

Photoaktive Substanzen und deren Einfluss auf die Bildung von CPD-Schäden



Abschlussbericht der Kooperationsphase 2019/2020

Durchgeführt am Institut für Organische Chemie (IOC), Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter Betreuung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht, Fabienne Speck und Arthur Kuhlmann.

Amelie Zabler
Rintheimer Hauptstraße 130
76131 Karlsruhe
zableram@hector-seminar.de

Carina Blache
Frühmessweinberg 16
76646 Bruchsal
blacheca@hector-seminar.de

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	3
1 Einleitung	4
2 Material und Methode.....	5
2.1 DNA-Synthese und Analyse	5
2.1.1 DNA-Festphasensynthese.....	5
2.1.2 Aufreinigung über Glen-Pak™	8
2.1.3 High performance liquid chromatography (HPLC)	9
2.1.4 Massenspektrometrie	10
2.2 Photosensibilisierende Substanzen.....	10
2.2.1 Stoffe	10
2.2.2 Spektroskopie	12
2.3 Hybridisierung	12
2.4 Belichtung	13
2.5 CPD-Schäden	14
2.6 Gelelektrophorese.....	14
3 Ergebnisse und Diskussion	15
3.1 DNA-Synthese und -Analyse.....	15
3.1.1 Tritylmonitor	15
3.1.2 HPLC	16
3.1.3 Massenspektrometrie	17
3.2 Spektroskopie der photosensibilisierenden Substanzen.....	18
3.3 Gelelektrophorese.....	19
3.4 Ausbeutebestimmung der CPD-Schäden	20
3.5 Vergleich der Sensibilisatoren.....	21
4 Fazit und Ausblick	22
5 Danksagung.....	23
6 Quellenverzeichnis	24
7 Abkürzungsverzeichnis.....	25
8 Chemikalienverzeichnis.....	25
9 Anhang.....	26
9.1 Spektroskopie	26
10 Selbstständigkeitserklärung	30

Abstract

Taking certain drugs like antibiotics and the additional exposure to sunlight often cause side effects such as sunburn and other skin reactions. Therefore, many package inserts of drugs with specific ingredients, such as one of our test substances, ketoprofen, recommend protecting the treated skin from sunlight.

These photoactive substances are also called photosensitizers. When irradiated with light of the appropriate wavelength, photosensitizers achieve excited states with high energy. This energy can be transferred to molecules for instance the DNA. If such high-energy radiation strikes DNA, it can be damaged, which leads to mutations and cancer such as skin cancer being one of the most common form of cancer in Germany.

The aim of the project is to test substances that are suspected of photochemical reactions, and thus trigger DNA damage in form of so-called CPD. CPD occurs when two pyrimidine bases react through a [2+2] cycloaddition together, whereby the single strand forms a kink. Thus, the thymine bases cannot trigger hydrogen bonds to the complementary adenine pair anymore. Hence, during replication, the bases can no longer be read, and a frameshift mutation occurs, which leads to cancer and other diseases.

The series of experiments came to the results that there is a connection between photoactive substances being exposed to a specific wavelength of 365 nm and CPD, confirming that there is a serious risk of the consumption of such substances as ingredients of essential oils, painkillers or cosmetics.

1 Einleitung

Die Erbsubstanz in unseren Zellen ist täglich vielen äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Strahlung ausgesetzt. Insbesondere der ultravioletten, energiereichen Anteil des Sonnenlichts ist in der Lage, das Erbgut zu schädigen. Während die UV-C-Strahlung und ein Großteil der UV-B-Strahlung von der stratosphärischen Ozonschicht absorbiert werden, kann die verbleibende UV-A-Strahlung die Erbsubstanz indirekt oder direkt beeinflussen. Trifft sie auf photoaktive Substanzen, die z. B. als Wirk- oder Zusatzstoffe in Kosmetik- oder Arzneimitteln enthalten sind, können diese die Energie auf die Erbsubstanz übertragen. Sie werden daher auch als Photosensibilisatoren bezeichnet.

Die DNA wird durch die energiereiche Strahlung auf ein höheres Energieniveau angehoben und ist dadurch in der Lage, photochemische Reaktionen einzugehen. Dabei können beispielsweise Basen der DNA miteinander über eine [2+2]-Cycloaddition reagieren. Dreiviertel dieser Schäden sind vom so genannten CPD-Typ. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere entstehen, wenn benachbarte Pyrimidinbasen kovalente Bindungen ausbilden und somit die Basenpaarung durch Wasserstoffbrücken zum komplementären DNA-Strang stören (Abb. 1).

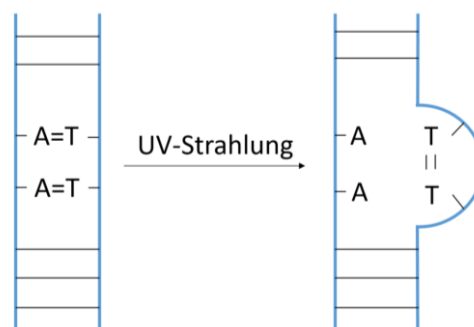


Abbildung 1 Entstehung von CPD-Schäden

Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere blockieren bei der Replikation der DNA die DNA-Polymerase. Im komplementären Strang fehlen zwei Adenin-Nukleotide und es kommt durch Deletion zweier Basen zu einer Frameshift-Mutation oder zu einem Kettenabbruch. Die Folgen sind häufig schwerwiegend, da das Leseraster verändert wird und somit falsche Basentriplets bzw. Codons, die für andere Aminosäuren codieren, entstehen. In fast allen Fällen geht die Funktion des Polypeptids verloren. Sind Proteine betroffen, die bei der Regulation der Zellteilung beteiligt sind, kann dies zu Krebs führen (Graw 2015:418).

Ziel des Projektes ist es, den Einfluss von photoaktiven Substanzen, die im Verdacht stehen DNA-Schäden auszulösen, zu untersuchen. Dazu werden kurze DNA-Einzelstränge synthetisiert, in Gegenwart von photoaktiven Substanzen mit UV-A-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt und die entstandene Menge an CPD-Schäden bestimmt.

2 Material und Methode

2.1 DNA-Synthese und Analyse

Unter einer Synthese versteht man die Verknüpfung mehrerer Einzelbestandteile zu einer Einheit. In diesem Fall wurden DNA-Nukleotide zu einem 12mer und einem 21mer langem Einzelstrang zusammengesetzt. Die Wirkung der photoaktiven Substanzen sollte anhand diesen untersucht werden. Die Einzelstränge wurden in einem DNA-Synthesizer (Abb. 2) mittels Festphasensynthese hergestellt.



Abbildung 2 DNA -Synthesizer

Folgende DNA-Sequenzen wurden hergestellt:

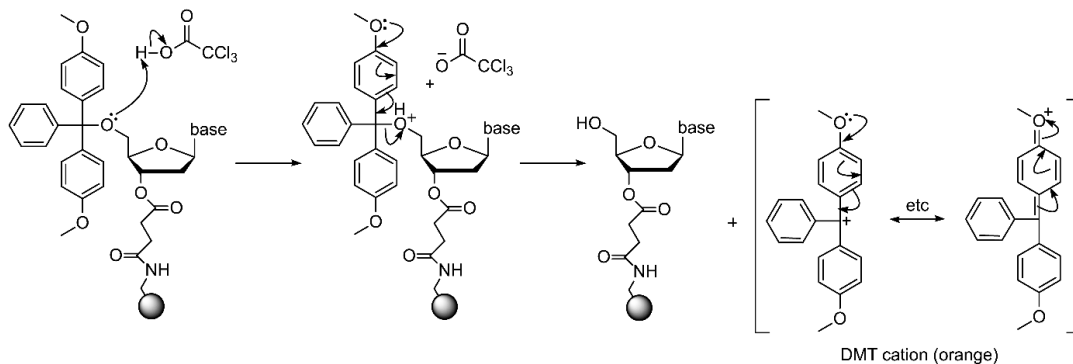
3'-G-C-G-T-A-T-A-T-A-A-T-A-T-A-C-G-C-G-C-A-G-5'
(langer Strang aus 21 Nucleotiden)

