bildung von SSB und oxidativen Basenmodifikationen eine Photolyse voraussetzt und deshalb nur beobachtet wird, wenn freies (nicht in die DNA interkaliertes) CPZ vorliegt. Dies ist der Fall, sobald CPZ stöchiometrisch im Überschuss zur DNA vorliegt (hier ab ca. 2 µg/ml CPZ). Die oxidativen Schäden entstehen also nicht durch direkte Reaktion des angeregten CPZ mit der DNA oder Sauerstoff (Typ-I- oder Typ-II-Reaktion). Unklar bleibt, warum die Photolyse des CPZ durch die Interkalation verhindert wird. Zur besseren Übersicht sind die genannten Befunde in **Abb. 5.1** zusammengefasst.



**Abb. 5.1** Reaktionen von Clorpromazin mit zellfreier DNA (dsDNA=doppelsträngige DNA; ssDNA=einzelsträngige DNA; Üb=Überschuss; Un=Unterschuss).

Die Untersuchung der zellfreien DNA-Schäden mit vorbestrahltem CPZ (**Abb. 4.21**) ergab, dass die Photolyseprodukte unter Bestrahlung nur wenige Fpg-sensitive DNA-Modifikationen und SSB induzieren. Dies passt zu Untersuchungen mit Bakterien (*E.coli*) und zerstrahltem CPZ, nach denen das Gemisch der Photoprodukte keine toxische Wirkung zeigt (Rosenthal et al., 1978). Auch die Wachstumshemmung in Säugerzellen ist nicht auf die Photoprodukte zurückzuführen (Ljunggren et al., 1980). Andererseits aber gelingt die photosensibilisierte Hämolyse von roten Blutzellen außer mit CPZ und Licht auch mit vorbestrahltem CPZ (Johnson, 1974; Kochevar and Lamola, 1979). Interessanterweise besitzt vorbestrahltes CPZ eine toxische Wirkung auf Makrophagen (Johnson, 1974) und dessen Injektion verursacht bei Schweinen phototoxische Hautreaktionen (Ljunggren, 1977). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass vorbestrahltes CPZ kovalente Addukte (Chung and Kochevar, 1979) mit der DNA bildet. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von Schoonderwoerd, der explizit CPZSO untersuchte (Schoonderwoerd et al., 1988). Die widersprüchlichen Daten in Bezug auf die Genotoxizität von vorbestrahltem CPZ resultieren aus der Verwendung uneinheitlicher Gemische von Photoprodukten (auf Grund unterschiedlicher Bestrahlungsbedingungen) in den Studien oder aus der unterschiedlichen Beschaffenheit von Membranen der verwendeten Test-Zellen. Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bestrahlungsbedingungen entstehen stabile Zersetzungsprodukte, die nicht verantwortlich sind für den unter Sonnenlichteinfluss beobachteten Schaden durch CPZ an zellfreier DNA. Zu beachten ist aber, dass bei der Vorbestrahlung des CPZ in dem hier diskutierten Versuch nur eine sehr geringe Menge der Photoprodukte generiert wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte nämlich auch gezeigt werden, dass der Einsatz größerer Mengen an CPZSO und 2HPZ eine deutliche DNA-Schädigung verursacht (**Abb. 4.22** und **Abb. 4.23**).

Zur Untersuchung der Schädigungsmechanismen wurden Versuche mit PM2-DNA unter Zusatz von verschiedenen Reagenzien durchgeführt (**Tab. 4.2**). Im Fall von CPZ ist eine Senkung der Anzahl an SSB und Fpg-sensitiven Läsionen bei der Zugabe von *tert*-Butanol zu erkennen. Dies ist ein Beweis für die Beteiligung von sehr reaktiven Radikalen. Durch Zugabe von SOD konnte eine geringe Erhöhung der Menge an SSB beobachtet werden, was für die Anwesenheit von wenig Superoxid (im Vergleich zu Promazin siehe **Abb. 5.3**) während der Schädigung spricht. Über Superoxid könnten z.B. Hydroxylradikale entstehen, die die DNA schädigen, was mit Ergebnissen von Decuyper an zellfreier DNA im Einklang ist (Decuyper et al., 1984). Es könnten jedoch durch *tert*-Butanol auch andere Radikale abgefangen werden, die direkt an der Schädigung beteiligt sind (siehe auch **Abb. 5.2**). Die Schädigung der DNA mit photoaktiviertem CPZ in D<sub>2</sub>O zeigt einen mäßig erhöhten Schaden, was für eine nur geringe Beteiligung von Singulett-Sauerstoff am DNA-Schaden spricht. Der Befund konnte durch den Einsatz von Natriumazid als Quencher von Singulett-Sauerstoff bestätigt werden, da es hier zu keiner Erniedrigung des Schadensausmaßes kam. Untersuchungsergebnisse über die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an der DNA-Schädigung finden sich auch in der Literatur. In ethanolischer Lösung, D<sub>2</sub>O und mit Hilfe von Histidin und Betacarotin (beiden letzten als Quencher von Singulett-Sauerstoff) konnte kein

Singulett-Sauerstoff nachgewiesen werden (Nilsson et al., 1975; Moore, 1977; Decuyper et al., 1983; Chignell et al., 1985), während in anderen Studien die Entstehung von Singulett-Sauerstoff während der Bestrahlung von Phenothiazinen in schwachem Ausmaß chemisch nachgewiesen werden konnte (Davies et al., 1976; Moore, 1977). Es sei angemerkt, dass es sich hierbei um Versuche ohne DNA handelt und nur die Bestrahlung der Substanz alleine untersucht wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen auf einen Schadensmechanismus von CPZ schließen, der in **Abb. 5.2** dargestellt ist. Die Schädigung der DNA erfolgt bei CPZ danach vor allem über radikalische Photolyseprodukte. Die Beteiligung von nur wenig Superoxid am Schadensmechanismus, die Fähigkeit zur Alkylierung der DNA (vermutlich über Promazinylradikale) sowie der Tatsache, dass kaum AP-Läsionen und Dihydropyromidine entstehen, spricht für die Dechlorination der Substanz unter Sonnenlichtbestrahlung (Weg 2) als Hauptschädigungsmechanismus. Die Radikalkation (Weg 1) trägt wahrscheinlich nur in sehr geringem Ausmaß zur Schädigung der DNA im Falle des CPZ bei.

Auch für die Schädigung zellulärer DNA durch CPZ und Licht (**Abb. 4.5**) konnte gezeigt werden, dass sich hier (wie im zellfreien Versuch) konzentrationsabhängig eine hohe Anzahl an Einzelstrangbrüchen ausbildet. AP-Läsionen entstehen in sehr geringem Ausmaß. Beides stützt den oben vermuteten Schadensmechanismus.

Ungewöhnlich ist jedoch die Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von Fpg-sensitiven Läsionen. Entgegen der Erwartung eines linearen Anstiegs dieser Schäden (wie zellfrei beobachtet), sinkt der Spiegel auf die Höhe des Hintergrundschadens (ohne Bestrahlung, ohne CPZ) ab. Die durch den Solarsimulator alleine verursachten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen werden also durch den Einfluss des photoaktivierten CPZ verhindert. Im Gegensatz zur Schädigung zellfreier DNA entstehen hier keine AP-Läsionen, woraus sich schließlich das Schadensprofil in **Abb. 4.6** ergibt. Es stellte sich hier die Frage, ob CPZ eine Radikalfängereigenschaft besitzt. Hinweise dazu existieren in der Literatur. Für unbestrahltes CPZ wurde eine Radikalfängereigenschaft für Hydroxylradikale und hypochlorige Säure gefunden, jedoch nicht für Superoxidradikale (Jeding et al., 1995). Eine andere Studie bestätigt dies, fand jedoch auch eine gewisse Radikalfängereigenschaft für Superoxidradikale (Hadjimitova et al., 2002).

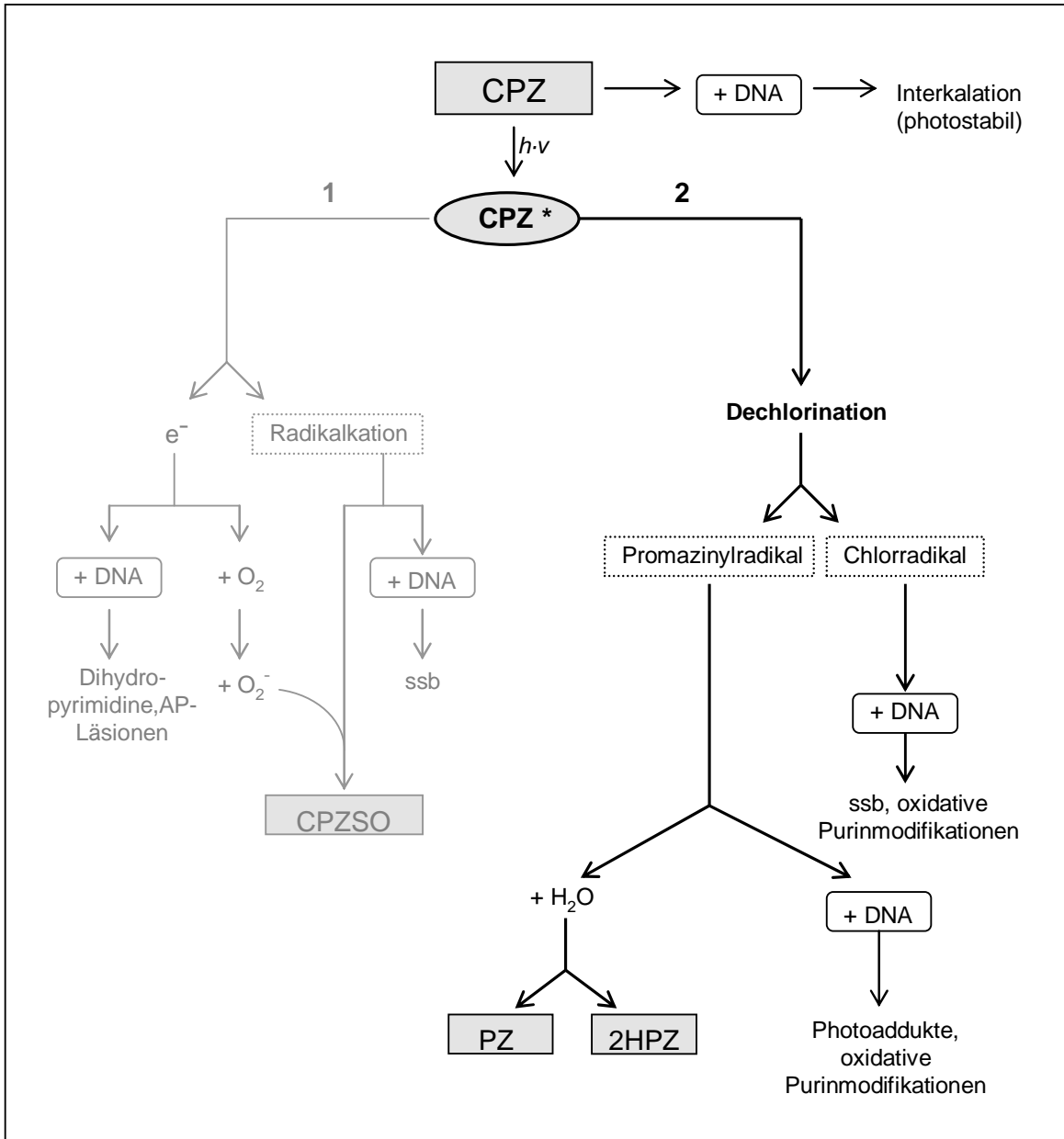
Um zu klären, ob CPZ unter den Bestrahlungsbedingungen tatsächlich ein Radikalfänger ist, wurde der gleiche Versuch mit zellulärer DNA unter Bestrahlung mit Licht des sichtbaren Bereichs (ohne UV-Anteil) durchgeführt. Da die Fpg-sensitiven Läsionen in Abwesenheit von CPZ durch den sichtbaren Bereich der Strahlung entstehen (siehe **5.1**), konnten diese so generiert werden, ohne dass CPZ angeregt und chemisch verändert wurde. CPZ zeigte im Grundzustand keinen Einfluss auf die Bildung von Fpg-sensitiven Läsionen (**Abb. 4.7**). CPZ muss folglich durch die UV-Absorption verändert werden, um den Effekt zu verursachen. Die Vermutung, dass stabile Endprodukte der Photoreaktion, wie CPZSO und 2HPZ, den



Quencheffekt verursachen könnten, wurde durch deren Untersuchung unter gleichen Bedingungen nicht bestätigt (**Abb. 4.17**). CPZ und seine langlebigen Photoproducte fungieren somit in den zellulären Versuchen dieser Arbeit nicht als Radikalfänger.

Eine weitere Überlegung war, ob CPZ mit 8-Hydroxyguanin oder dem Enzym Fpg direkt interagieren kann und so die Schadenserkennung durch das Enzym verhindert. Beides konnte experimentell widerlegt werden. Die Erkennung von durch einen anderen Photosensibilisator gebildetem 8-oxoG (**Abb. 4.9**) konnte durch spätere Behandlung mit CPZ und Sonnenlicht nicht verhindert werden. Da weiterhin im Versuch mit sichtbarem Licht die Läsionen durch Fpg erkannt werden konnten, spricht dies gegen eine Behinderung des Enzyms. Auch die Interaktion UV-induzierter Produkte mit Fpg kann wegen der Ergebnisse im PM2-Versuch (siehe **5.2.1.1**) ausgeschlossen werden. Eine Rolle eventuell gebildeter DNA-Protein-cross-links und somit verhinderte Schadenserkennung durch das Enzym konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (**4.3.1.1.4**). Es ist somit gesichert, dass CPZ die Absorption von UV-Strahlung benötigt, um einen inhibitorischen Effekt auf die Bildung oxidativer Basenmodifikationen zu erzielen.