5'-T-A-T-A-T-G-C-G-C-G-T-C-3'
(kurzer Strang aus 12 Nucleotiden)

2.1.1 DNA-Festphasensynthese

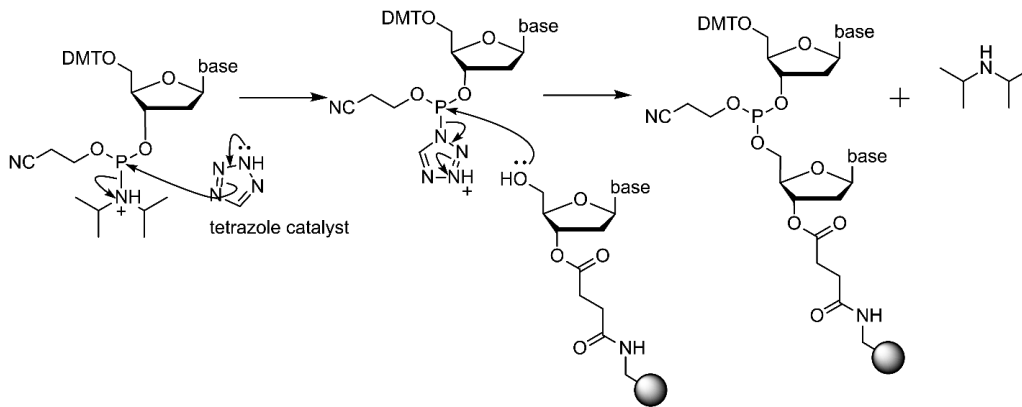
Mit einem DNA-Synthesizer können Oligonukleotide, z. B. aus wenigen DNA- oder RNA-Nukleotiden aufgebaute Oligomere, hergestellt werden. An einem festen Träger, dem Controlled Pore Glas (CPG), befindet sich ein über einen Linker fixiertes Nukleosid, an welches weitere Nucleotide gekoppelt werden können. Die Reaktion verläuft in folgenden vier Teilschritten: Entschützung, Kupplung, Capping und Oxidation.

1. Entschützung



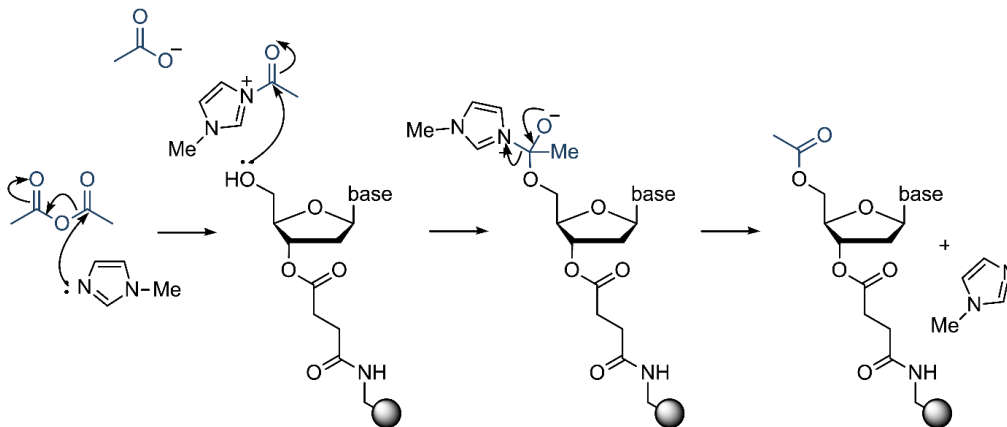
Im ersten Schritt, der Entschützung, wird die 4,4-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe mithilfe einer 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan abgespalten. Das abgespaltene DMT-Kation färbt die Lösung orange. Die DMT-Konzentration kann über einen Detektor quantitativ bestimmt werden und zeigt, wie erfolgreich die Reaktion war.

2. Kupplung



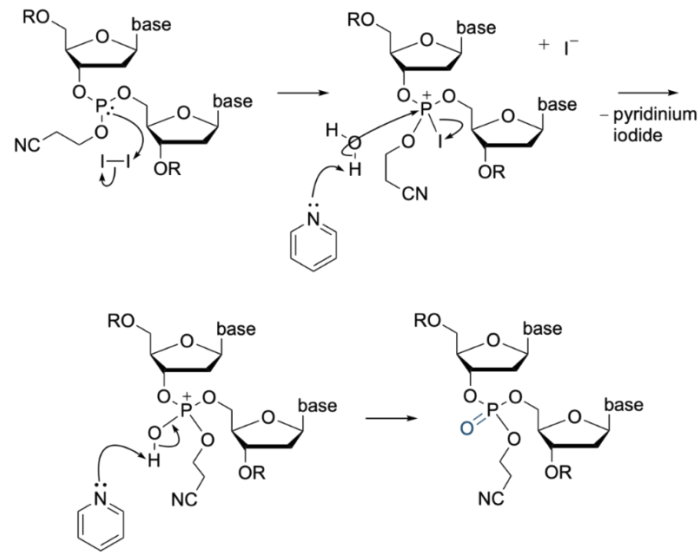
An den zuvor entschützten Zucker wird das gewünschte Nucleosid gekoppelt. Als Reagenz werden Phosphoramidite der Nucleoside verwendet. Die Base wird durch einen Tetrazol-Katalysator am Phosphor aktiviert und es kommt zu einem nukleophilen Angriff der zuvor entschützten Hydroxyl-Gruppe an dem aktivierten Phosphoratom.

3. Capping



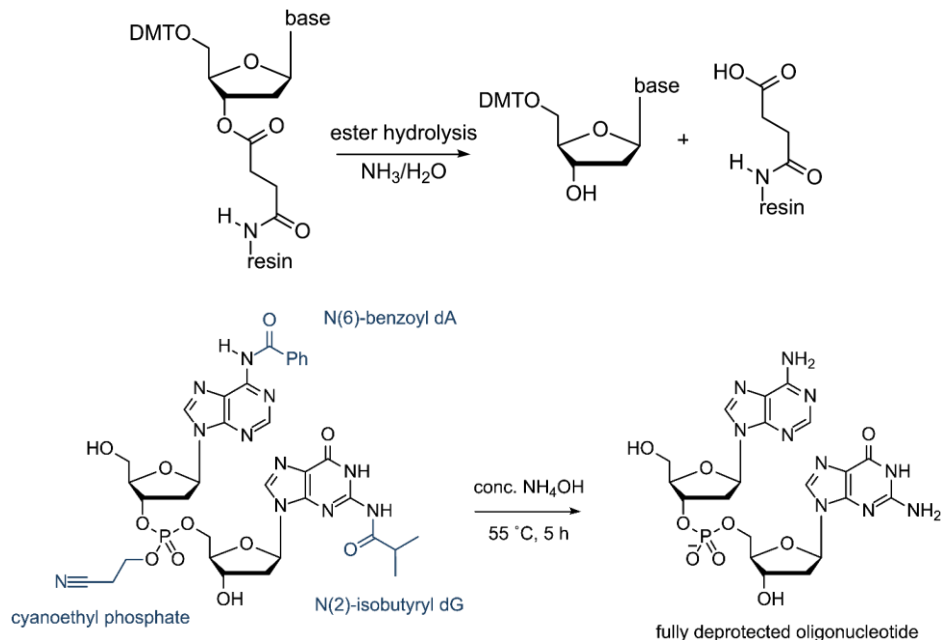
In dem Syntheseschritt werden zwei Lösungen eingeleitet: Der Cap A Mix (10 % Essigsäureanhydrid, 10 % Pyridin, 80 % Tetrahydrofuran) und der Cap B Mix (16 % 1-Methylimidazol, 84 % Tetrahydrofuran). Dadurch wird verhindert, dass an kürzere Abbruchstränge, die bei einer nicht erfolgreichen Kupplung entstehen, weitere Nucleoside binden können.

4. Oxidation



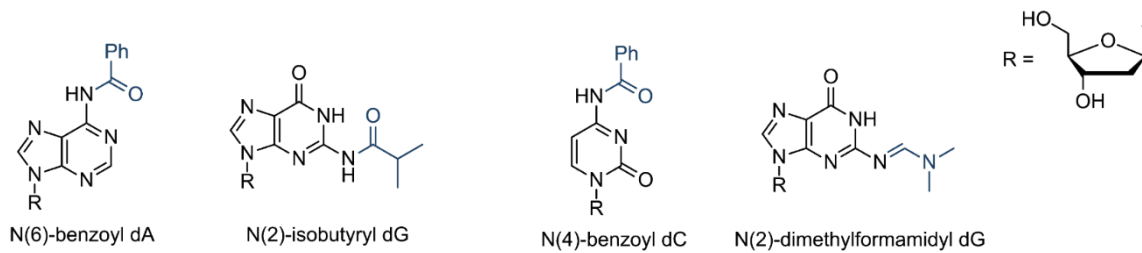
Im 4. Schritt findet eine Oxidation von Phosphor (III) zu stabilerem Phosphor (V) statt. Phosphor (V) wird für die weitere Synthese benötigt. Dies geschieht mittels einer Iod-Lösung (in 2 % Wasser, 20 % Pyridin, 78 % Tetrahydrofuran-Lösung). Die 2-Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphor bleibt dabei erhalten.

5. Abspaltung und Entschützung



Bei dem abschließenden Reaktionsschritt werden die Schutzgruppen der Basen und der DNA-Strang von der festen Phase abgespalten. Der Vorgang läuft unter Zugabe von 25%iger wässriger Ammoniak-Lösung ab.

Schutzgruppen:



Je nach Base werden verschiedene Schutzgruppen verwendet. Die Benzoyl-Schutzgruppe wird bei Adenin und Cytosin, die Isobutyryl- oder Dimethylformamidyl-Schutzgruppe bei Guanin verwendet. Für Thymin ist keine Schutzgruppe notwendig („Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis“).

Abschließend wird die CPG-gebundene DNA aus dem Synthesizer entnommen und im Vakuum gefriergetrocknet (lyophilisiert).

Bevor die DNA aufgereinigt werden kann, wird diese aus der Kartusche, in welcher sie synthetisiert wurde, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Über Nacht wird die DNA in einer wässrigen Ammoniak-Lösung vom Controlled Pore Glas (CPG), dem festen Träger, abgespalten. Der Ammoniak wird anschließend unter vermindertem Druck abdestilliert.

Die noch im Wasser gelöste DNA und das CPG werden für mehrere Sekunden zentrifugiert. Dabei setzt sich das CPG ab und es bildet sich eine klare, darüber liegende Phase. Diese muss in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt werden. Unter Zugabe von destilliertem Wasser werden in insgesamt drei Waschgängen die noch verbliebenen DNA-Reste vom CPG-Sediment abpipettiert.

2.1.2 Aufreinigung über Glen-Pak™

Das Glen-Pak Verfahren basiert auf Wechselwirkungen mit der DMT-Schutzgruppe. Die gelöste DNA wird in ein sogenanntes Glen-Pak DNA Purification Cartridge eingesetzt. Die DMT-Schutzgruppe, und somit die DNA, bleibt am Material der Patrone haften, während die Abbruch-Sequenzen nicht gebunden wurden. Diese werden durch zweimaliges Waschen mit 1 ml Salzlösung (856 µl 4M NaCl + 100 µl MeCN + 1144 µl H₂O) entfernt.

Anschließend werden die synthetisierten Stränge von der DMT-Schutzgruppe durch wiederholte Zugabe von 1 ml 2%igem TFA abgespalten. TFA, sowie überschüssiges Salz werden durch zweimaliges Spülen mit je 1 ml deionisiertem Wasser entfernt. Im letzten Schritt wird die synthetisierte DNA aus dem Cartridge durch 1 ml 50%iges Acetonitril in Wasser, welches 0,5 % Ammoniakwasser enthält, gespült. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wird die aufgereinigte DNA aufgefangen und erneut lyophilisiert (Abb. 5). Das Glen-Pak Verfahren wurde sowohl mit dem langen als auch mit dem kurzen DNA-Strang durchgeführt.

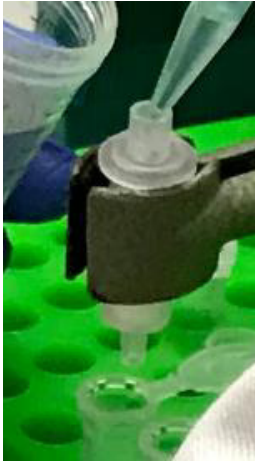


Abbildung 3
Eingespanntes Cartridge



Abbildung 4 Lösung wird
in Cartridge gegeben



Abbildung 5
Gefriergetrocknete DNA

2.1.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein Verfahren, bei dem verschiedene chemische Substanzen aufgrund ihrer Länge und Polarität getrennt werden. Ziel ist es, kürzere Abbruchstränge oder Stoffe, die bei der Synthese entstanden sind und durch die Glen-Pak Aufreinigungsschritte nicht entfernt wurden, zu beseitigen. Die DNA wird in einer mobilen Phase, dem Laufmittel, gelöst und unter hohem Druck durch die stationäre Phase, die Säule, gepumpt. Die Testsubstanzen, in diesem Fall Abbruchstränge und vollständige Einzelstränge, lösen sich in der mobilen Phase. Sie wechselwirken unterschiedlich stark mit der stationären Phase in der Säule. Abbruchstränge, die im Vergleich zu den vollständigen Einzelsträngen kürzer und unpolarer sind, wechselwirken stärker mit der stationären Phase und verlassen somit die Apparatur später (Asselborn 2009:254).

Da DNA bestimmte Wellenlängen des Lichtes absorbiert, kann man über einen angeschlossenen UV/Vis-Detektor die unterschiedlichen Bestandteile der Probe trennen und identifizieren.



Abbildung 6 HPLC-Gerät

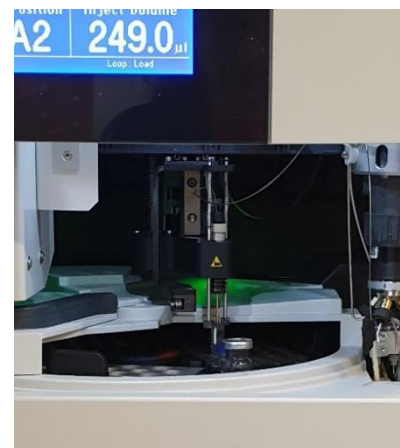


Abbildung 7 Aufnahme der Probe

2.1.4 Massenspektrometrie

Ziel der Massenspektrometrie ist es, Rückschlüsse auf die Molekülmasse der untersuchten Proben zu ziehen. Die Molaren Massen der Proben werden experimentell mit der MALDI-TOF-Methode (Matrix-assisted laser desorption time-of-flight) bestimmt. Durch Laserbeschuss werden die Moleküle ionisiert, durch die Flugzeitanalyse wird dann ihre Masse bestimmt (Asselborn 2009:264).

Die im Voraus berechnete Masse wird mit der experimentell bestimmten Masse verglichen.

2.2 Photosensibilisierende Substanzen

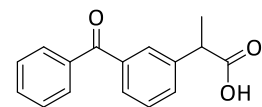
2.2.1 Stoffe

Als mögliche Photosensibilisatoren wurden die Substanzen Ketoprofen, α -Mangostin, Xanthotoxin, Benzophenon, Xanthon, 3-Methoxyxanthon, Silibinin und Silymarin eingesetzt. Bei allen Testsubstanzen handelt es sich um organische, aromatische Carbonylverbindungen.

Photosensibilisatoren absorbieren das Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich und übertragen die Lichtenergie auf ein weiteres Molekül, in diesem Fall auf die DNA. Je nach Struktur und der Löslichkeit der Sensibilisatoren können diese unterschiedlich gut in die DNA interkalieren und den Energietransfer begünstigen.