Die Möglichkeit, dass durch photoaktiviertes CPZ der endogene zelluläre Chromophor zerstört wird, wurde durch die Behandlung der Zellen mit CPZ plus Solarsimulator und anschließender Bestrahlung mit der Halogenlampe untersucht (**Abb. 4.8**). Denkbar wäre eine Reduktion des Chromophors durch angeregtes CPZ. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass der endogene Chromophor durch das CPZ und Sonnenlicht nicht dauerhaft zerstört wird. Möglich ist aber auch eine schnelle Regenerierung des „verbrauchten“ Chromophors, was durch Autoxidation möglich ist. Die Bildung oxidativer CPZ-Derivate und reaktiver Zwischenprodukte hängt vom elektronenziehenden Substituenten am C-2 ab. In diesem Falle wäre CPZ am potentesten, die beschriebene Reduktion des endogenen Chromophors zu verursachen. Da die sonnenlichtbedingten Schäden über Singulett-Sauerstoff entstehen, wäre es theoretisch auch denkbar, dass die Radikale mit dem Singulett-Sauerstoff reagieren. Dies wäre im Einklang mit der nachträglichen Induzierbarkeit oxidativer Schäden durch sichtbares Licht nach Behandlung der Zellen mit CPZ und Sonnenlicht (**Abb. 4.8**). Das CPZ wäre hier schon zerstrahlt und die entstandenen Radikale haben zu diesem Zeitpunkt bereits mit Singulett-Sauerstoff reagiert, stehen folglich nicht mehr als Radikalfänger zur Verfügung. Dieser Theorie widerspricht jedoch die Induzierbarkeit von 8-oxoG durch Ro 19-8022 während der Bestrahlung mit dem Solarsimulator und Anwesenheit von CPZ (**Abb. 4.9**). Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion von zwei Radikalen, die nur in geringer Menge vorhanden sind, sehr gering.



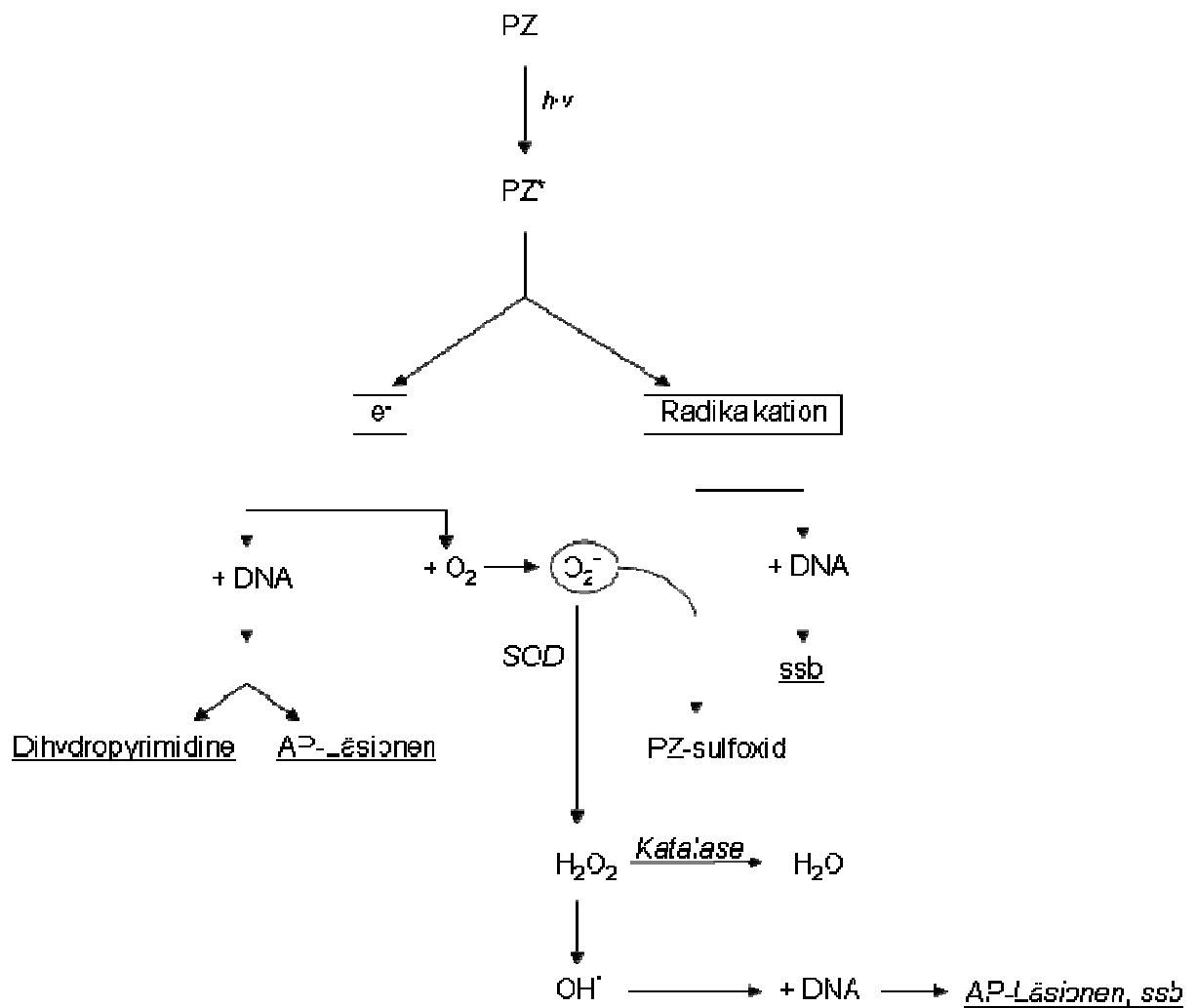
**Abb. 5.2** Mögliche Photoreaktionen des Chlorpromazins und nachgewiesener bevorzugter Reaktionsweg der DNA-Schädigung (durch Fettdruck kenntlich gemacht).

### 5.2.1.2 DNA-Schädigung durch Promazin

Promazin (PZ) erwies sich unerwarteterweise als photogenotoxisch (siehe **1.3.4.1.**, ursprüngliche Einstufung als nicht-photogenotoxisch) und verursacht in zellfreier DNA ein für photogenotoxische Substanzen sehr ungewöhnliches Spektrum an Schäden (**Abb. 4.30**). Bestrahltes PZ induziert viele Dihydropyrimidine und AP-Stellen, welche als reguläre und 4'oxidierte sowie 1'oxidierte AP-Läsionen identifiziert werden konnten. Es entstehen außerdem wenig SSB und keine oxidativen Purinmodifikationen. Die Entstehung von SSB in zellfreier DNA wurde bereits in der Literatur beschrieben, jedoch dessen Menge nicht bestimmt (Decuyper et al., 1984). Im Gegensatz zu CPZ verursacht PZ keine Alkylierung der DNA (**Abb. 4.32**), was durch das Fehlen von thermolabilen Läsionen gezeigt werden konnte. Da sich beide Moleküle nur durch das Chloratom in 2-Position unterscheiden, muss dies der entscheidende Faktor sein.

Die Schädigung zellfreier DNA durch photoaktiviertes Promazin zeigt eine Beteiligung von reaktiven Radikalen und eine ausgeprägte Bildung von Superoxid (**Tab. 4.3**). Letzteres wird sichtbar durch die 7-fache Erhöhung der Anzahl an SSB, der 4-fachen Erhöhung der Fpg-sensitiven Läsionen und der Verdopplung der Endo IV-sensitiven Stellen in Gegenwart von SOD. Ein hypothetischer Schädigungsmechanismus, der alle beschriebenen Befunde erklärt, ist in **Abb. 5.3** dargestellt. Zunächst entsteht aus dem angeregten PZ (PZ\*) durch Elektronenabgabe ein Radikalkation (siehe auch CPZ, **Abb. 5.2**). Das Elektron kann einerseits mit Sauerstoff reagieren, es entsteht Superoxid ( $O_2^-$ ), oder zur Reduktion der DNA führen, welches die Entstehung von Dihydropyrimidinen und AP-Läsionen zur Folge hat. Das entstandene Superoxid reagiert vermutlich mit dem Radikalkation (Rekombinationsreaktion) zum Promazinsulfoxid, welches keinen DNA-Schaden verursacht. Das Radikalkation selbst ist wahrscheinlich für die Entstehung der SSB verantwortlich, da es ein guter Reaktionspartner für nukleophile Moleküle ist. Im Fall der DNA wäre die Reaktion mit den Phosphatgruppen und folgender Hydrolyse der Zucker-Phosphatbindung der DNA denkbar, was zum Strangbruch führt. Wird nun SOD zugesetzt, so wird Superoxid abgefangen, was eine stark erhöhte Anzahl an SSB zur Folge hat, da nun eine große Menge an Radikalkationen für die DNA-Schädigung zur Verfügung steht. Durch die SOD wird Superoxid außerdem zu  $H_2O_2$ , welches durch Reduktion (vermutlich durch angeregtes PZ) in das Hydroxylanionen und das Hydroxylradikal überführt wird. Letzteres ist eine sehr reaktive Spezies, die an der DNA die Entstehung von AP-Läsionen und SSB verursacht. Die Zugabe von Katalase bewirkt, dass die in Anwesenheit von SOD zusätzlich entstandenen AP-Läsionen verhindert werden (**Tab. 4.3**). Deren Zahl sinkt wieder auf das Ausmaß ohne Zusatz von SOD. Dies ist ein Beweis dafür, dass diese AP-Läsionen durch die SOD-vermittelte Generation von  $H_2O_2$  respektive Hydroxylradikalen verursacht wird. Es sei bemerkt, dass sich hier erneut bestätigt, dass Fpg und Endo IV im Falle der Schädigung durch PZ die gleichen DNA-Schäden erkennen, nämlich AP-Läsionen (siehe auch **5.2.1.1**). Die Zugabe von Katalase beeinflusst die nach Zusatz von SOD zusätzlich entstandenen

SSB nicht, da diese vermutlich über das Radikalkation gebildet werden und die Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in diesem Fall keine Rolle spielt.



**Abb. 5.3** Mögliche Reaktionswege von PZ mit folgender DNA-Schädigung und Einfluss von SOD auf das Ausmaß der Schädigung.

Die Entstehung von Superoxid durch Bestrahlung von PZ wurde ebenfalls von Motten und Decuyper (Tests in Gegenwart von DNA) mittels *EPR-spin-trapping* nachgewiesen (Motten et al., 1983; Decuyper et al., 1984). Motten entwickelte die Theorie, dass Superoxid ein Zerfallsprodukt eines PZ-peroxy-radikals ist, während für Decuyper dass Superoxid während der Reaktion zwischen hydratisierten Elektronen und Sauerstoff entsteht. Diese Befunde und die Funktion von Superoxid als Hauptquelle von Hydroxylradikalen passen mit den Ergebnissen der Versuche dieser Arbeit zusammen.

Bei PZ kann man wie bei CPZ eine geringe Erhöhung der SSB und Fpg-sensitiven Läsionen bei der Schädigung der DNA in D<sub>2</sub>O erkennen, die gleichzeitige Senkung des Schadens durch Zugabe von Azid fehlt jedoch ebenfalls wie bei CPZ.

Auch die zellulären Versuche mit Promazin zeigten, wie schon die Versuche mit isolierter Phagen-DNA, eine deutliche Genotoxizität. Vorrangig werden hier, wie auch unter zellfreien Bedingungen, Endo III-sensitive Läsionen und AP-Stellen gebildet (**Abb. 4.27**), so dass ein ähnlicher Schädigungsmechanismus wie bei der zellfreien Behandlung angenommen werden kann. Es gelang der Beweis, dass es sich bei den durch Endo IV erkannten AP-Läsionen um 1'oxidierte AP-Läsionen handeln muss (**Abb. 4.28**). Der konzentrationsabhängige Verlauf der DNA-Schäden zeigt für alle Läsionen außer Fpg-sensitive, eine lineare Zunahme der Schäden.

### 5.2.1.3 DNA-Schädigung durch Chlorpromazinsulfoxid und 2-Hydroxypromazin

Bei der Untersuchung der zellfreien DNA-Schädigung durch Chlorpromazinsulfoxid (CPZSO) und 2-Hydroxypromazin (2HPZ) unter Sonnenlichtbestrahlung stellte sich heraus, dass diese Photoprodukte ebenfalls genotoxisch sind, jedoch schwächer als CPZ. Dies passt zu der durch Ljunggren nachgewiesenen schwächeren Phototoxizität *in vivo* (Mäuseschwänze) von CPZSO im Vergleich zu CPZ (Ljunggren and Moller, 1977).

Die untersuchten Schäden nehmen alle linear mit steigender Konzentration der Substanzen zu (**Abb. 4.22** und **Abb. 4.23**), die Schadensprofile unterscheiden sich jedoch erheblich (**Abb. 4.24**). In der Literatur werden die Reaktionen von CPZSO und 2HPZ mit biologischen Molekülverbindungen nur wenig beschrieben. CPZSO bindet *in-vivo* (Ratten) unter UVA-Bestrahlung zwar kovalent an Biomoleküle, jedoch in geringerem Ausmaß als CPZ (Schoonderwoerd et al., 1988).

Bei den zellulären Untersuchungen von CPZSO und 2HPZ (**Abb. 4.14** und **Abb. 4.15**) konnte gezeigt werden, dass alle DNA-Schäden außer Fpg-sensitive mit zunehmender Substanzkonzentration linear ansteigen. Interessanterweise konnte wie bei CPZ ein Quenchen des Fpg-sensitiven Schadens durch die photoaktivierten CPZ-Metabolite beobachtet werden, jedoch in geringerem Ausmaß als bei CPZ. Die CPZ-Metabolite

benötigen ebenso wie CPZ die Anregung durch UV-Strahlung, um photogenotoxisch zu wirken. Vermutlich sind für die Schädigung ebenfalls Radikalbildungen und Photoaddukte der DNA verantwortlich.

Die DNA-Schädigung durch die beiden Substanzen soll im Zusammenhang mit CPZ und PZ in einem Vergleich aller Phenothiazin-Schadensprofile näher diskutiert werden.

Die bei CPZ beobachtete Nicht-Linearität der Schädigung konnte bei keinem der anderen Phenothiazine beobachtet werden. Vermutlich hängt dies wiederum zusammen mit der elektronenziehenden Wirkung des Chlors, welche eine elektropositive Situation beispielsweise am Stickstoff des Grundgerüsts verursacht. Bekanntlich interkalieren solche Moleküle bevorzugt, die nicht nur eine planare Molekülstruktur, sondern auch eine elektronenarme Stelle im Molekül besitzen, welche bei der Interkalation mit den negativen Phosphatresten der DNA in Wechselwirkung treten kann.

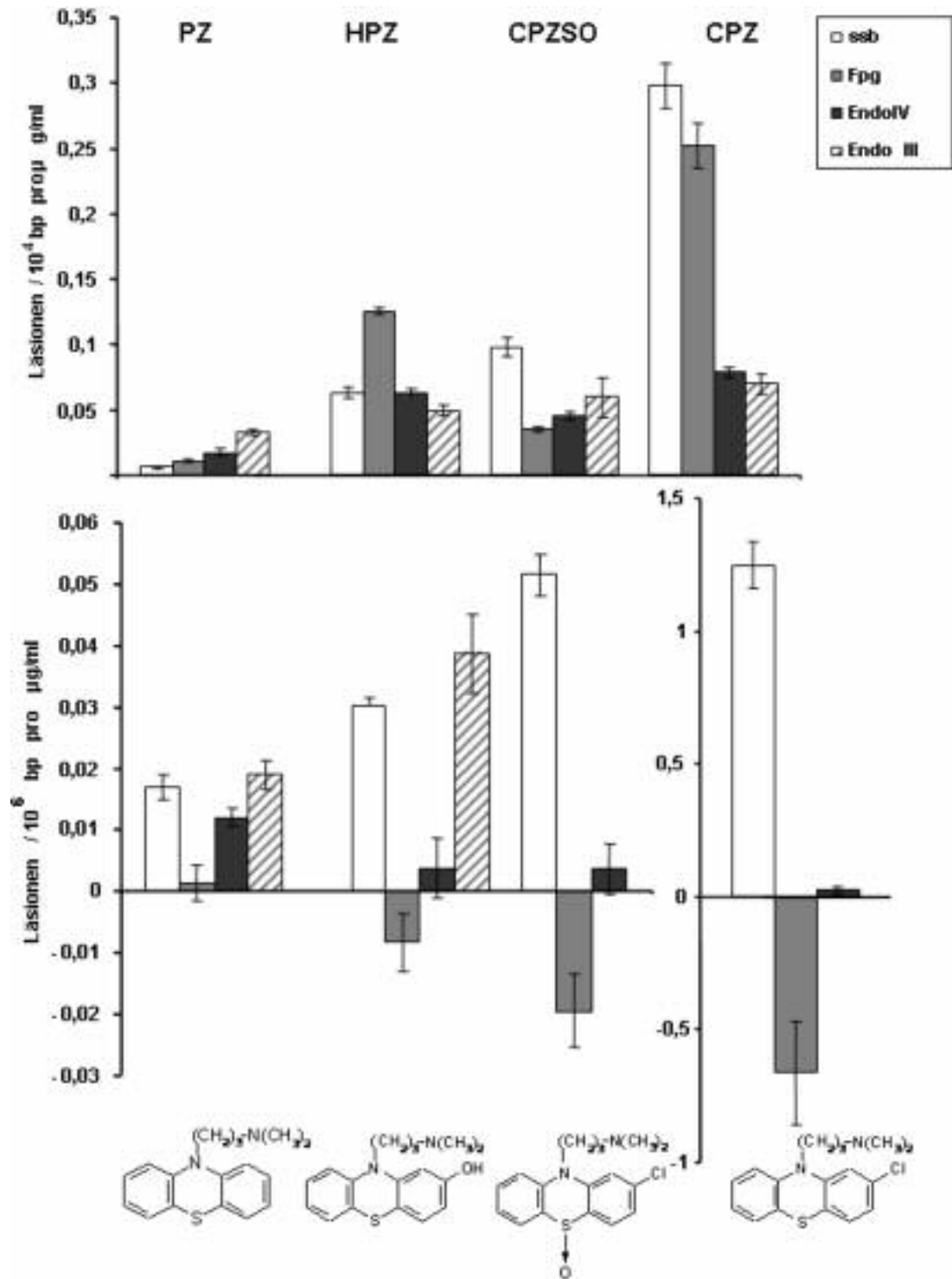
Da außer CPZ auch die hier untersuchten Photoproducte eine schädigende Auswirkung auf die zelluläre DNA besitzen, ist es umso wichtiger, während einer Therapie mit dem Arzneistoff Sonnenlichtexposition vollständig zu vermeiden, da die Photoreaktionen vielfältig und langandauernd sind.

#### **5.2.1.3.1 Vergleich der DNA-Schadensspektren der photoaktivierten Phenothiazinderivate**

Die Schadensprofile der untersuchten Phenothiazinderivate sind in **Abb. 5.4** zum Vergleich zusammengestellt. Es zeigt sich, dass die Menge an induzierten Strangbrüchen in Zellen und zellfrei von PZ über 2HPZ und CPZSO bis hin zu CPZ ansteigt. Offensichtlich erfolgt eine ausgeprägte Generierung von SSB nur, wenn ein Substituent in Position 2 am Molekül vorhanden ist. Die Effektivität der SSB-Bildung korreliert mit der Abspaltbarkeit des Substituenten (als Radikal oder Anion) und nimmt von 2HPZ über CPZSO hin zu CPZ zu. Das Chloratom ist bei CPZSO stärker an das Molekül gebunden als bei CPZ. Dies liegt an dem (-)I-Effekt der Sulfoxidgruppe, welcher die Leichtigkeit der photolytischen Abspaltung im Vergleich zu CPZ deutlich reduziert. Durch diese Abspaltung entsteht wie schon erwähnt ein Chlorradikal, welches vermutlich für die hohe Menge an SSB verantwortlich ist (siehe **Abb. 5.2**). Die Zahl der SSB in zellulärer DNA liegt in allen Fällen deutlich niedriger als die Zahl an SSB in zellfreier DNA. Der Unterschied ist bei der Schädigung mit 2HPZ und CPZSO am drastischsten, der Faktor beträgt hier ca. 100 (unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Bestrahlungsstärke). Der SSB-Schaden durch PZ ist etwa 18-fach höher in zellfreier DNA, bei CPZ liegt er bei 12-fach. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Substanzen in unterschiedlichem Maße vermögen, die DNA im Zellkern zu erreichen (siehe auch **Tab. 5.1**).

Die Fpg-sensitiven oxidativen Basenmodifikationen entstehen im Falle des CPZ vermutlich durch den gleichen Mechanismus wie die SSB. In Abwesenheit eines Chlorsubstituenten werden solche Basenmodifikationen möglicherweise nur über das Promazinylnradikal gebildet (siehe auch **Abb. 5.2**). Die Menge an zellfrei induzierten oxidativen DNA-Schäden ist bei CPZSO niedriger als bei 2HPZ. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Bildung eines Promazinylnradikals bei CPZSO schwerer erfolgt als bei 2HPZ (s.o.). Der Quencheffekt auf die Fpg-sensitiven Läsionen steht vermutlich mit dem Redoxpotential der angeregten Verbindungen (s.o.) in Zusammenhang, was die Abnahme des Effektes von CPZ über 2HPZ und CPZSO bis hin zu PZ erklärt.

Endo III- und Endo IV-sensitive Läsionen sind zellfrei nur bei der Schädigung mit Promazin die Hauptprodukte. Bei den anderen Stoffen (CPZ, CPZSO, 2HPZ) ist die Menge induzierter AP-Läsionen sowohl in zellfreier als auch in zellulärer DNA in etwa gleich. Dies deutet darauf hin, dass die Induktion nicht mit den Substituenten am PhenothiazinGrundgerüst zusammenhängt und passt zu der bereits geschilderten Vermutung, dass die durch photoaktiviertes PZ verursachten DNA-Schäden (AP-Läsionen und Dihydropyrimidine) via Elektronenabgabe an die DNA induziert werden. Interessanterweise dominieren Endo III-sensitive Läsionen auch bei der Schädigung zellulärer DNA durch photoaktiviertes 2HPZ. Bei dieser Substanz scheint ein reduktiver Angriff der DNA in der zellulären Umgebung eine wichtige Rolle zu spielen.



**Abb. 5.4** Vergleich der zellfreien (oben) und zellulären (unten) DNA-Schadensprofile der untersuchten Phenothiazine. Angegeben sind die induzierten Läsionen durch die Substanz, Schäden durch den Solarsimulator allein sind abgezogen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung des zellulären CPZ-Diagramms.



## 5.2.2 Fluorochinolone: Lomefloxacin und Ciprofloxacin

### 5.2.2.1 DNA-Schädigung durch Fluorochinolone

Die Versuche an PM2-DNA und in Zellen zeigen für Lomefloxacin und Ciprofloxacin eine deutliche DNA-Schädigung. Beide Substanzen verursachen dosisabhängig linear ansteigende DNA-Schäden (**Abb. 4.33**, **Abb. 4.35**, **Abb. 4.37** und **Abb. 4.39**). Auffällig ist zellulär der steilere Anstieg der SSB-Geraden im Gegensatz zu der nur geringen Induktion Fpg-sensitiver Modifikationen. Möglicherweise spielt hier eine strahlungsinduzierte kovalente Bindung der Substanzen an den Komplex von DNA und Topoisomerase II (Säugerzellen) eine Rolle. Im Dunkeln verursachen die Gyrasehemmer auf Grund der schwachen Affinität zur Säugerzell-Topoisomerase keine nachweisbaren SSB (**Abb. 4.33**, **Abb. 4.37**). Unter Bestrahlung könnte es nun zur Ausbildung einer kovalenten Bindung des Gyrasehemmers mit dem oben genannten Komplex kommen, was zur Entstehung stabilisierter und somit nachweisbarer SSB führt.

Im zellfreien Schadensprofil hingegen dominieren Fpg-sensitive Läsionen, SSB entstehen nur wenig. Typisch für einen Typ I oder Typ II-Photosensibilisator, ist die zellfrei hohe Induktion oxidativer Purinmodifikationen (Fpg-sensitiv), jedoch stellt die Existenz einer deutlichen Menge von AP-Läsionen und die relativ hohe Anzahl an SSB (insbesondere bei LOF) eine Abweichung von einem „typischen“ Photosensibilisator-Schadensprofil dar.

Die Induktion von Einzelstrangbrüchen wurde in vielen Studien an zellulärer (Comet Assay) (Chetelat et al., 1996; Marrot et al., 2001; Zhang et al., 2004; Sanchez et al., 2005) und zellfreier (Martinez and Chignell, 1998; Spratt et al., 1999; Marrot and Agapakis-Causse, 2000; Zhang et al., 2004) DNA nachgewiesen. Die Induktion von 8-oxoG wird ebenfalls durch andere Studien bestätigt (mittels HPLC) (Rosen et al., 1997; Verna et al., 1998) (Spratt et al., 1999). In dieser Arbeit konnte zellulär zusätzlich die Induktion von AP-Läsionen durch CIF, nicht aber durch LOF gezeigt werden, wohingegen in Zellen AP-Läsionen vor allem durch photoaktiviertes CIF induziert werden.

Der Vergleich der Ergebnisse von LOF und CIF in **Abb. 5.5** zeigt, dass die Zahl der induzierten SSB in zellfreier DNA in beiden Fällen gleich, in Zellen jedoch unterschiedlich ist. Photoaktiviertes LOF induziert zellulär 3mal so viele SSB und Fpg-sensitive Läsionen wie CIF. LOF Es erweist sich demnach in Zellen also als der stärkere Photosensibilisator. Dies ist im Einklang mit Studien (Chetelat et al., 1996; Martinez and Chignell, 1998; Spratt et al., 1999), in denen LOF als der stärkere Induktor identifiziert wurde. Dasselbe konnten Tier-Studien beweisen, die dieses Verhältnis untersuchten: Versuche mit Mäusen zeigten, dass LOF ein höheres photokanzerogenes Potential besitzt als CIF (Klecak et al., 1997; Zhang et al., 2003). LOF erwies sich im Mikroerntest mit V79-Zellen als die photoaktivere Substanz von beiden (Snyder and Cooper, 1999; Zhang et al., 2003). Die Induktion von 8-oxoG (nachgewiesen mittels HPLC) in Zellen durch LOF ist zweifach höher als bei CIF (Rosen et

al., 1997). Erklärbar ist die höhere Photogenotoxizität von LOF durch die Anwesenheit eines Halogenatoms in 8-Position des Chinolongrundgerüsts (Christ, 1998). Wie Eingangs dieser Arbeit erwähnt, korreliert eine hohe Phototoxizität mit der hohen therapeutischen Wirksamkeit des Fluorochinolons (siehe **1.3.4.1**).

Bei der Induktion von Fpg-sensitiven Modifikationen in zellfreier DNA durch die beiden Photosensibilisatoren verhält es sich jedoch genau umgekehrt: Dort erweist sich CIF als die photogenotoxischere Substanz von beiden, was im Kontrast zu oben genannten Studien steht.

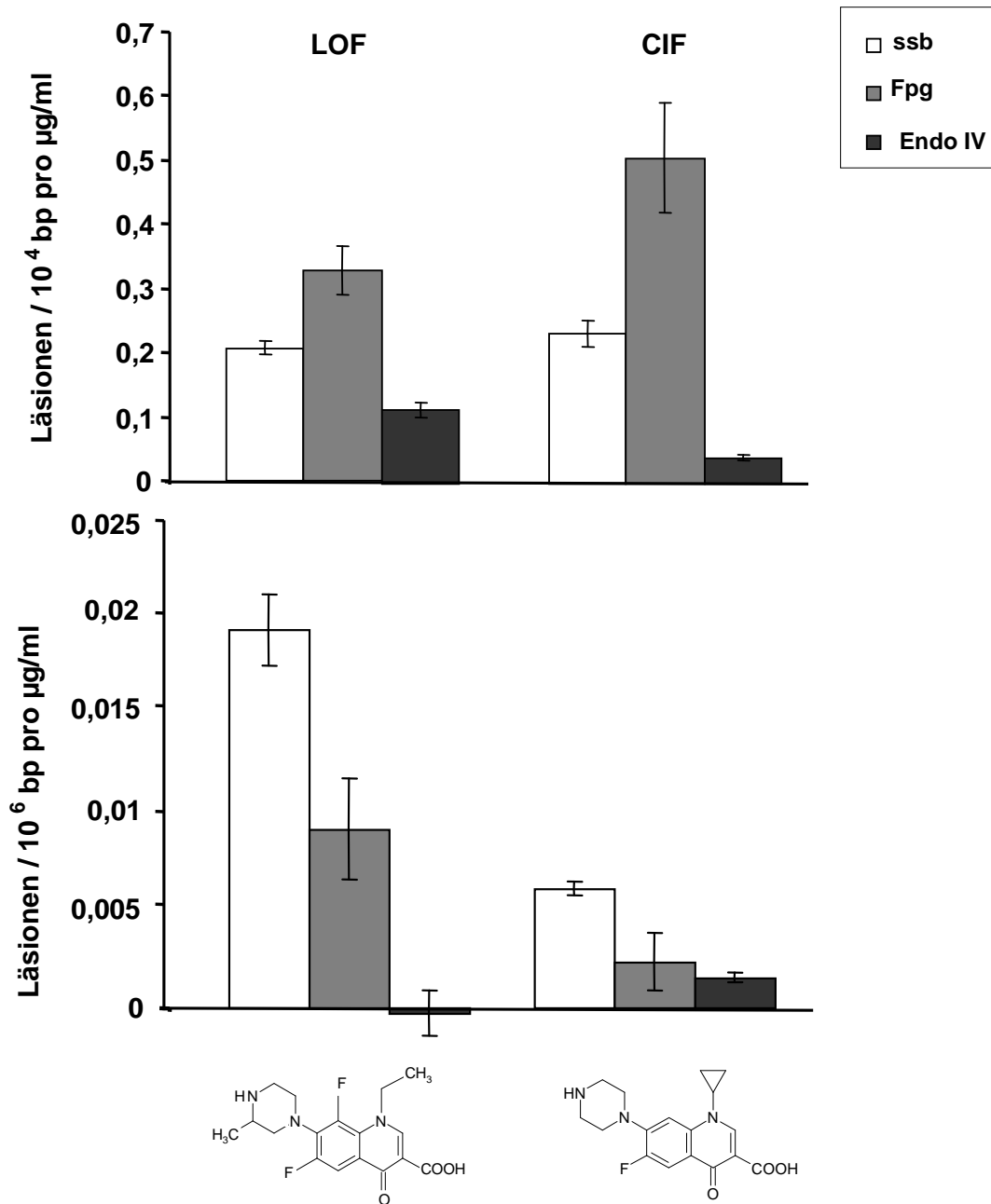
Die beteiligten ROS bei der DNA-Schädigung sind im Fall der Fluorochinolone vor allem Radikale (**Tab. 4.3**). Bei Ciprofloxacin beobachtet man zusätzlich die Beteiligung von Superoxid. Die Zugabe von *tert*-Butanol quencht den Schaden durch CIF und LOF in gleichem Ausmaß. Die Generation von Hydroxylradikalen in großer Menge ist erklärbar durch die mögliche Reaktion der durch die Bestrahlung entstandenen Radikale mit H<sub>2</sub>O (Spratt et al., 1999). Das Ergebnis ist außerdem im Einklang mit Befunden zu Norfloxacin und Ofloxacin, welche ebenfalls im PM2-Versuch mit Zusatz von *tert*-Butanol einen verminderten DNA-Schaden verursachten (Mahler, 1999).