Ketoprofen:

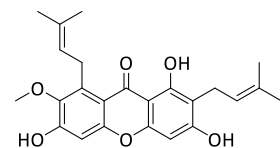
Ketoprofen ist ein Entzündungshemmer, der eine schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung hat. Er wird äußerlich angewandt und zur Behandlung von Schmerzen verschiedener Ursachen auf die Haut aufgetragen. Nach der Behandlung muss die Haut gut vor der Sonne geschützt werden, da es sonst zu unerwünschten Nebenwirkungen wie lokalen Hautreaktionen kommen kann.



M = 254,29 g/mol

α -Mangostin:

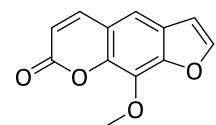
Bei α -Mangostin handelt es sich um einen gelben Pflanzenfarbstoff aus der Gruppe der Xanthone. Der Stoff wird aus verschiedenen Teilen der tropischen Baumart Mangostin gewonnen. Aufgrund seiner antibakteriellen und entzündungshemmenden Wirkung wird er als Nahrungsergänzungsmittel verwendet.



M = 410,47 g/mol

Xanthotoxin:

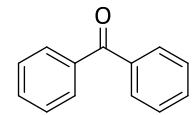
Xanthotoxin ist ein Naturstoff, der in den ätherischen Ölen verschiedener Pflanzen wie Pastinaken, Bergamotten oder Vertretern der Doldenblütler vorkommt. Für manche wechselwarmen Tiere ist Xanthotoxin schädlich, da durch Sonneneinstrahlung Entzündungen hervorgerufen werden.



M = 216,19 g/mol

Benzophenon:

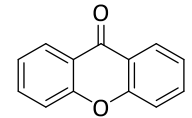
Das Keton ist oft Inhaltsstoff von Kosmetikprodukten, da es die Farben und Duftstoffe, aber auch die Kunststoffverpackungen vor Zerstörung durch UV-Strahlung schützt. Zudem dient der Stoff als Photoinitiator in UV-Härtungs-Anwendungen, wie Tinten und Beschichtungen.



M = 182,22 g/mol

Xanthon:

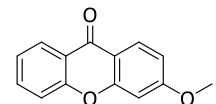
Der Stoff wird synthetisch hergestellt, da er nicht natürlich vorkommt. Er bildet jedoch den Stammkörper für einige Naturfarbstoffe. Xanthon bildet feine, farblose Nadeln und wird als Insektizid, speziell zur Abtötung von Mottenlarven eingesetzt.



M = 196,21 g/mol

3-Methoxyxanthon:

Bei 3-Methoxyxanthon handelt es sich um einen synthetischen Sensibilisator der Gruppe der Xanthone.



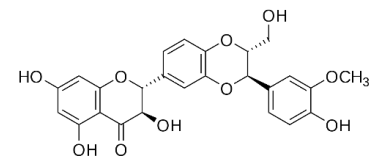
M = 226,23 g/mol

Silymarin:

Silymarin ist ein Stoffkomplex aus Silibinin, Isosilibinin, Silicristin und Silidianin, der in Arzneimitteln zur Behandlung toxischer und chronisch-entzündlicher Erkrankungen der Leber eingesetzt wird.

Silibinin:

Silibinin ist in den Früchten der Mariendistel enthalten. Mariendistel-Frucht-Extrakte wirken leberschützend, da sie die Zellmembran der Leberzellen stabilisieren. Die Substanz wird als Leitstruktur bei der Entwicklung von Arzneien verwendet.



M = 482,44 g/mol

Von allen Substanzen werden Stammlösungen mit einer Konzentration von ca. $c = 0,2$ mmol/l angesetzt. Als Lösungsmittel wird Acetonitril verwendet. Folgende Mengen an Substanzen werden in 200 ml Acetonitril gelöst:

Tabelle 1 Mengen und Konzentrationen für die Stammlösungen

Stoff	Einwaage in mg
Ketoprofen	5,09
α -Mangostin	8,21
Xanthotoxin	4,32
Benzophenon	3,64

Stoff	Einwaage in mg
Xanthon	3,92
3-Methoxyxanthon	4,52
Silibinin	9,65
Silymarin	9,46

2.2.2 Spektroskopie

Für die spektroskopische Untersuchung werden die angesetzten Stammlösungen der Konzentration 0,2 mmol/l mit Acetonitril auf 0,1 mmol/l und 0,05 mmol/l konzentrierte Lösungen verdünnt. Von allen 24 Lösungen werden Absorptionsspektren der Wellenlängen $\lambda = 250 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$ aufgenommen. Dazu gibt man die Probelösungen in Küvetten und setzt diese in den UV/Vis-Spektrometer (Abb. 8) ein. In einer weiteren Küvette befindet sich das Lösungsmittel als Vergleichslösung. Die ermittelten Absorptionswerte zeigen, bei welchen Längenwellen und wie stark die Photosensibilisatoren Lichtenergie absorbieren und somit angeregt werden („UV/VIS-Spektroskopie“).



Abbildung 8 Spektrometer

2.3 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung handelt es sich um eine molekularbiologische Technik, deren Ziel es ist, aus komplementären DNA-Einzelsträngen zusammengesetzte Hybridstränge zu bilden. Zwischen den komplementären Nukleinbasen werden dabei Wasserstoffbrücken ausgebildet.

Im Experiment wurde der lange (21mer) und kürzere (12mer) DNA-Einzelstrang zusammengegeben und ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 550 markierter DNA-Strang zugefügt. Die Lösung wird im Heizblock auf 90 °C erhitzt, sodass sich ggf. vorkommende Doppelstrangbereiche, die sich zwischen komplementären Bereichen gebildet haben, trennen. Nach 10 Minuten lässt man die Probe langsam wieder auf Raumtemperatur abkühlen und die Einzelstränge fügen sich zum Doppelstrang (Abb. 9) zusammen (Renaturierung) („Hybridisierung“).

Die Fluoreszenzmarkierung der DNA dient zur späteren Detektion bei der Gelelektrophorese.

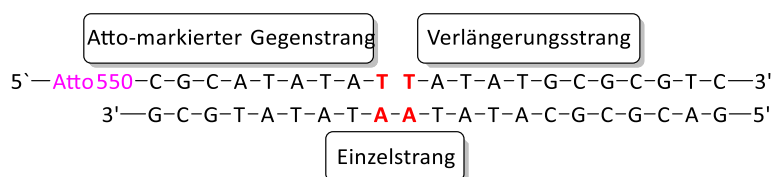


Abbildung 9 Hybridisierter Doppelstrang

Der Atto-markierte Gegenstrang und der Verlängerungsstrang lagern sich über komplementäre Basen an den langen Einzelstrang an. Dadurch steht die Thyminbase am Ende des Atto-markierten Stranges direkt neben der Thyminbase am Anfang des Verlängerungsstranges. Bei der anschließenden Belichtung kann genau an dieser Stelle ein CPD-Schaden generiert werden. Entsteht solch ein Schaden, hat der Verlängerungsstrang den Atto-markierten Strang verlängert.

2.4 Belichtung

Vor der Belichtung werden die Proben mit der freeze-pump-thaw-Methode entgast. Mit flüssigem Stickstoff und unter Zufuhr von Argon-Gas werden die Lösungen eingefroren. Ziel ist, den vorhandenen Sauerstoff zu entfernen und durch Argon zu ersetzen, um so Störfaktoren und Nebenreaktionen durch Oxidationen, zu verhindern. Die gefrorenen Lösungen werden entgast und anschließend im lauwarmen Wasserbad langsam wieder aufgetaut. Der Zyklus wird mindestens zweimal wiederholt, um so den gesamten Sauerstoff zu entfernen.



Abbildung 10 Fertige Proben zur Belichtung

Je $2,5 \mu\text{M}$ DNA-Lösung und $2,5 \mu\text{M}$ Sensibilisator-Lösung werden gemischt. Die Proben (Abb. 9) werden mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde (Versuchsreihe A) bzw. 24 Stunden (Versuchsreihe B) in einem Belichtungsapparat bestrahlt (Abb. 11). Durch die Lichtabsorption der Sensibilisatoren und der anschließenden Energieübertragung auf die DNA, sollten durch eine [2+2]-Cycloaddition CPD-Schäden generiert werden (Beaudry 2011).