Die Beteiligung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird in beiden Fällen ausgeschlossen, was im Einklang mit Ergebnissen von Chetelat ist (Chetelat et al., 1996).

Wie der fehlende Einfluss von D<sub>2</sub>O zeigt, ist Singulett-Sauerstoff am Schädigungsmechanismus hier nicht beteiligt, was im Kontrast zu einigen Veröffentlichungen (Foote, 1991; Verna et al., 1998) steht. Interessanterweise existieren aber auch Berichte, dass der Nachweis von Singulett-Sauerstoff nicht gelang. Beispielsweise konnte Spratt (Spratt et al., 1999) nur für CIF, nicht aber für LOF eine solche Induktion feststellen (getestet mit D<sub>2</sub>O). Singulett-Sauerstoff hatte in der gleichen Studie keinen Einfluss auf die Entstehung der SSB. Mahler konnte lediglich für Norfloxacin, nicht aber für Ofloxacin (Substituiert an C-8) eine Beteiligung von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> beweisen (Mahler, 1999). Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung des CIF in D<sub>2</sub>O auf Grund der sehr schlechten Löslichkeit der Substanz unterlassen, es existiert hier lediglich das Ergebnis des Zusatzes von NaN<sub>3</sub>. Es ist also offen, ob es in D<sub>2</sub>O zu einer Erhöhung des Schadens kommen würde, trotz negativem Ergebnis im NaN<sub>3</sub>-Versuch.

Betrachtet man die Molekülstruktur dieser Fluorochinolone, so fällt auf, dass bei Substitution des Protons an C-8 (wie bei LOF und Ofloxacin) kein <sup>1</sup>O<sub>2</sub> nachgewiesen werden konnte. Für diese Stoffe steht vermutlich eine Abspaltung des Substituenten in C-8 durch Lichtabsorption im Vordergrund (siehe **5.2.2**). Es entstehen so Moleküle mit einer reaktiven Stelle an C-8, welche, wie schon erwähnt, durch die Reaktion mit H<sub>2</sub>O Hydroxylradikale generieren können (Spratt et al., 1999). Besitzt ein Fluorochinolon nun keinen Substituenten an C-8 (CIF und

Norfloxacin), so ist die Reaktion des angeregten Moleküls mit Sauerstoff denkbar, jedoch nicht mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Dies erklärt die unterschiedlichen Befunde.



**Abb. 5.5** Vergleich der zellfreien (oben) und zellulären (unten) Schadensprofile der untersuchten Fluorochinolone Lomefloxacin und Ciprofloxacin. Es handelt sich hierbei um induzierte Läsionen durch die Substanz, Schäden durch den Solarsimulator allein sind abgezogen.

Auffällig ist, dass beide Substanzen ein untereinander ähnliches, aber zellulär und zellfrei unterschiedliches Schadensprofil aufweisen. Der Unterschied zwischen der Schädigung in Zellen und zellfrei könnte mit einer erschwerten Erreichbarkeit der DNA im Zellkern in Zusammenhang stehen. Der Einsatz von vorbestrahlten Substanzen ergab keine Erhöhung der DNA-Schädigung (Chetelat et al., 1996). Dies spricht für die Generation von kurzlebigen reaktiven Zwischenprodukten während der Bestrahlung und gegen die Produktion von schädigenden stabilen Photoprodukten.

### **5.2.3 Doxycyclin**

#### **5.2.3.1 DNA-Schädigung durch Doxycyclin**

Bei der Untersuchung des zellfreien DNA-Schadens verursacht durch photoaktiviertes DXC konnte die Entstehung einer linear mit der DXC-Dosis ansteigenden Zahl Fpg-sensitiver Läsionen und SSB nachgewiesen werden (**Abb. 4.44** und **Abb. 4.45**). Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von Piette, der in zellfreier DNA SSB und Guaninmodifikationen (Piette et al., 1986a) fand. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Induktion von AP-Läsionen nachgewiesen werden, jedoch nur halb so viele wie SSB.

Bei den Experimenten mit V79-Zellen unter den Bedingungen, die durch die Ringstudie vorgeschrieben waren, zeigte sich eine Präzipitation der Substanz im Behandlungsmedium. Dies führte zu nur wenigen Fpg-sensitiven Schäden und vielen konzentrationsabhängig ansteigenden SSB (**Abb. 4.41** und **Abb. 4.43**). Vermutlich entstehen diese SSB durch außerhalb der Zelle gebildete ROS, insbesondere  $H_2O_2$  (vgl. Methylenblau, **5.2.4**). Die Bestrahlung von Zellen und DXC in Calcium- und Magnesium-freien Phosphatpuffer (PBS/CMF) gewährt eine Lösung der Substanz und die Induktion einer großen Menge Fpg-sensitiver Modifikationen, die im Schadensprofil klar dominieren (**Abb. 4.42** und **Abb. 4.43**). AP-Läsionen werden in zellulärer DNA durch photoaktiviertes DXC nicht induziert.

Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Singulett-Sauerstoff nicht an der zellfreien DNA-Schädigung durch DXC und Sonnenlicht beteiligt ist (**Tab. 4.3**). Dies ist im Einklang mit Untersuchungen an zellfreier DNA (Martin et al., 1987), wohingegen der DNA-Schaden in Zellen jedoch durchaus über Singulett-Sauerstoff vermittelt wird (Glette and Sandberg, 1986; Shea et al., 1993). Weitere Untersuchungen in der eigenen Arbeit zeigen, dass die Beteiligung von  $H_2O_2$  ausgeschlossen werden kann. Der Zusatz von *t*-Butanol konnte keine stark reaktiven radikalischen Verbindungen (wie Hydroxylradikale) als schädigende Spezies aufdecken. Da die Photoreaktion jedoch zur Bildung von DXC-Radikalen führt (siehe **1.3.4.1**), kann eine Schädigung der DNA über diese (nicht hochreaktiven) DXC-Produkte angenommen werden.

Unter Zugabe von SOD wurde überraschenderweise die Erhöhung der Menge an Fpg-sensitiven Läsionen um das ca. 3-fache festgestellt. Auch in anderen Studien wurde eine Beteiligung von Superoxid am Ausmaß des zellfreien DNA-Schadens gefunden (Piette et al., 1986a; Martin et al., 1987). Scheinbar verhindert Superoxid zum Teil die Bildung von Fpg-sensitiven Läsionen. Wird Superoxid über die SOD abgefangen, so verändert sich das zellfreie Schadensprofil (**Abb. 4.45**) durch die Erhöhung der Menge an oxidativen Purinmodifikationen. Die Relation von SSB zu Fpg-sensitiven Läsionen ist dann die gleiche wie bei der zellulären DNA-Schädigung (**Abb. 4.43**). Es ist denkbar, dass Superoxid, welches durch die Bestrahlung von DXC mit Sonnenlicht generiert wird, die Reduktion von gebildeten DXC-Radikalen (s.o.) verursacht. Die Photoprodukte stehen damit nicht vollständig zur Induktion von oxidativen DNA-Schäden zur Verfügung. In Zellen kann die Anwesenheit von Superoxiddismutase als Zellbestandteil nicht ausgeschlossen werden, was das deutlich höhere Ausmaß an Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen im Gegensatz zu SSB erklären würde. Die Theorie wird dadurch gestützt, dass der Nachweis von Superoxid an der zellulären Schadensbeteiligung durch Shea negativ ausfiel (Shea et al., 1993).

## 5.2.4 Methylenblau

### 5.2.4.1 DNA-Schädigung durch Methylenblau

In dieser Arbeit konnte die Induktion einer relativ hohen Menge Fpg-sensitiver Läsionen in zellfreier DNA, welche in früherer Arbeit bereits nachgewiesen wurde (Epe et al., 1993), bestätigt werden (**Abb. 4.49** und **Abb. 4.50**). Es entstehen sehr wenig SSB und die Bildung einiger AP-Läsionen konnte in den Versuchen dieser Arbeit gezeigt werden. Die Entstehung von wesentlich mehr 8-oxoG als SSB in geschädigter Plasmid-DNA konnte auch von Schneider nachgewiesen werden (Schneider et al., 1990). Die Identifikation von AP-Stellen ist im Einklang mit OhUigin (OhUigin et al., 1987), der auch die Induktion von SSB nachwies. Im Gegensatz zur zellfreien DNA-Schädigung zeigte MTB in V79-Zellen unter der Bestrahlung mit Sonnenlicht überraschenderweise keine Induktion von 8-oxoG (**Abb. 4.46**, **Abb. 4.47**). Es werden viele Einzelstrangbrüche gebildet, AP-Läsionen entstehen fast nicht. Der Grund für die fehlende Induktion Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in Zellen liegt wahrscheinlich an der chemischen Beschaffenheit des Methylenblaus. Es handelt sich hierbei um ein hydrophiles Kation (siehe **Tab. 4.2**), welches als solches kaum bis gar nicht in die Zelle gelangen kann. Der dennoch nachweisbare Schaden an der zellulären DNA in Form von SSB, geschieht von außen, durch die Generation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Abb. 4.48**).

Interessanterweise sind die meisten in der Literatur beschriebenen Versuche zur Photoaktivität bzw. Phototoxizität von MTB nicht in Zellen durchgeführt worden. Innerhalb der wenigen zellulären Untersuchungen existieren auch Studien, die sich mit dem Problem der Aufnahme von MTB in die Zelle beschäftigen. Diese Studien zeigten, dass die Aufnahme

des hydrophilen MTB (Kation) in Erythrocyten erschwert ist und dass es zu diesem Zweck zunächst an der Zelloberfläche zum lipophileren Molekül (MTBH) reduziert werden muss (Sass et al., 1967; Bongard et al., 1995; May et al., 2004). Dieser Mechanismus wurde ebenfalls bei der Inkubation von bovinen Lungenzellen mit MTB beobachtet (Bongard et al., 1995). In der gleichen Studie konnte die Aufnahme von MTB in die Zellen durch Einsatz einer Konkurrenzsubstanz, die an Stelle des MTB reduziert wurde, verhindert werden. Eine Untersuchung an verschiedenen Zellsorten konnte zeigen, dass MTB am besten in epitheliale Zellen und am wenigsten in Endothelzellen und Fibroblasten aufgenommen wird (Buehring and Jensen, 1983). Daher stammt auch die Anwendung des MTB als färbende Substanz in der Histologie, da dort die selektive Anfärbung bestimmter Gewebe zu Nutzen gemacht wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MTB wahrscheinlich ohne eine entsprechend lange Vorinkubation mit den Zellen (Zeit zur Reduktion des Kations) nicht in der Lage ist in die Zelle zu gelangen. In den zellulären Versuchen dieser Arbeit wurde generell auf eine Vorinkubation aus praktischen Gründen verzichtet, da adhärenente V79-Zellen in Suspension geschädigt wurden, deren Anwachsen in der Quadripermschale durch möglichst kurze Versuchszeit (Bestrahlung mit dem Solarsimulator für ca. 11 min als maximale Dauer) vermieden werden sollte. Unter diesen Umständen wird MTB direkt nach Zugabe in das Behandlungsmedium bestrahlt und befindet sich zu diesem Zeitpunkt in der äußeren Umgebung der Zelle. Reaktionen des angeregten MTB mit Komponenten des Mediums sind letztendlich für den detektierten DNA-Schaden verantwortlich.

Die zellfreien Versuche zur Untersuchung der beteiligten ROS an der Schädigung der DNA durch MTB und Sonnenlicht identifizierten Singulett-Sauerstoff als verantwortliche reaktive Spezies. Dies passt zu den Ergebnissen in der Literatur (OhUigin et al., 1987; Floyd et al., 1989; Epe et al., 1993; Buchko et al., 1995). Die Daten dieser Arbeit und anderer Studien schließen die Beteiligung von Superoxid und Hydroxylradikalen bei der zellfreien DNA-Schädigung aus (Floyd et al., 1989; Schneider et al., 1990). Bemerkenswert ist, dass die Induktion von SSB und die Oxidation von Guanin in der DNA durch angeregtes MTB sogar unter anaeroben Verhältnissen stattfinden (OhUigin et al., 1987). Erklärt werden kann dies durch einen möglichen direkten Elektronentransfer von MTB auf die DNA, der an Stelle der Produktion von Singulett-Sauerstoff stattfindet (Knowles, 1971; Saito et al., 1975; OhUigin et al., 1987).

### **5.2.5 Quantitativer Vergleich zellfreier und zelluläre DNA-Schäden durch Photosensibilisatoren**

In **Tab. 5.1** ist der Unterschied der Ergebnisse im PM2-Assay und der Werte ermittelt mit der Alkalischen Elution für die einzelnen Substanzen nach Schadensart dargestellt. Die Daten zur Berechnung der Faktoren stammen aus den einzelnen Schadensprofilen. Die zellfrei pro Konzentrationseinheit ermittelten Läsionen wurden durch die tatsächliche Anzahl der zellulären Läsionen pro Konzentrationseinheit dividiert. Auf Grund der doppelten Bestrahlungsdosis bei den zellfreien Experimenten wurden die Faktoren schließlich halbiert. Bei der Gegenüberstellung der zellfreien und zellulären Ergebnisse der untersuchten Substanzen fällt auf, dass der DNA-Schaden zellfrei in allen Fällen höher ist als in Zellen. Die Größenordnung der Faktoren variiert stark, ist jedoch innerhalb einer strukturell verwandten Substanzgruppe vergleichbar. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen der Molekülstruktur der Photosensibilisatoren und der mehr oder weniger verminderten schädigenden Potenz in zellulärer DNA schließen. Die höhere zellfreie Induktion der DNA-Schäden ist vor allem bei Lomefloxacin und Ciprofloxacin sehr deutlich. Es besteht die Vermutung, dass beide Substanzen nur erschwert die DNA im Zellkern erreichen (möglicherweise durch Reaktionen mit Zellproteinen, s.u.), oder dass generierte reaktive Spezies in der Zelle leicht abgefangen werden. Dies erscheint auch wünschenswert, wenn man den therapeutischen Einsatz als antibiotisch wirkende Substanzen betrachtet, da eine selektive Wirkung auf die bakterielle Gyrase und nicht auf die humane Topoisomerase II erzielt werden soll. Im Falle des Methylenblaus kommt es auf Grund der erschwerten Zellgängigkeit zu einer extrem viel höheren Schädigung der zellfreien DNA in Bezug auf Fpg- und Endo IV-sensitive Läsionen. Der Unterschied zwischen zellfreier und zellulärer DNA-Schädigung durch MTB ist in Bezug auf die Einzelstrangbrüche weniger groß. Die Phenothiazine Chlorpromazin und Promazin sind im Vergleich mit den genannten Substanzen besser in der Lage die DNA im Zellkern zu erreichen, der höhere zellfreie Schaden an der DNA wird jedoch auch hier sehr deutlich. Dies könnte damit erklärt werden, dass CPZ unter den für die Zellschädigung gewählten Bedingungen stöchiometrisch im Überschuss zur DNA vorliegt, sodass der für die beobachtete zellfreie Schädigung verantwortliche Mechanismus in den Zellen kaum zum Tragen kommt. Bei Doxycyclin ist die Differenz des Schadensausmaßes am geringsten, die Faktoren sind relativ niedrig.

Denkbare Gründe für eine geringere schädigende Potenz auf zelluläre DNA sind mögliche Reaktionen des angeregten exogenen Photosensibilisators mit endogenen Zellstrukturen. Beispielsweise kann CPZ außer mit der DNA leicht Photoaddukte mit Proteinen bilden, was sowohl durch *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Versuche bewiesen werden konnte (Rosenthal et al., 1978; Ben-Hur et al., 1980; Merville et al., 1983). Einige Photosensibilisator-Moleküle würden durch solche Nebenreaktionen nicht mehr für die eigentliche DNA-Schädigung zur Verfügung stehen.

	<b>CPZ</b>	<b>PZ</b>	<b>LOF</b>	<b>CIF</b>	<b>DXC</b>	<b>MTB</b>
<b>SSB</b>	12	13	545	1917	6	180
<b>Fpg</b>	13	36	1828	10957	2	13335
<b>Endo IV</b>	152	75	6	1200	34	6887
<b>Endo III</b>	4	87	-	-	-	-

**Tab. 5.1** Vergleich der zellfreien DNA-Schädigung durch Photosensibilisatoren (gemessen im PM2-Assay) mit den zellulären Ergebnissen (gemessen mit der Alkalischen Elution). Die Zahlen sind die Faktoren, um die die zellfreie Schädigung effektiver ist als die zelluläre (Bei DXC handelt es sich um die Messungen in PBS/CMF).

### **5.3 Vergleich der DNA-Schadensprofile**

Der Vergleich der aus den linearen Bereichen der Dosis-Wirkungskurven ermittelten DNA-Schadensprofile (zellfrei, **Abb. 5.6** und zellulär, **Abb. 5.7**) der sechs untersuchten Verbindungen verdeutlicht noch einmal, dass nicht nur das Ausmaß, sondern auch die Art der DNA-Schädigung bei den Testverbindungen sehr unterschiedlich ist. Bei einigen Substanzen dominieren zellfrei die Fpg-sensitiven Läsionen (LOF, CIF, MTB, DXC), während zellulär vorrangig SSB entstehen (LOF, CIF, DXC, CPZ, MTB). Promazin verursacht als einzige Substanz in beiden Systemen durch Photoaktivierung AP-Läsionen und Dihydropyrimidine in hohem Ausmaß. Die zugrunde liegenden verschiedenen Schädigungsmechanismen wurden bereits ausführlich besprochen. Quantitativ spielen hier auch die verschiedenen Absorptionskoeffizienten und Quantenausbeuten bei der Bildung reaktiver Spezies durch die Substanzen eine wichtige Rolle. Im zellfreien Vergleich fällt auf, wie wenig potent PZ und DXC im Vergleich mit den anderen Verbindungen bei der DNA-Schädigung sind.



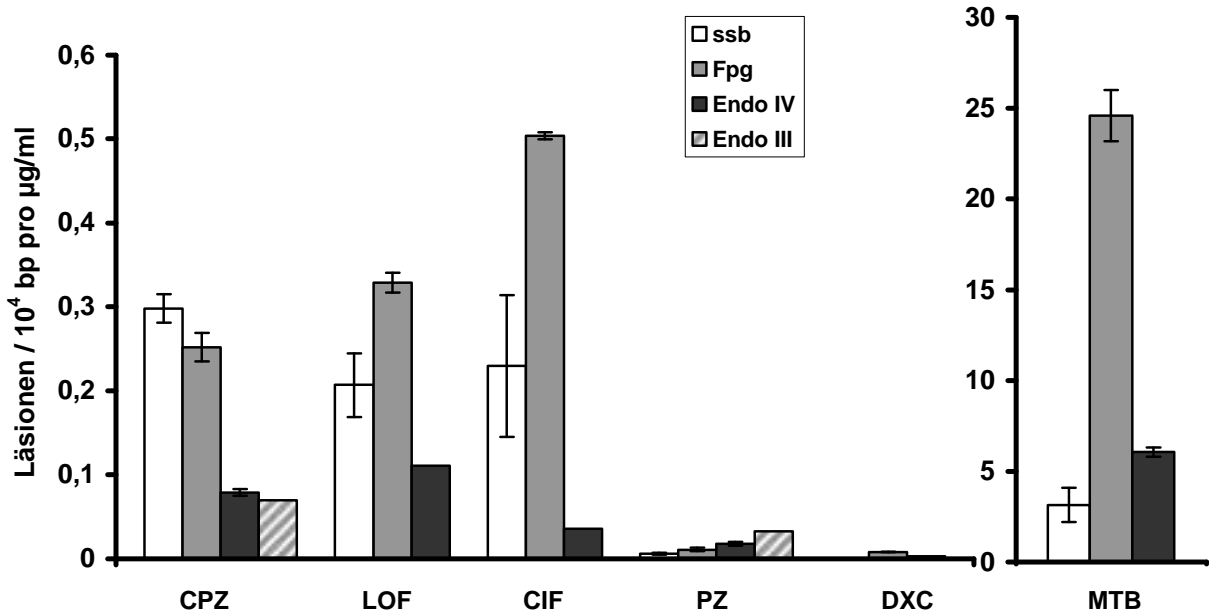


Abb. 5.6 Vergleich der zellfreien DNA-Schadensprofile der untersuchten Testsubstanzen.

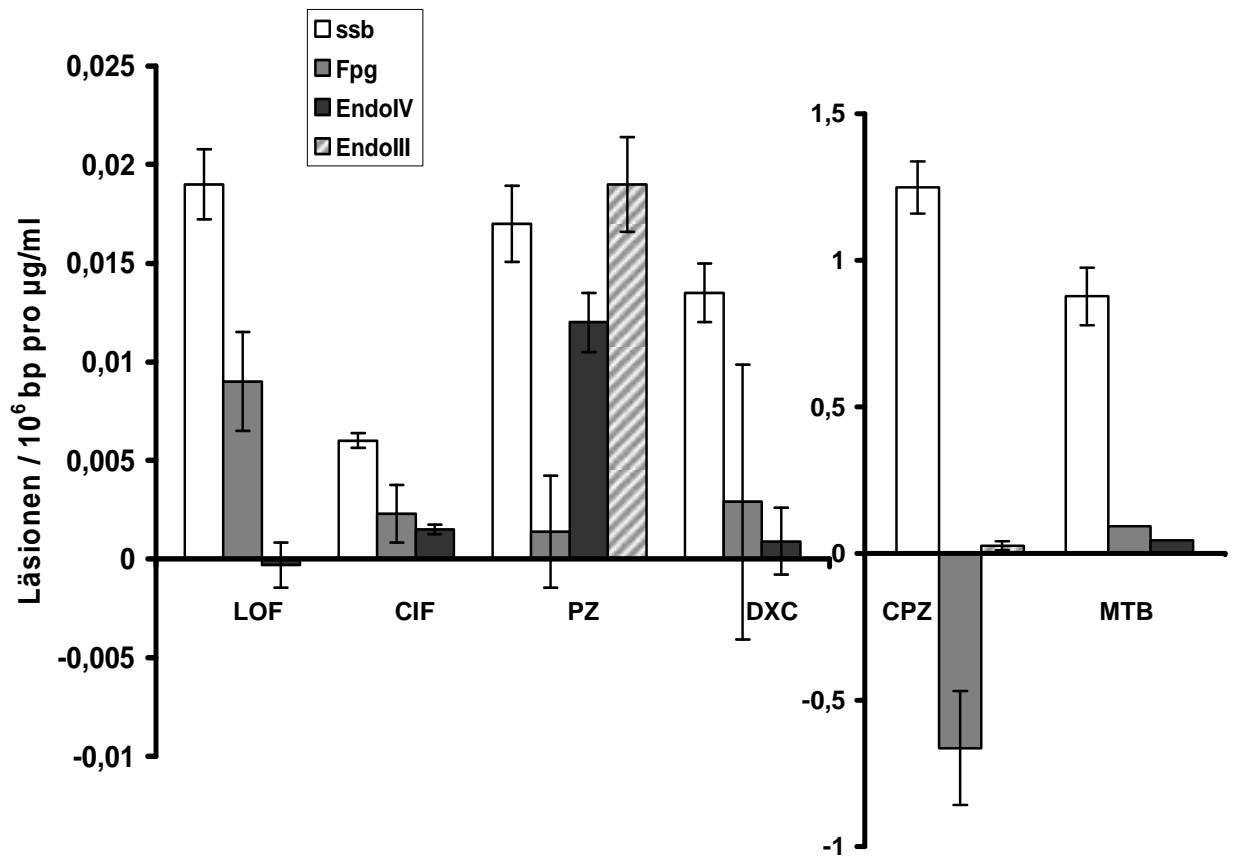


Abb. 5.7 Vergleich der zellulären DNA-Schadensprofile der untersuchten Testsubstanzen (Bei DXC handelt es sich um die Ergebnisse in Medium).

## **5.4 Korrelationen der Ringstudienergebnisse mit Daten der zellulären DNA-Schädigung durch Photosensibilisatoren**

### **5.4.1 Korrelation Alkalische Elution-Comet Assay**

Bei der Gegenüberstellung der verschiedenen Arten der DNA-Schädigung, gemessen mit der Alkalischen Elution (AE), mit den Ergebnissen des Comet Assays (CA) (**4.6.1**), korrelieren wie erwartet die SSB (**Abb. 4.54**) verursacht durch die einzelnen Substanzen am besten (siehe auch **3.2.4.1**). Da LOF im CA ein unerklärbar negatives Ergebnis zeigte, ist dieser Wert in der Betrachtung zu vernachlässigen. Es existiert eine ebenfalls gute Korrelation der TI (*tail intensity*) mit den AP-Läsionen (**Abb. 4.54, C**). Der Zusammenhang zwischen AP-Stellen und SSB ist dadurch gegeben, dass sich oxidierte AP-Läsionen unter alkalischen Bedingungen (wie in der AE und im CA) leicht in Strangbrüche überführen lassen. Fpg-sensitive Läsionen korrelieren (wie erwartet) nicht mit der TI. Insgesamt liefert diese Korrelation der Ergebnisse zweier vergleichbarer Methoden zur zellulären Messung von DNA-Strangbrüchen ein gutes Resultat und bestätigt die Erwartungen.

### **5.4.2 Korrelation Alkalische Elution-Mikrokerntest**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Schadensart und Mikrokernentstehung näher zu beleuchten. Bei der dafür notwendigen Korrelation der Mikrokernanzahl mit den verschiedenen Schäden an zellulärer DNA durch die Substanzen (**Tab. 4.4, Abb. 4.55**) zeigte sich, dass sowohl die pro Konzentrationseinheit induzierte Zahl von Mikrokernen als auch die pro Konzentrationseinheit induzierte Zahl der verschiedenen DNA-Modifikationen um zwei bis drei Größenordnungen schwankt. Eine recht gute Korrelation findet sich für die AP-Läsionen, obwohl diese bei allen Testsubstanzen nur in relativ geringen Mengen gebildet werden. Strangbrüche, deren Akkumulation (in Form von Doppelstrangbrüchen) mechanistisch am leichtesten mit der Bildung von Chromosomenbrüchen (und damit von Mikrokernen) in Zusammenhang gebracht werden kann, zeigten hier eine weniger gute Korrelation. So ist dieselbe Zahl von Strangbrüchen bei Ciprofloxacin mit erheblich mehr Mikrokernbildung assoziiert als bei Lomefloxacin, obwohl die Verbindungen chemisch ähnlich sind. Für die oxidativen Basenmodifikationen ist die hier völlig fehlende Korrelation mit der Mikrokernbildung nicht überraschend, da diese Schäden nach bisherigen mechanistischen Kenntnissen wenig klastogen wirken sollten. Denkbar ist, dass AP-Läsionen spontan in solchen Zellzyklusphasen zu Strangbrüchen führen können, in denen eine fehlerfreie Reparatur nicht mehr möglich ist, wie z.B. an einer Replikationsgabel. Es entsteht so ein Chromosomenbruch und nachfolgend ein Mikrokern.