Abbildung 11 Belichtung der Proben

2.5 CPD-Schäden

Bei der Belichtung können an der Verbindungsstelle zwischen Atto-markierten und Verlängerungsstrang CPD-Schäden entstehen. Unter dem Einfluss von energiereicher UV-Strahlung und der Wirkung der photoaktiven Substanzen bildet sich ein Pyrimidin-Dimer (Abb. 12) zwischen den 5,6-Bindungen zweier benachbarter Thymin-Nukleotiden. So resultieren aus einer (2+2)-Cycloaddition zwei kovalente Bindungen zwischen den benachbarten Pyrimidinbasen. Thymin ist aufgrund der niedrigen Triplettenergie ein besserer Akzeptor für eine Energieübertragung, wie sie bei Belichtung stattfindet, als vergleichsweise Cytosin. Dies führt zu einer Aufhebung der Basenpaarungen mit dem komplementären Strang. Die entstandene Strukturänderung kann im biologischen System zu schwerwiegenden Mutationen führen und Folgen wie Krebs mit sich bringen (Graw 2015:418).

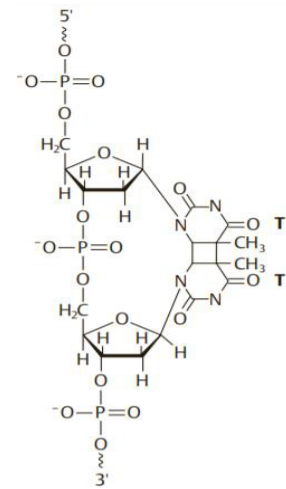


Abbildung 12 Thymin-Dimer



Abbildung 13 DNA-Einzelstrang mit Thymin-Dimer

2.6 Gelelektrophorese

Entsteht ein CPD-Schaden, so verbinden sich der Atto-markierte Gegenstrang und der Verlängerungsstrang über die Thymin-Dimere (Abb. 13). Dadurch unterscheiden sich die Stränge mit dem generierten Schaden in ihrer molaren Masse, Größe und Ladung von den anderen Strängen in der Probe. Dies wird ausgenutzt, um die Proben mithilfe einer Gelelektrophorese aufzutrennen.

Dazu werden die beleuchteten Proben auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und 1 h 20 min bei maximal 50 °C und konstant 50W, sowie einer maximalen Spannung von 3000 V im elektrischen Feld getrennt. Da die DNA-Moleküle durch die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind, wandern sie zur Anode. Durch die netzartige Struktur des Gels wandern kleine Moleküle schneller als größere. Fragmente gleicher Größe und Ladung bilden eine Bande in dem Gel. Diese sind durch die Fluoreszenzmarkierung mit Atto 500 unter UV-Licht sichtbar. Mithilfe eines DNA-Markers mit Fragmenten bekannter Länge kann die Größe der verschiedenen DNA-Stränge bestimmt werden (Alberts 2012:352-355).

Über die Menge der auftretenden CPD-Schäden können so Aussagen zur photosensibilisierenden Wirkung der untersuchten Substanzen unter den gegebenen Versuchsbedingungen getroffen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 DNA-Synthese und -Analyse

3.1.1 Tritylmonitor

Der Tritylmonitor (Abb. 14) zeichnet die Festphasensynthese auf und zeigt die Ausbeute der zusammengesetzten DNA-Stränge an. Die Konzentration des abgespaltenen DMT-Kations kann über dessen Orangefärbung nachgewiesen und somit die Ausbeute bestimmt werden.

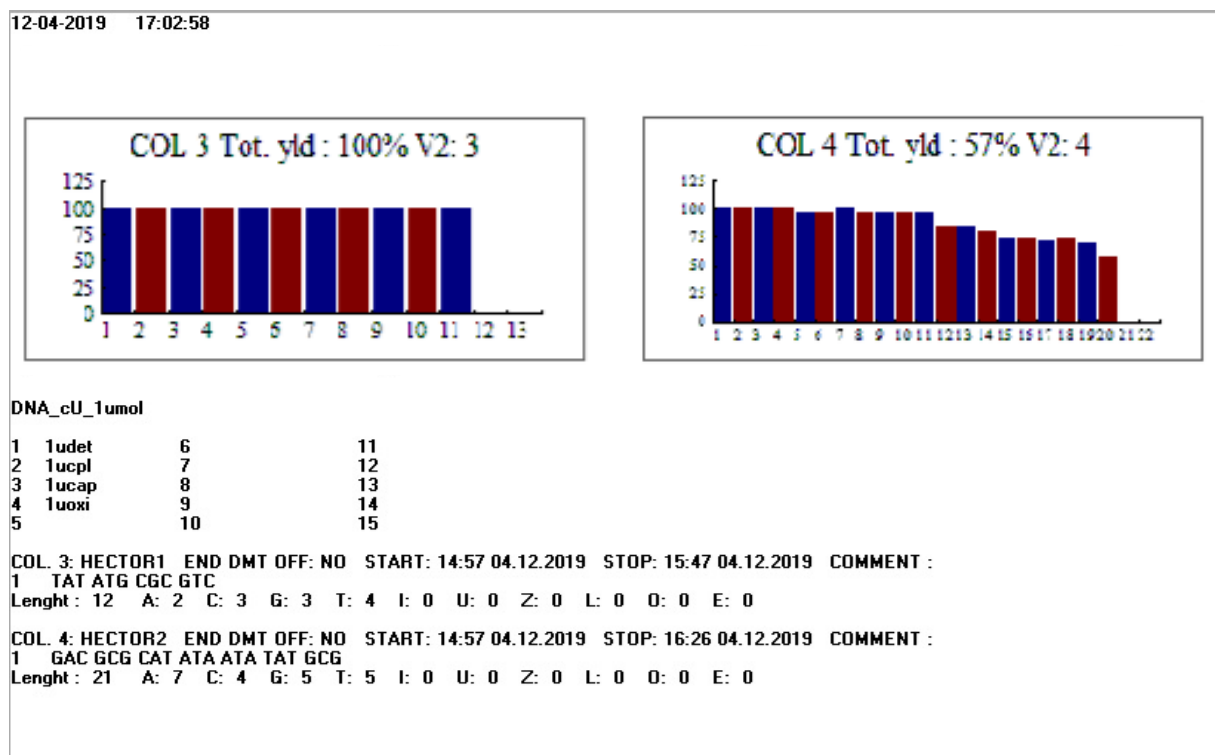


Abbildung 14 Tritylmonitor

Die Gesamtausbeute (Total Yield) für die kürzeren Stränge beträgt 100 %, die des langen Einzelstrangs 57 %. Anhand der Balken im Diagramm lässt sich die Erfolgsquote bei den einzelnen Kupplungen der Nucleotide ablesen. Je höher die Prozentzahl ist, desto erfolgreicher war die DNA-Synthese. Zur DNA-Synthese wurde hier die DMT-on Methode gewählt, bei der das letzte eingebaute Nucleosid die DMT-Schutzgruppe behält. Dies ermöglicht die Aufreinigung über die Glen-Pak-Methode.

Aufgrund der geringen Ausbeute des Einzelstrangs und der begrenzten Zeit, wurde der lange DNA-Strang (21mer) zusätzlich kommerziell erworben.

3.1.2 HPLC

In der HPLC werden die DNA-Stränge nach ihrer Länge aufgetrennt und über UV/Vis-Spektroskopie bei 260/290 nm bzw. 260/310/345 nm untersucht. Da DNA und mögliche Verunreinigungen bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren, können diese detektiert werden.

Die Fläche unter dem Peak entspricht dabei der Menge an Testsubstanz, die die Säule bis zu diesem Zeitpunkt durchlaufen hat. Sobald ein Peak auftritt, wird die austretende Flüssigkeit in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen und das Gemisch so getrennt.