### 5.4.3 Korrelation Phototoxizität-Photogenotoxizität

Die Ergebnisse der Toxizitätsprüfungen der Testsubstanzen wurden den mit der Alkalischen Elution ermittelten Daten gegenübergestellt (**Abb. 4.56**). Der größte toxische Effekt ist mit der Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in zellulärer DNA verbunden (siehe Geradensteigung von **Abb. 4.56, B**: -6,3). Einen ca. 15% schwächeren scheinbaren Einfluss auf die Zelltoxizität zeigte die Induktion von AP-Läsionen (siehe Geradensteigung von **Abb. 4.56, C**: -5,3). Die Entstehung von SSB in zellulärer DNA war mit einer nur halb so stark toxischen Wirkung auf die Zellen verbunden wie die Bildung von oxidativen Basenmodifikationen. Dies kann durch die schnelle Reparatur von SSB in Zellen erklärt werden (siehe **1.5**).

Die durchgeführte Gegenüberstellung der Daten kann zwar einen Hinweis auf die toxische Bedeutung der einzelnen DNA-Schäden geben, auf einen kausalen Zusammenhang darf hier jedoch nicht geschlossen werden. Die entstandenen DNA-Schäden sind wahrscheinlich nicht direkt für die Zelltoxizität verantwortlich, was mit Versuchen an verschiedenen reparaturdefizienten Zelllinien gezeigt werden konnte (Epe, unveröffentlichte Daten). Trotz Reparaturdefekte in den Zellen wurde keine erhöhte Sensitivität der Zellen festgestellt.

Für die einzelnen photoaktivierten Testverbindungen ergab sich folgende Rangfolge in den einzelnen zellulären Versuchsmethoden:

<u>Phototoxizität:</u>	MTB > CPZ > PZ > (DXC) > CIF > LOF
<u>Photogenotoxizität:</u>	
- Comet Assay (TI)	CPZ > MTB > PZ > (DXC) > CIF > LOF
- Alkalische Elution (SSB)	CPZ > MTB > PZ = LOF > (DXC) > CIF
- Mikrokerntest	MTB > CPZ > PZ > CIF > (DXC) > LOF

Doxycyclin darf in dieser Rangfolge nicht gewertet werden, da dessen Prüfung in Behandlungsmedium stattfand und zu Präzipitation der Substanz führte, welches das Ergebnis verfälscht. Innerhalb der untersuchten Stoffe sind Methylenblau und Chlorpromazin die stärksten Photosensibilisatoren. Bemerkenswert ist, dass diese beiden Substanzen ein Phenothiazingrundgerüst besitzen, welches scheinbar förderlich für eine ausgeprägte Photoaktivität ist. Methylenblau wurde hier trotz der Zellschädigung von außen in den Vergleich mit aufgenommen. Promazin zeigt überall eine mittelstarke photoaktive Potenz, während die schwächsten Substanzen das Lomefloxacin und das Ciprofloxacin sind. Dies verdient in sofern größere Beachtung, da das Promazin ursprünglich als nicht photogenotoxische Testsubstanz in die Ringstudie aufgenommen wurde. Die beiden Fluorochinolone zeigen nur geringe Toxizität auf die Zellen, was mit der vermuteten erschwerten Zellgängigkeit in Zusammenhang steht.

## **5.5 Zusammenfassung**

Einige Arzneistoffe verursachen unter dem Einfluss von Sonnenlichtstrahlung folgenschwere Hautveränderungen, welche bei der Therapie mit solchen photosensibilisierenden Pharmaka unerwünschte Nebenwirkungen darstellen. Den krankhaften Veränderungen liegen oft Schädigungen der DNA durch die exogenen Photosensibilisatoren in Verbindung mit Sonnenlicht zugrunde.

Im Zusammenhang mit einer Ringstudie, welche sich mit der Validierung von In-vitro Photogenotoxizitätstests beschäftigte und dazu 11 verblindete Verbindungen (Positiv- und Negativsubstanzen) in 2 Testsystemen (Mikrokerntest und Comet Assay) untersuchte, wurden zusätzliche mechanistische Arbeiten zu ausgewählten Testsubstanzen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden für sechs Photosensibilisatoren aus unterschiedlichen chemischen Substanzklassen erstmals „Fingerabdrücke“ des photoinduzierten DNA-Schadens in Form von Schadensprofilen erstellt. Untersucht wurden das Phenothiazin Chlorpromazin, sowie dessen Derivate 2-Hydroxypromazin, Chlorpromazinsulfoxid und Promazin; die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Lomefloxacin; sowie Doxycyclin und Methylenblau unter Bestrahlung mit künstlich erzeugtem Sonnenlicht (Solarsimulator). Mit Hilfe der Alkalischen Elution bzw. des DNA-Relaxationsassays wurden diese Untersuchungen an zellulärer und zellfreier DNA durchgeführt. Neben Strangbrüchen in der DNA konnten durch den Einsatz von spezifischen DNA-Reparaturenukleasen als Sonden (Fpg-Protein, Endonuklease III und Endonuklease IV), die Mengen an oxidativen Purinmodifikationen, oxidative Pyrimidinmodifikationen und abasische Stellen (AP-Läsionen) bestimmt werden. Die so erhaltenen Schadensprofile erlaubten eine Aussage über die Qualität und die Quantität der DNA-Schädigung. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Photosensibilisatoren je nach Molekülstruktur unterschiedliche genotoxische Effekte nach Art und Ausmaß verursachen. Durch Verwendung von modulierenden Zusätzen wurde die Beteiligung von verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies überprüft. Die so zellfrei ermittelten Ergebnisse lassen wichtige mechanistische Schlüsse auf die zelluläre DNA - Schädigung zu.

Besonders bei den Phenothiazinen zeigten sich interessante Besonderheiten hinsichtlich der DNA-Schädigung. Promazin induziert unter Photoaktivierung, vermutlich über einen reduktiven Angriff an der DNA, eine hohe Anzahl sonst selten beobachteter Läsionen, nämlich abasischen Stellen und Dihydropyrimidine. Photoaktiviertes Chlorpromazin konnte in Zellen unerwarteterweise wahrscheinlich über die Reaktion von Photolyseprodukten mit einem endogenen Chromophor sonnenlichtinduzierte oxidative DNA-Modifikationen verhindern. Eine Schädigung zellfreier DNA fand nur statt, wenn der Photosensibilisator im Überschuss gegenüber den DNA-Basenpaaren vorlag, vermutlich weil ansonsten die Photolyse des Chlorpromazins effektiv durch Interkalation in die DNA verhindert wurde.

---

Ferner gelang der Nachweis einer Alkylierung der DNA durch Chlorpromazin und Sonnenlicht an Hand von Messungen thermolabiler Läsionen in zellfreier DNA.

Die Untersuchungen zu DNA-Schädigungsmechanismen durch Phenothiazine führte unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse von Promazin, 2-Hydroxypromazin und Chlorpromazinsulfoxid schließlich zur Annahme sehr komplexer Photoreaktionen, bei denen je nach Molekülstruktur eine photolytische Abspaltung des Substituenten an C-2 oder die Reaktion zu einem Radikalkation dominiert.

Eine weitere Besonderheit ergab sich bei der Untersuchung von Methylenblau. Dieses konnte zellfrei sehr stark, in Zellen überraschenderweise jedoch nicht oxidative Purinmodifikationen induzieren. Eine Erklärung hierfür dürfte in der kationischen Eigenschaft des Moleküls liegen, welche als solches nicht in die Zelle gelangen kann. Die in der Literatur beschriebene Zellgängigkeit ist vermutlich erst nach einer längeren Zeitspanne, währenddessen eine Reduktion des Methylenblaus an der Zelloberfläche stattfindet, möglich.

Die experimentellen Ergebnisse von Untersuchungen an Fluorchinolonen zeigten eine starke Generierung von DNA-Strangbrüchen in Zellen, welche möglicherweise auf photoinduzierte Reaktionen der Arzneistoffe mit der Topoisomerase II (Säugerzellen) zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem das 8-substituierten Fluorchinolon (Lomefloxacin) eine hohe DNA-schädigende Wirkung besitzt.

Die Korrelation der, bei den verschiedenen Photosensibilisatoren, gemessenen DNA-Schäden mit der Mikrokerninduktion führte zu der Annahme, dass besonders abasische Stellen bei der Entstehung von Mikrokernen eine Rolle spielen könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

Aldridge, K.E., Henderberg, A., Gebbia, K., Schiro, D.D., Janney, A. and Sanders, C.V.: Lomefloxacin, a new fluoroquinolone. Studies on in vitro antimicrobial spectrum, potency, and development of resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 12 (1989) 221-33.

Anon: Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity). *ATLA* 26 (1998) 7-8.

Anon: Commission Directive 2000/33/EC of 25 April 2000, adapting to technical progress for the 27th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulation and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, ANNEX II: B.41, In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. *Off. J. Eur. Commun.* L136 (2000) 90-107.

Api, A.M.: In vitro assessment of phototoxicity. *Toxicol. In Vitro* 10 (1997) 339.

Asahara, H., Wistort, P.M., Bank, J.F., Bakeriam, R.H. and Cunningham, R.P.: Purification and characterisation of *E. coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Biochem.* 28 (1989) 4444-4449.

Babu, V. and Joshi, P.C.: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. *Indian J Biochem Biophys.* 29 (1992) 296-8.

Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T.R. and Laval, J.: Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* formamidopyrimidin DNA glycosylase. *Biochem. J.* 262 (1989) 581-589.

Balls, M., Blaauboer, B., Brusick, D., Frazier, J., Lamb, D., Pemberton, M., Reinhardt, C., Roberfroid, M., Rosenkranz, H., Schmid, B., Spielmann, H., Stamatii, A.-L. and Walum, E.: Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 18 (1990) 313-337.

Barret, J.F., Gootz, T.D., McGuirk, P.R., Farrel, C.A. and Sokolowsky, S.A.: Use of in vitro topoisomerase-II assays for studying quinolone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (1989) 1697-1703.

Barth, J.: Johann Wilhelm Ritter (1776-1810) und die Entdeckung der UV-Strahlung vor 185 Jahren. *Hautarzt* 38 (1987) 301-303.

Bartsch, H. and Nair, J.: New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Europ. Journal of Cancer* 36 (2000) 1229-1234.

Beckmann, I.-A.: Hautkrebs - ein Ratgeber für Betroffene, Angehörige und Interessierte. Deutsche Krebshilfe e.V., Bonn, 2003.

- Beermann, F., Hunziker, A. and Foletti, A.: Transgenic mouse models for tumors of melanocytes and retinal pigment epithelium. *Pigment Cell Res.* 12 (1999) 71-80.
- Ben-Hur, E., Prager, A., Green, M. and Rosenthal, I.: pH Dependence of the phototoxic and photomutagenic effects of chlorpromazine. *Chem. Biol. Interactions* 29 (1980) 223-233.
- Bjellerup, M., Kjellstrom, T. and Ljunggren, B.: Influence of tetracycline phototoxicity on the growth of cultured human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 85 (1985) 573-4.
- Bjellerup, M. and Ljunggren, B.: Photohemolytic potency of tetracyclines. *J. Invest. Dermatol.* 84 (1985) 262-264.
- Boiteux, S.: Properties and biological functions of the NTH and Fpg proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol. B* 19 (1993) 87-96.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroglu, M.: Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31 (1992) 106-110.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A., Laval, J.: Homogenous *Escherichia coli* Fpg protein. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3916-3922.
- Bongard, R.D., Merker, M., Shundo, R., Okamoto, Y., Roerig, D.L., Linehan, J.H. and Dawson, C.A.: Reduction of thiazine dyes by bovine pulmonary arterial endothelial cells in culture. *Am J Physiol.* 269 (1995) 78-84.
- Bonnetblanc, J.M.: [Doxycycline]. *Ann Dermatol Venereol* 129 (2002) 874-82.
- Bredberg, A., Brant, M., Riesbeck, K., Azou, Y. and Forsgren, A.: 4-Quinolone antibiotics: positive genotoxic screening tests despite an apparent lack of mutation induction. *Mutat Res* 211 (1989) 171-180.
- Brendler-Schwaab, S., Czich, A., Epe, B., Gocke, E., Kaina, B., Muller, L., Pollet, D. and Utesch, D.: Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat Res* 566 (2004) 65-91.
- Brendler-Schwaab, S.Y., Kersten, B. and Müller, L.: Detection of photochemical genotoxicity in V79 cells using the photo-comet assay. (2003).
- Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H. and Scharfetter-Kochanek, K.: Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 5279-5287.

- Buchko, G.W., Wagner, J.R., Cadet, J., Raoul, S. and Weinfeld, M.: Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Biochim Biophys Acta.* 1263 (1995) 17-24.
- Buehring, G.C. and Jensen, H.M.: Lack of toxicity of methylene blue chloride to supravivally stained human mammary tissues. *Cancer Res.* 43 (1983) 6039-44.
- Cadet, J., Berger, M., Decarroz, C., Wagner, J.R., Van Lier, V.W., Ginot, Y.M. and Vigny, P.: Photosensitized reactions of nucleic acids. *Biochimie* 68 (1986) 813.
- Caldecott, K.W.: Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssay* 23 (2001) 447-455.
- Chan, H.W.-S.: Autoxidation of unsaturated lipids. London, Academic Press (1987).
- Chetelat, A., Albertini, S., Dresch, J.H., Strobel, R. and Gocke, E.: Photomutagenesis test development I. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in bacterial and yeast assays. *Mutat. Res.* 292 (1993) 241-250.
- Chetelat, A.A., Albertini, S. and Gocke, E.: The photomutagenicity of fluoroquinolones in tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet assay). *Mutagenesis* 11 (1996) 497-504.
- Chignell, C., Motten, A. and Buettner, G.: Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines: relationship to phenothiazine-induced photosensitization. *Environ Health Perspect.* 64 (1985) 103-110.
- Christ, W.: Nutzen/Risiko-Abwägung: Gyrasehemmer (Fluorochinolone)-Spezifische toxikologische Aspekte und Nebenwirkungen. In: Ott, T., Hefendehl, F.-W., Grosdanoff, P., Arzneimittel und Medizinprodukte, Bewertung -Verfahren-Perspektiven. BfArM. 1998 (1998).
- Chung, F.L. and Kochevar, I.E.: Photoreaction of chlorpromazine with DNA. *Am. Chem. Soc. 10th Northeast Annual Meeting, Syracuse* (1979).
- Ciulla, T.A., Epling, G.A. and Kochevar, I.E.: Photoaddition of chlorpromazine to guanosine-5'-monophosphate. *Photochem Photobiol* 43 (1986) 607-13.
- Cleaver, J., Cortes, F., Karentz, D., Lutze, L., Morgan, W., Player, A., L, V. and Mitchell, D.: The relative biological importance of cyclobutane and (6-4) pyrimidine-pyrimidone dimer photoproducts in human cells: evidence from a xeroderma pigmentosum revertant. *Photochem Photobiol.* 48 (1988) 41-9.
- Cline, S.D. and Hanawalt, P.C.: Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Mol. Cell. Biol.* 4 (2003) 361-372.
- Cohen, C., Dossou, K.G., Rougier, A. and R., R.: Episkin: an in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties. *Toxicol. In Vitro* 8 (1994) 669-671.



- COLIPA: Photomutagenicity Task Force, Final report, The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). (1995).
- Cunningham, M.L., Krinsky, N.I., Giovanazzi, S.M. and Peak, M.J.: Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *J Free Radic Biol Med.* 1 (1985) 381-5.
- Curren, R., Southee, J.A., Spielmann, H., Liebsch, M., Fentem, J.H. and Balls, M.: The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. *ATLA* 23 (1995) 211-217.
- Davies, A.K., Navaratnam, S. and Phillips, G.O.: Photochemistry of chlorpromazine (2-chloro-N-(3-dimethyl-aminopropyl)phenothiazine) in propan-2-ol solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans II* 25 (1976) 25-29.
- Davies, M.J. and Truscott, R.J.W.: Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J. Photochem Photobiol. B* 63 (2001) 114-25.
- Day, I., R.S. and Dimattina, M.: Photodynamic action of chlorpromazine on adenovirus 5: repairable damage and single strand breaks. *Chem- Biol. Interactions* 17 (1977) 89.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H.: Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes. Dev.* 13 (1999) 768-785.
- Decuyper, J., Piette, J., Lopez, M., Merville, M.P. and van De Vorst, A.: Induction of breaks in deoxyribonucleic acid by photoexcited promazine derivatives. *Biochem Pharmacol* 33 (1984) 4025-31.
- Decuyper, J., Piette, J., Merville, M.P., Calberg-Bacq, C.M. and Van de Vorst, A.: Lack of singlet oxygen formation by photoexcited promazine derivatives in aqueous and ethanolic solutions. *Radiat Environ Biophys* 22 (1983) 231-4.
- Demple, B. and Linn, S.: DNA N-glycosylases and UV repair. *Nature* 287 (1980) 203-8.
- Dizdaroglu, M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275 (1992) 331-342.
- Doetsch, P.W., Zasatawny, T.H., Martin, A.M. and Dizdaroglu, M.: Monomeric base damage products from adenine, guanine, and thymine induced by exposure of DNA to ultraviolet radiation. *Biochemistry* 34 (1995) 737-42.
- Duez, P., Hanocq, M. and Dubois, J.: Photodynamic DNA damage mediated by delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins. *Carcinogenesis* 22 (2001) 771-8.
- Eger, Troschütz and Roth: *Arzneistoffanalyse: Reaktivität-Stabilität-Analytik.* Deutscher Apothekerverlag Stuttgart 4. Auflage (1999) 678.

- Eichler, M., Lavi, R., Shainberg, A. and Lubart, R.: Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers Surg Med.* 29 (2005) [Epub ahead of print].
- Elliott, J.R.: Kolloquium-Wissenschaft für die Praxis-Comeback der Tetracycline. 67. Jahreskongress des American College of Rheumatology (2004).
- Elsa, S.H., Osherhoff, N. and Nitiss, J.L.: Cytotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13150-13153.
- Elstner, E.F.: *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin.* Bi-Wiss-Verl. Wien (1990).
- Epe, B.: Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions* 80 (1991) 239-260.
- Epe, B.: DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127 (1995) 223-249.
- Epe, B.: DNA damage induced by photosensitizers and other photoreactive compounds. In: B., A.O.I.a.H. (Ed.), *DNA and free radicals: techniques, mechanisms and applications.* OICA International, 1998, pp. 63-96.
- Epe, B., Mützel, P. and Adam, W.: DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vivo. *Chem-Biol. Interactions* 67 (1988) 149-165.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S.: DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res.* 299 (1993) 135-45.
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J. and Rüdiger, H.: Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicol. Lett.* 67 (1993a) 57-72.
- Eppstein, J.H., L.A., B., Peterson, M.C. and Schwarz, B.E.: Study of photosensitivity occurring with chlorpromazine therapy. *J. Invest. Dermatol.* 28 (1957) 329-338.
- Fasani, E., Profumo, A. and Albini, A.: Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem Photobiol* 68 (1998) 666-74.
- Feldmeister, A. and Discher, C.A.: Photodegradation of chlorpromazine hydrochloride. *J. Pharm. Sci.* 53 (1964) 756-762.
- Ferguson, J.: Fluoroquinolone photosensitization: a review of clinical and laboratory studies. *Photochem Photobiol.* 62 (1995) 954-958.
- Ferguson, J.: Photosensitivity due to drugs. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 18 (2002) 262-9.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L. and Schneider, J.E.: Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch Biochem Biophys* 273 (1989) 106-11.

- Foote, C.S.: Photosensitized oxygenations and the role of singlet oxygen. *Acc. Chem. Res.* 1 (1968) 104-110.
- Foote, C.S.: Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 54 (1991) 659.
- Forbes, P.D.: Relevance of animal models of photocarcinogenesis to humans. *Photochem. Photobiol.* 63 (1996) 357-362.
- Fujita, H., Endo, A. and Susuki, K.: Inactivation of bacteriophage lambda by near-ultraviolet irradiation in the presence of chlorpromazine. *Photochem Photobiol.* 33 (1981) 215.
- Fujita, H., Hayashi, H. and Suzuki, K.: Spectrofluorometric study on photochemical interaction between chlorpromazine and nucleic acids. *Photochem. Photobiol.* 34 (1981a) 101-105.
- Fujita, H. and Matsuo, I.: UV-A induced DNA nicking activities of skin photosensitive drugs: phenothiazines, benzothiadiazines and afloqualone. *Chem Biol Interact* 66 (1988) 27-36.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F. and Pelicci, P.G.: Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122 (2005) 221-33.
- Glette, J. and Sandberg, S.: Phototoxicity of tetracyclines as related to singlet oxygen production and uptake by polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 35 (1986) 2883-5.
- Gocke, E.: Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutat Res* 248 (1991) 135-143.
- Gocke, E., Albertini, S., Chetelat, A.A., Kirchner, S. and Muster, W.: The photomutagenicity of fluoroquinolones and other drugs. *Toxicol Lett* 102-103 (1998) 375-81.
- Gocke, E., Muller, L., Guzzie, P.J., Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell, C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H., Snyder, R.D. and Tanaka, N.: Considerations on photochemical genotoxicity: report of the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Working Group. *Environ Mol Mutagen* 35 (2000) 173-84.
- Gollnick, K.: Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv. Photochem.* 6 (1968) 1-22.
- Gorelick, N.J.: Validation issues for the use of transgenic mouse mutation assays in risk assessment. *Prog. Clin. Biol. Res.* 395 (1996) 81-108.
- Grant, F.W. and Greene, J.: Phototoxicity and photonucleophilic aromatic substitution in chlorpromazine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28 (1972) 71-74.

- Hadjimitova, V., Traykov, T., Mileva, M. and Ribarov, S.: Effect of some psychotropic drugs on luminol-dependent chemiluminescence induced by O<sub>2</sub><sup>-</sup>, \*OH, HOCl. *Z Naturforsch [C]* 57 (2002) 1066-71.
- Halliwell, B. and Arouma, O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letters* 281 (1991) 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219 (1984) 1-14.
- Häring, M., Rudiger, H., Demple, B., Boiteux, S. and Epe, B.: Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 2010-5.
- Hassan, T., Kochevar, I.E., McAuliffe, B.S., Cooperman, B.S. and Abdulah, D.: Mechanism of tetracycline phototoxicity. *J. Invest. Dermatol.* 83 (1984) 179-183.
- Henderson, L., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S., Fletcher, S. and Lovell, W.: Photomutagenicity assays in bacteria: factors affecting assay design and assessment of photomutagenic potential of para-aminobenzoic acid. *Mutagenesis* 9 (1994) 459-465.
- Herbold, B.A., Brendler-Schwaab, S. and Ahr, H.J.: Ciprofloxacin: in vivo genotoxicity studies. *Mutat Res* 498 (2001) 193-205.
- Hlavka, J.J. and Bitha, P.: A photodeamination. *Tetrahedron Lett.* 32 (1966) 3843-46.
- Holzgrabe, U.: Gyrasehemmer im Abwind? *Pharmazeutische Zeitung* 42 (2000).
- Hölzle, E.: *Photodermatosen und Lichtreaktionen der Haut.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2003).
- Horio, T.: Chlorpromazine photoallergy. *Arch Dermatol* 111 (1975) 1469-1471.
- Hunter, J.A.A., Bhutani, I.K. and Magnus, I.A.: Chlorpromazine photosensitivity in mice: its action spectrum and the effect of inflammatory agents. *Br. J. Dermatol.* 82 (1970) 157-168.
- Hüttermann, J.: Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *J. Ultramicroscopy* 10 (1982) 25-40.
- Iwakowa, T. and Kondo, M.: Mechanistic studies on the photooxidation of chlorpromazine in water and ethanol. *Bull. chem. Soc.* 47 (1974) 980-986.
- Jacobs, A., Avalos, J., Brown, P. and Wilkin, J.: Does photosensitivity predict photocarcinogenicity? *Int. J. Toxicol.* 18 (1999) 191-198.
- Jacobs, A., Brown, P. and Wilkin, J.: Letter to the editor. *Int. J. Toxicol.* 19 (2000) 67-68.
- Jeding, I., Evans, P.J., Akanmu, D., Dexter, D., Spencer, J.D., Arouma, O.I., Jenner, P. and Halliwell, B.: Characterization of the potential antioxidant and pro-

- oxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem Pharmacol* 49 (1995) 359-65.
- Jeffrey, A.M., Shao, L., Brendler-Schwaab, S.Y., Schluter, G. and Williams, G.M.: Photochemical mutagenicity of phototoxic and photochemically carcinogenic fluoroquinolones in comparison with the photostable moxifloxacin. *Arch Toxicol* 74 (2000) 555-9.
- Johnson, B.E.: Cellular mechanisms of chlorpromazine photosensitivity. *Proc. Roy. Soc. Med.* 67 (1974) 871-873.
- Jones, P.A., Lovell, W.W., King, A.V. and Earl, L.K.: In vitro testing for phototoxic potential using the epiderm 3-D reconstructed human skin model. *Toxicol. Methods* 11 (2001) 1-19.
- Jose, J.G.: Photomutagenesis by chlorinated phenothiazine tranquilizers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (1979) 469-472.
- Kahn, G. and Davies, B.P.: In vitro studies on longwave ultraviolet light dependent reactions of the skin photosensitizer chlorpromazine with nucleic acids, purines and pyrimidines. *J. Invest. Dermatol.* 55 (1970) 47-51.
- Karreman, G., Isenberg, I. and Szent-Gyorgyi, A.: On the mechanism of action of chlorpromazine. *Science* 130 (1959) 1191-2.
- Kelly-Garvert, F. and Legator, M.S.: Photoactivation of chlorpromazine: cytogenetic and mutagenic effects. *Mutat. Res.* 21 (1973) 101-105.
- Kersten, B., Kasper, P., Brendler-Schwaab, S.Y. and Muller, L.: Use of the photo-micronucleus assay in Chinese hamster V79 cells to study photochemical genotoxicity. *Mutat Res* 519 (2002) 49-66.
- Kersten, B., Zhang, J., Brendler-Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Muller, L.: The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat Res* 445 (1999) 55-71.
- Klecak, G., Urbach, F. and Urwyler, H.: Fluoroquinolones antibacterial enhance UVA-induced skin tumors. *J. Photochem Photobiol. B* 37 (1997) 174-181.
- Knowles, A.: A mechanism for the methylene blue sensitized oxidation of nucleotides. *Photochem Photobiol.* 13 (1971) 473-87.
- Kochevar: Phototoxicity Mechanisms: Chlorpromazine Photosensitized Damage to DNA and Cell Membranes. *Journal of Investigative dermatology* 76 (1981) 59-64.
- Kochevar, I.E., Chung, F.L. and Jeffrey, A.M.: Photoaddition of chlorpromazine to DNA. *Chem Biol Interact* 51 (1984) 273-84.
- Kochevar, I.E. and Dunn, D.A.: Photosensitized reactions of DNA: cleavage and addition. *Bioorganic Photochemistry* 1 (1990) 273-316.

- Kochevar, I.E., Garcia, C. and Geacintov, N.E.: Photoaddition to DNA by nonintercalated chlorpromazine molecules. *Photochem Photobiol* 68 (1998) 692-7.
- Kochevar, I.E. and Lamola, A.A.: Chlorpromazine and protriptyline phototoxicity: photosensitized, oxygen independent red cell hemolysis. *Photochem Photobiol* 29 (1979) 791-6.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A.G., Friedman, C.A.: Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15 (1976) 4629-4637.
- Lambert, L.A., Warner, W.G. and Kornhauser, A.: Animal models for phototoxicity testing. *Dermatotoxicology* (1996) 515-530.
- Lehmann, P.: Heliotrope Erkrankungen-Diagnostik und Therapie. *Dtsch med Wochenschr* 2004 (2004) 259-266.
- Levin, J.D., Johnson, A.W. and Demple, B.: Homogenous Escherichia coli endonuclease IV. Characterisation of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 8066-8071.
- Levy, L., Tozer, T.N., Tuck, L.D. and Loveland, D.B.: Stability of some phenothiazine free radicals. *J Med Chem.* 15 (1972) 898-905.
- Liebsch, M., Döring, B., Donnelly, T.A., Logemann, P., Rheins, L.A. and Spielmann, H.: Application of the human dermal model Skin2 ZK 1350 to phototoxicity and skin corrosivity testing. *Toxicol. In Vitro* 9 (1995) 557-562.
- Liebsch, M. and Spielmann, H.: Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. *Toxicol. In Vitro* 8 (2002) 669-671.
- Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E. and Haseltine, W.A.: Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci* 78 (1981) 3388-92.
- Ljunggren, B.: Phenothiazine phototoxicity: toxic chlorpromazine photoproducts. *J Invest Dermatol* 69 (1977) 383-6.
- Ljunggren, B., Cohen, S.R., Carter, D.M. and Wayne, S.I.: Chlorpromazine phototoxicity: growth inhibition and DNA-interaction in normal human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 75 (1980) 253-6.
- Ljunggren, B. and Moller, H.: Phenothiazine phototoxicity: an experimental study on chlorpromazine and its metabolites. *J Invest Dermatol* 68 (1977) 313-7.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W. and Robertson, D.L.: Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry* 17 (1978) 1890-1896.
- Loeb, L.A.: a mutator phenotype in cancer. *Cancer Research* 61 (2001) 3230-3239.