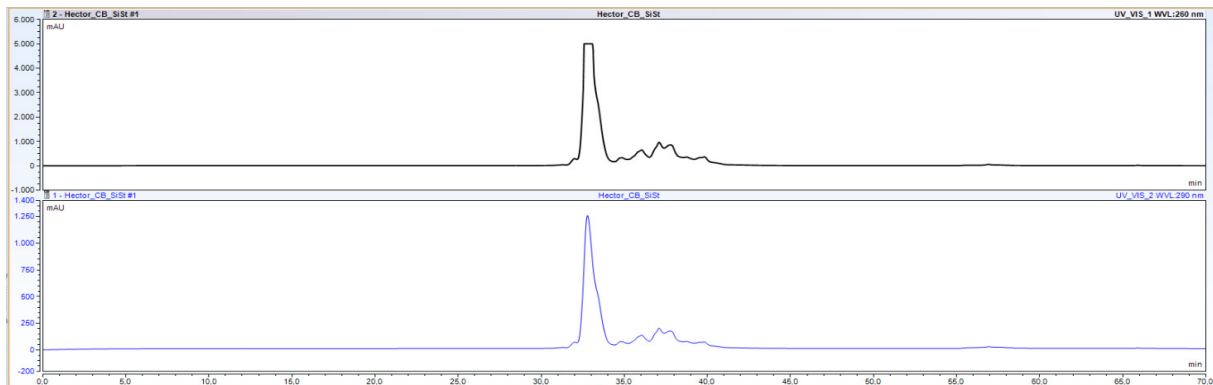


Abbildung 15 Verlängerungsstrang

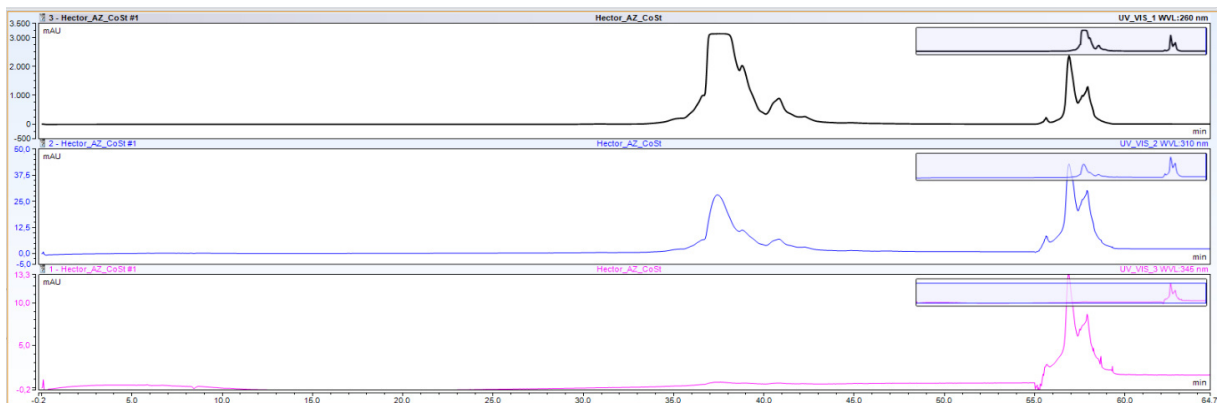


Abbildung 16 Einzelstrang

Abbildung 15 zeigt das Diagramm des kürzeren Verlängerungsstrangs (12mer). Nach 33 Minuten wird bei 260 nm und 290 nm ein Peak erkennbar, der auf den Verlängerungsstrang zurückzuführen ist. Die kleineren Hebungen direkt hinter dem Peak sind Abbruchsträngen zuzuordnen. Der längere Einzelstrang eluiert nach etwa 37 min (Abb. 16).

Da DNA bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert, wurden die Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen beobachtet. Dadurch kann festgestellt werden, welcher Peak der DNA entspricht und welcher auf möglichen Verschmutzungen durch andere Stoffe zurückzuführen ist.

Beim Verlängerungsstrang konnten neben den erwähnten Abbruchsträngen keine weiteren Verunreinigungen identifiziert werden.

Bei der Untersuchung des Einzelstrangs wird deutlich, dass es sich beim Peak mit der Retentionszeit von 55 min bei 345 nm nicht um den DNA-Einzelstrang, sondern um einen anderen Stoff handelt, der bei dieser Wellenlänge absorbiert. Durch die zeitliche Trennung und das Auffangen in unterschiedlichen Eppendorf-Reaktionsgefäßen, konnte der Stoff von der DNA getrennt werden.

3.1.3 Massenspektrometrie

Für die synthetisierten Stränge wurden die folgenden Massen errechnet und mittels MALDI-TOF experimentell bestimmt.

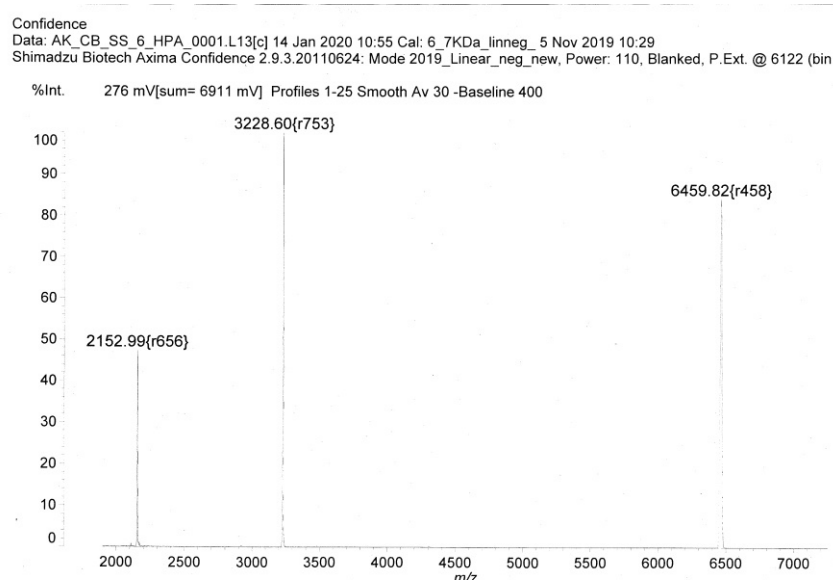


Abbildung 17 MALDI-TOF Ergebnis des Einzelstrangs

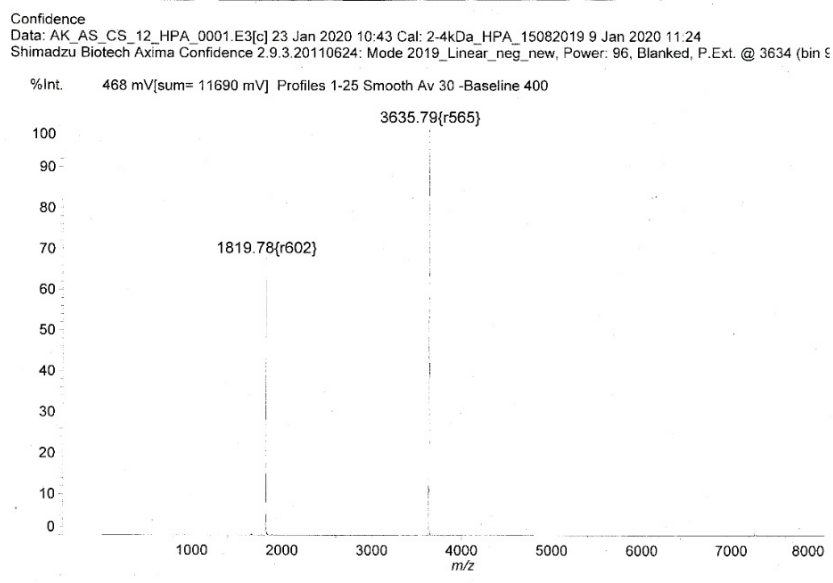


Abbildung 18 MALDI-TOF Ergebnis des Verlängerungsstrangs

Tabelle 2 Massen der Stränge

Strang	errechnete Masse	MALDI-TOF Ergebnis
Einzelstrang	6451,1 g/mol	6459,82 g/mol ($\frac{1}{2}$ M: 3228,60 g/mol)
Verlängerungsstrang	3634,6 g/mol	3635,79 g/mol ($\frac{1}{2}$ M: 1819,78 g/mol)

Tabelle 3 Abweichung der Massen

Strang	ΔM	Abweichung
Einzelstrang	8,72 g/mol	0,135 %
Verlängerungsstrang	1,19 g/mol	0,03 %

Bei der Massenspektroskopie zeigen sich Abweichungen zwischen den berechneten molaren Massen und dem experimentell ermittelten Wert. Diese ergeben sich vermutlich aufgrund der relativ schlechten Kalibrierung des Gerätes.