- Loperino, N.: In vitro assay systems for testing photomutagenic chemicals. *Mutagenesis* 6 (1991) 331-333.
- Loveday, K.S.: Interrelationship of photocarcinogenicity. *J. Photochem. Photobiol.* 63 (1996a) 369-372.
- Loveday, K.S.: Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochem Photobiol.* 63 (1996b) 369-372.
- Mahler, H.C.: Einfluss endogener und exogener Faktoren auf Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden. Dissertation (1999).
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H. and Pallauf, J.: Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ* 140 (1995) 2313-2327.
- Marrot, L. and Agapakis-Cause, C.: Differences in the photogenotoxic potential of two fluoroquinolones as shown in diploid yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*) and supercoiled plasmid DNA. *Mutat Res* 468 (2000) 1-9.
- Marrot, L., Belaidi, J.P., Chaubo, C., Meunier, J.R., Perez, P. and Agapakis-Cause, C.: Fluoroquinolones as chemical tools to define a strategy for photogenotoxicity in vitro assessment. *Toxicol In Vitro* 15 (2001) 131-42.
- Martin, J.P., Jr., Colina, K. and Logsdon, N.: Role of oxygen radicals in the phototoxicity of tetracyclines toward *Escherichia coli* B. *J Bacteriol* 169 (1987) 2516-22.
- Martinez, L. and Chignell, C.F.: Photocleavage of DNA by the fluoroquinolone antibacterials. *J Photochem Photobiol B* 45 (1998) 51-9.
- Martinez, L.J., Li, G. and Chignell, C.F.: Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem Photobiol* 65 (1997) 599-602.
- May, J.M., Qu, Z. and Cobb, C.E.: Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) 1390-98.
- McBride, T.J., Schneider, J.E., Floyd, R.A. and Loeb, L.A.: Mutations induced by methylene blue plus light in single-stranded M13mp2. *Proc Natl Acad Sci* 89 (1992) 6866-70.
- McQueen, C.A., Way, B.M., Queener, S.M., Schlüter, G. and Williams, G.M.: Study of potential in vitro and in vivo genotoxicity in hepatocytes of quinolone antibiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111 (1991) 255-262.
- Merkle, F.H., Discher, C.A. and Felmeister, A.: Separation and investigation of a stable solid free radical of chlorpromazine. *J Pharm Sci.* 53 (1964) 965-6.
- Merville, M.P., Piette, J., Decuyper, J., Calberg-Bacq, C.M. and van de Vorst, A.: Phototoxicity of phenothiazine derivatives. II. Photosensitized cross-linking of erythrocyte membrane proteins. *Chem Biol Interact* 44 (1983) 275-87.

- Meunier, J.R., Sarasin, A. and Marrot, L.: Photogenotoxicity of mammalian cells: a review of the different assays for in vitro testing. *Photochem Photobiol.* 75 (2002) 437-47.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollmann, A.P. and Miller, J.H.: Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidative damaged form of guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992) 7022-7025.
- Mitchell, D.L. and Nairn, R.S.: The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol.* 49 (1989) 805-19.
- Moore, D.E.: Photosensitization by drugs. *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1282-1284.
- Motten, A.G., Buettner, G.R. and Chignell, C.F.: Spectroscopic studies of cutaneous photosensitizing agents, VIII. A spin trapping study of light induced free radicals from chlorpromazine and promazine. *Photochem Photobiol.* 42 (1983) 9-16.
- Müller, L. and Kasper, P.: The relevance of photomutagenicity testing as a predictor of photocarcinogenicity. *Int. J. Toxicol.* 17 (1998) 551-558.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K. and Sekiguchi, M.: Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2556-2562.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K., Sekiguchi, M.: Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J Biol Chem.* 257 (1982) 2556-2562.
- Nataraj, A.J., Black, H.S. and Ananthaswamy, H.N.: Signature p53 mutation at DNA cross-linking sites in 8-methoxypsoralen and ultraviolet A (PUVA)-induced murine skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 7961-7965.
- Nilsson, R., Swanbeck, G. and Wennersten, G.: Primary mechanisms of erythrocyte photolysis induced by biological sensitizers and phototoxic drugs. *Photochem Photobiol.* 22 (1975) 183-186.
- Norden, B. and Tjerneld, F.: Structure of methylene blue-DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biopolymers.* 21 (1982) 1713-34.
- O'Connor, T.R., Graves, R.J., de Murcia, G., Castaing, B. and Laval, J.: Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9063-9070.
- OECD Test, G.P.: ENV/MC/CHEM/TG(96): Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Methods. (1996).
- OhUigin, C., McConell, D.J., Kelly, J.M. and Van der Putten, W.J.M.: Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 7411-27.



- Pape, W.J.W., Maurer, T., Pfannebecker, U. and Steiling, W.: The red blood cell phototoxicity test (photohemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity. *ATLA* 29 (2001) 145-162.
- Pegg, A.E.: Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* 462 (2000) 83-100.
- Pflaum, M.: Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht, Institut für Pharmazie. Universität Würzburg, Würzburg, 1996.
- Pflaum, M., Boiteux, S. and Epe, B.: Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 15 (1994) 297-300.
- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B.: Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (1997) 2225-31.
- Pflaum, M., Will, O., Mahler, H.C. and Epe, B.: DNA oxidation products determined with repair endonucleases in mammalian cells: types, basal levels and influence of cell proliferation. *Free Radic Res* 29 (1998) 585-94.
- Photomutagenicity Task Force: Final report, The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). (1995).
- Piette, J.: Alkaline labilization of DNA photosensitized by promazine derivatives. *Biochem Pharmacol.* 1 (1987) 3701-6.
- Piette, J., Decuyper, J. and Van der Horst, A.: DNA alterations photosensitized by tetracycline and some of its derivatives. *J. Invest. Dermatol.* 86 (1986a) 653-8.
- Piette, J., Merviolle-Louis, M.P. and Decuyper, J.: Damage induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem Photobiol.* 44 (1986b) 793-802.
- Rosen, J.E., Prahalad, A.K., Schluter, G., Chen, D. and Williams, G.M.: Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells. *Photochem Photobiol* 65 (1997) 990-6.
- Rosenthal, I., Ben-Hur, E., Prager, A. and Riklis, E.: Photochemical reactions of chlorpromazine, chemical and biochemical implications. *Photochem Photobiol.* 28 (1978) 591-594.
- Rudzki, E.: Occupational dermatitis among health service workers. *Dermatosen* 27 (1979) 112-125.
- Sackett, P.H. and McCreery, R.L.: Effect of structure on phenothiazine cation radical reactions in aqueous buffers. *J. Med. Chem.* 22 (1979) 1447-53.
- Saito, I., Inoue, K. and Matsuura, T.: Occurrence of the singlet-oxygen mechanism in photodynamic oxidations of guanosine. *Photochem Photobiol.* 21 (1975) 27-30.

- Salditt, M., Braunstein, S.N., Camerini-Otero, R.D. and Franklin, R.M.: Structure and synthesis of a lipid containing bacteriophage. Improved techniques for the purifications of bacteriophage PM2. *Virology* 48 (1972) 259-262.
- Sancar, G.B.: Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat. Res.* 451 (2000) 25-37.
- Sanchez, G., Hidalgo, M.E., Vivanco, J.M. and Escobar, J.: Induced and Photoinduced DNA Damage by Quinolones: Ciprofloxacin, Ofloxacin and Nalidixic Acid Determined by Comet Assay paragraph sign. *Photochem Photobiol* 81 (2005) 819-22.
- Sass, M.D., Caruso, C.J. and Axelrod, D.R.: Accumulation of methylene blue by metabolizing erythrocytes. *Lab Clin Med.* 69 (1967) 447-55.
- Saucin, M. and Van der Horst, A.: Photodynamic potentialities of some phenothiazine derivatives. *Radiat. Environ, Biophys.* 17 (1980) 159-168.
- Schieberle, P. and Grosch, W.: Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 173 (1981) 192-198.
- Schirmer, R.H., Coulibaly, B., Stich, A., Scheiwein, M., Merkle, H., Eubel, J., Becker, K., Becher, H., Muller, O., Zich, T., Schiek, W. and Kouyate, B.: Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox. Rep.* 8 (2003) 272-5.
- Schneider, J.E., Price, S., Cutteridge, J.M.C. and Floyd, R.A.: Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 631-635.
- Schoonderwoerd, S.A., Beijersbergen van Henegouwen, G.M. and Luijendijk, J.J.: Photobinding of chlorpromazine and its sulfoxide in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol* 48 (1988) 621-6.
- Schoonderwoerd, S.A., Beijersbergen van Henegouwen, G.M. and van Belkum, S.: In vivo photodegradation of chlorpromazine. *Photochem Photobiol* 50 (1989) 659-64.
- Schulz, K.H., Wiskemann, A. and Wolf, K.: Klinische und experimentelle Untersuchungen über die photodynamische Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten, insbesondere von Megaphen. *Arch. klin. Derm.* 202 (1956) 285-298.
- Sedgwick, B.: Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 148-57.
- Shea, C.R., Olack, G.A., Morrison, H., Chen, N. and Hasan, T.: Phototoxicity of lumidoxycycline. *J Invest Dermatol.* 101 (1993) 329-33.
- Shen, L.L. and al., e.: Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: A Cooperative Drug-DNA Binding Model. *Biochem.* 28 (1989) 3886-3894.

- Shen, L.L. and Chu, D.T.W.: Typ II DNA Topoisomerase as Antibacterial Targets. *Curr. Pharm. Des.* 2 (1996) 195-208.
- Shen, L.L., Tanaka, S.K. and Chu, D.T.W.: Quinolones, 2-Pyridones and Resistant Type II DNA Topoisomerases. *Curr. Pharm. Des.* 3 (1997) 169-176.
- Sies, H.: Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Res.* 299 (1993).
- Singh, N.P.e.a.: A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- Snyder, R.D. and Cooper, C.S.: Photogenotoxicity of fluoroquinolones in Chinese hamster V79 cells: dependency on active topoisomerase II. *Photochem Photobiol* 69 (1999) 288-93.
- Southorn, P.A. and Powis, G.: Free radicals in medicine. *Mayo. Clin. Proc.* 63 (1988) 381-389.
- Southorn, P.A. and Powis, G.: Free radicals in medicine. *Mayo. Clin. Proc.* 63 (1988) 381-389.
- Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannebecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A.: EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in vitro* 8 (1994) 793-796.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannebecker, U., Potthast, J., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P.: EU/COLIPA "In-vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial) part 1:3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in vitro* 12 (1998) 305-327.
- Spielmann, H., Müller, D., Averbek, M., Balls, M., Brendler-Schwaab, S., Castell, J.V., Curren, O., De Silva, O., Gibbs, N.K., Liebsch, M., Lovell, W.W., Merk, H.F., Nash, J.F., Neumann, N.J., Pape, W.J.W., Ulrich, P. and Vohr, H.W.: The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 42. *ATLA* 28 (2000) 777-814.
- Spratt, T.E., Schultz, S.S., Levy, D.E., Chen, D., Schluter, G. and Williams, G.M.: Different mechanisms for the photoinduced production of oxidative DNA damage by fluoroquinolones differing in photostability. *Chem Res Toxicol* 12 (1999) 809-15.
- Umezawa, N., Arakane, K., Ryu, A., Mashiko, S., Hirobe, M. and Nagano, T.: Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by quinolone antibacterial agents. *Archives of Biochem Biophys* 342 (1997) 275-81.

- Verna, L.K., Chen, D., Schluter, G. and Williams, G.M.: Inhibition by singlet oxygen quenchers of oxidative damage to DNA produced in cultured cells by exposure to a quinolone antibiotic and ultraviolet A irradiation. *Cell Biol Toxicol* 14 (1998) 237-42.
- Wallace, S.S.: AP endonucleases and DNA glycosylases that recognizes oxidative DNA damage. *Environm. Molec. Mutagen.* 12 (1988) 431-477.
- Waskell, L.A., Sastry, K.S. and Gordon, M.P.: Studies on the photosensitized breakdown of guanosine by methylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 129 (1966) 49-53.
- Will, O.: Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch Ro 19-8022 in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturenukleasen. Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg (1995).
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., I., S., Pflaum, M., Mahler, H. and Epe, B.: Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutation Res.* 435 (1999) 89-101.
- Wood, R.D., Mitchell, Michael, Sgouros, John, Lindahl, Thomas: Human DNA repair genes. *Science* 291 (2001) 1284-1289.
- Wright, R.O., Lewander, W.J. and Woolf, A.D.: Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann. Emerg. Med.* 34 (2004) 646-56.
- Wurm, G., et al: N.N. Monographien in: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Band 1, 5. Auflage (1990) 550,558.
- Yeung, P.K., Hubbaud, J.W., Cooper, J.K. and Midha, K.K.: A study of the kinetics of chlorpromazine sulfoxide by a specific radioimmunoassay after a single oral dose of chlorpromazine in healthy volunteers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226 (1983) 833-838.
- You, Y.H., Lee, D.H., Yoon, J.H., Nakajima, S., Yasui, A. and Pfeifer, G.P.: Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem.* 276 (2001) 44688-94.
- ZCT: Lomefloxacin zur lokalen Anwendung am Auge. *Zeitschrift für Chemotherapie* 4 (2000).
- Zhang, T., Li, J.L., Ma, X.C., Xin, J. and Tu, Z.H.: Reliability of phototoxic tests of fluoroquinolones in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 24 (2003) 453-459.
- Zhang, T., Li, J.L., Xin, J., Ma, X.C. and Tu, Z.H.: Compare two methods of measuring DNA damage induced by photogenotoxicity of fluoroquinolones. *Acta Pharmacol Sin* 25 (2004) 171-5.