3.2 Spektroskopie der photosensibilisierenden Substanzen

Für die Veranschaulichung der Absorptionsspektren werden Lösungen der Konzentration 50 μM verwendet.

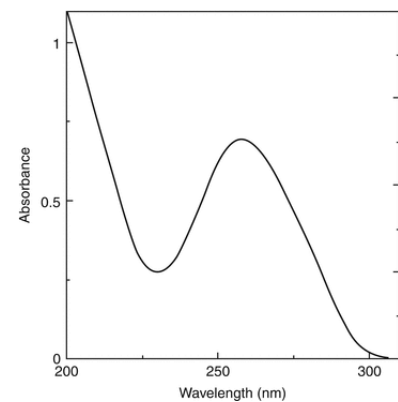
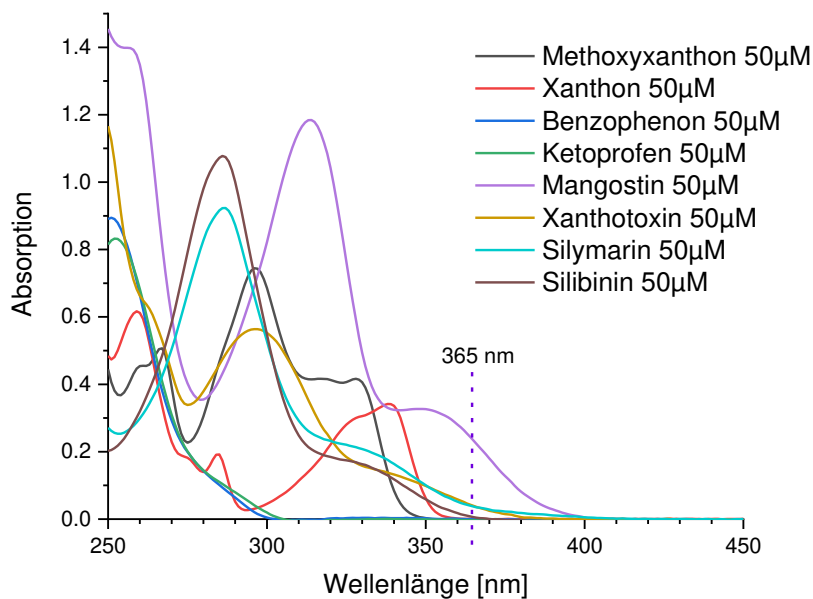


Abbildung 19 Absorptionsspektrum der Photosensibilisatoren

Abbildung 20 Absorptionsspektrum der DNA

Bei der Überlagerung der Spektren aller Sensibilisatoren (vgl. Anhang 9.1) sind Unterschiede in den Absorptionsspektren zu erkennen (Abb. 19). Dabei variieren diese je nach Wellenlänge. Da als Strahlungsquelle für die Versuche eine LED mit der Wellenlänge 365 nm gewählt wurde, werden die Absorptionen bzw. die Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Sensibilisatoren bei dieser Wellenlänge verglichen. Ein Vorteil der gewählten Wellenlänge liegt darin, dass DNA bei dieser Wellenlänge Licht nicht mehr absorbieren kann (Abb. 20). Zudem ist bekannt, dass UV-A-Strahlung (315 nm – 380 nm), abgesehen von sichtbarem Licht, am tiefsten in die Haut eindringen kann, da sie im Vergleich zu UV-B- und UV-C-Strahlung langwelliger ist. Sie dringt bis ins Bindegewebe ein.

3.3 Gelelektrophorese

Die verschiedenen Proben werden jeweils 1 Stunde bzw. 24 Stunden bei einer Wellenlänge von 365 nm belichtet und anschließend mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. In der linken Tasche wird ein DNA-Marker mit DNA-Sequenzen bekannter Länge (16 – 36 mer) aufgetragen, um so Rückschlüsse auf die Längen der Stränge ziehen zu können. Angrenzend wird eine Blind-Probe aufgetragen, die unbelichtete DNA enthält und in Abwesenheit von Photosensibilisatoren belichtet wird.

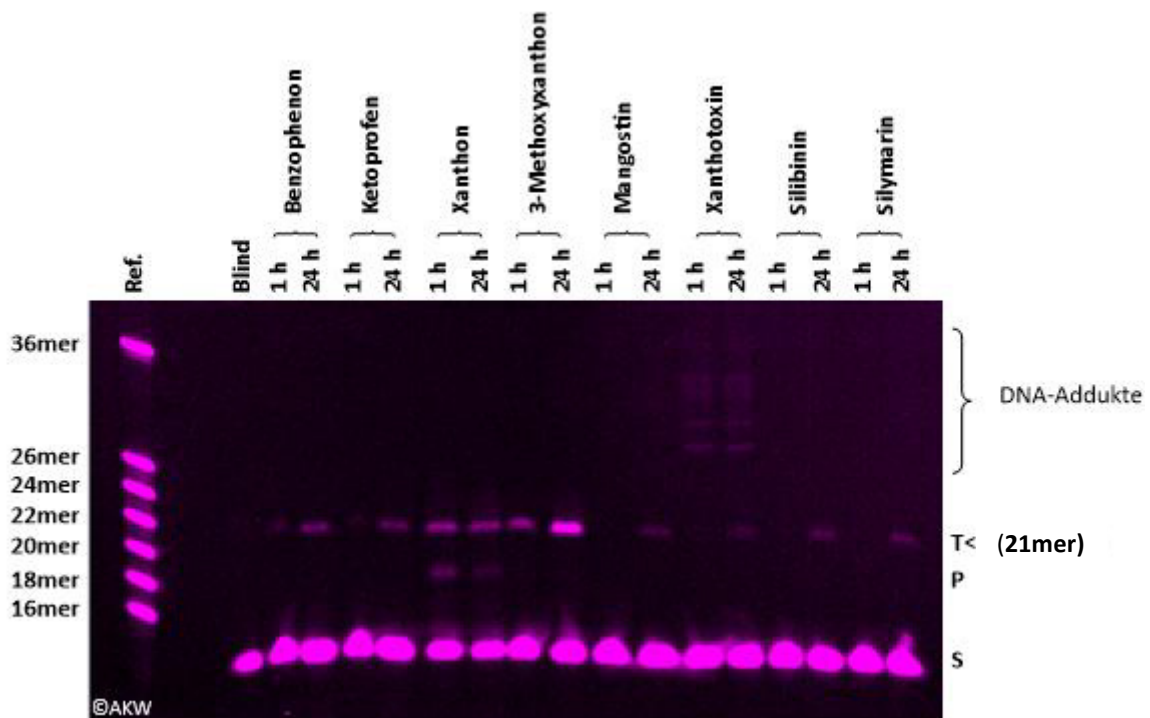


Abbildung 21 Gel (Belichtung unter UV-Lampe)

Die Proben enthalten verschieden lange DNA-Fragmente. Bei allen Proben finden sich kürzere (< 16 Basen), stark fluoreszierende DNA-Fragmente (S). Dabei handelt es sich um die 9 Basen langen, Atto-markierten Gegenstränge.

Unterschiede finden sich bei den DNA-Fragmenten mit einer Länge von 21 Basen. Sie entstehen, wenn die Thyminbase am Ende des Atto-markierten Stranges mit der Thyminbase am Anfang des Verlängerungsstranges eine CPD-Bindung eingegangen ist und sich ein Thymin-Dimer (T<>T), gebildet hat (vgl. 2.5 Abb. 13). Die Dimerisierung findet somit zwischen der neunten und zehnten Base statt. Wie die Blind-Probe zeigt, entstehen CPD-Schäden nur in Gegenwart photoaktiver Substanzen, da bei dieser nur die Atto-markierten Gegenstränge zu erkennen sind.

Bei Xanthotoxin sind im oberen Bereich des Gels teils längere DNA-Fragmente zu erkennen. Dabei handelt es sich um DNA-Addukte, die durch eine Vernetzung von Xanthotoxin mit Einzelsträngen als Nebenprodukt entstanden sind.

Bei Xanthon sind zusätzlich zwei Banden bei P (17 Basen) zu erkennen. Hier ist der Strang um 4 Nukleotide kürzer als der verlängerte Atto-Gegenstrang. Die Abspaltung der Nukleotide wurde von Xanthon induziert. Um die genau Struktur festzustellen, müssten weitere Verfahrensschritte einleitet werden.

3.4 Ausbeutebestimmung der CPD-Schäden

Die Ausbeute der CPD-Schäden wird mithilfe des Programmes Aida Image Analyzer v.450 bestimmt. Dazu wird ein Rahmen um je eine Probe des Gelbildes gezogen und die einzelnen Banden der Probe in einem Diagramm als Kurven dargestellt (Abb. 22). Die Flächen unter den Kurven entsprechen der Intensität der Banden und somit der Menge an fluoreszenzmarkierter DNA. Durch Integration der Peakflächen können diese bestimmt und ins Verhältnis zur gesamten DNA-Probe gesetzt werden. Als Wert erhält man die prozentuale Ausbeute an CPD-Schäden (Tab. 4).

Addiert man zu der Menge an CPD-Schäden, die Menge an Atto-markierten Gegensträngen und die Menge an Strängen mit CPD-Schäden mit Basen-/Nukleotidabspaltung, so erhält man die Gesamtmenge der aufgetragenen DNA ($T \leftrightarrow T + S + P$ bei Xanthon) (+ DNA-Addukte bei Xanthotoxin) = 100 %)

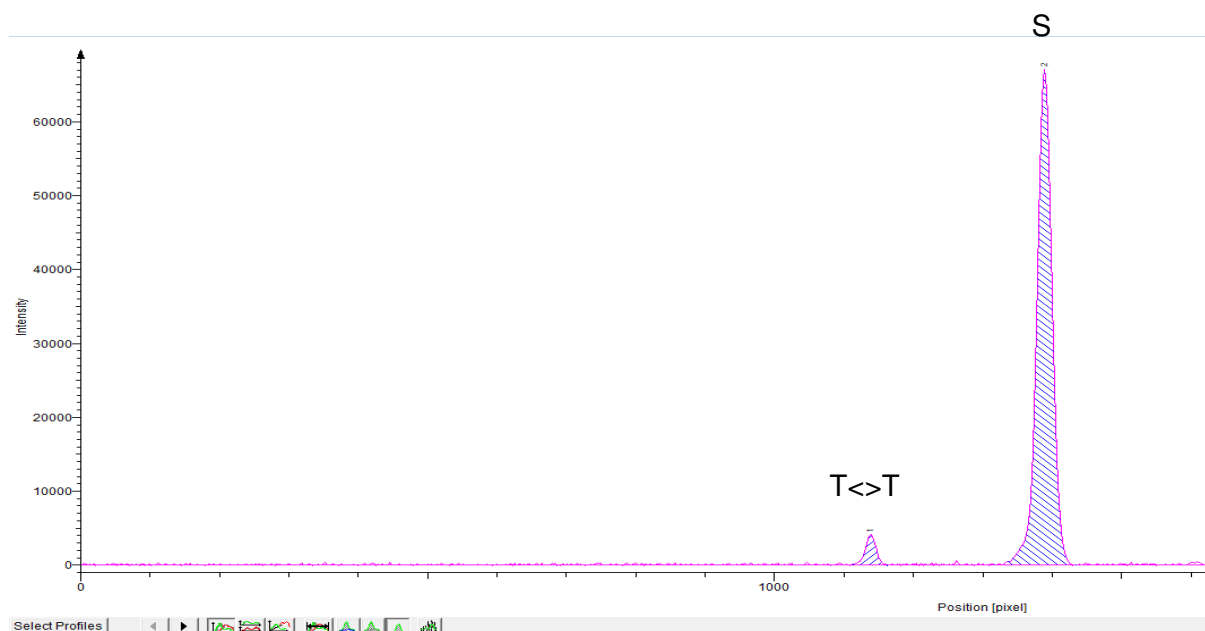


Abbildung 22 Aida Image Analyzer v.450 Auswertung am Beispiel Benzophenon (24 h Belichtung)

Tabelle 4 Bestimmung der Ausbeute an CPD-Schäden ($T \leftrightarrow T$)

$T \leftrightarrow T$	Benzophenon	Ketoprofen	Xanthon	3-Metoxyxanthon
1 h	4,70 %	3,50 %	13,70 %	12,30 %
24 h	7,60 %	8,10 %	14,60 %	19,60 %

$T \leftrightarrow T$	α -Mangostin	Xanthotoxin	Silibinin	Silymarin
1 h	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
24 h	4,80 %	6,20 %	6,70 %	6,80 %

3.5 Vergleich der Sensibilisatoren

Alle verwendeten Sensibilisatoren haben unter den gewählten Versuchsbedingungen CPD-Schäden verursacht. Die Schäden sind je nach Substanz und Belichtungsdauer unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Proben mit α -Mangostin, Xanthotoxin, Silibinin und Silymaren zeigen nach einer Belichtungsdauer von einer Stunde fast keine Schäden. Bei weniger als 1 % der DNA-Moleküle haben sich Dimere gebildet. Auch nach 24 Stunden liegt der Anteil der CPD-Schäden niedriger als den anderen untersuchten Photosensibilisatoren. Sie können demnach als weniger schädlich betrachtet werden. Bei Benzophenon und Ketoprofen sind nach einer Stunde etwa 4 % der DNA-Moleküle geschädigt, nach 24 Stunden ist der Anteil bereits doppelt so hoch.

Bei der Bestrahlung der DNA mit Xanthon sind nach einer Stunde 13,7 % der DNA beschädigt. Zwischen 1 und 24 Stunden Belichtung zeigt sich jedoch nur ein geringer Unterschied, während die Werte von 3-Methoxyxanthon dabei nochmal deutlich ansteigen. Xanthon und 3-Methoxyxanthon weisen jeweils die höchsten Werte auf und bergen damit möglicherweise auch unter realen Bedingungen die höchste potentielle Schadeinwirkung unter den betrachteten Substanzen.

Die unterschiedlich starke schädigende Wirkung lässt sich auf die Molekülstruktur zurückführen. Diese beeinflusst den Extinktionskoeffizienten, der angibt, wie stark die elektromagnetischen Wellen von einem Medium absorbiert werden. Der Extinktionskoeffizient ist bezogen auf die Wellenlänge des Lichtes, die Stoffkonzentration und die Weglänge, welche der Lichtstrahl im Medium zurücklegt, sowie auf das Medium selbst. Je kleiner der Koeffizient ist, desto weniger Strahlung wird absorbiert und kann auf andere Moleküle übertragen werden. Daher ist bei Substanzen mit kleinem Extinktionskoeffizienten die Wahrscheinlichkeit der photochemischen Reaktion geringer („Extinktionskoeffizient“).

Ein weiterer beeinflussender Faktor ist die Löslichkeit der Substanzen. Dieser bedingt wie gut sich ein Stoff in die DNA interkalieren kann. Je besser er sich einlagern kann, desto größere Schäden werden verursacht. So spielen letztlich mehrere Faktoren zusammen, was weiterführende Experimente erforderlich macht.

4 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Stoffe, die von unserem Körper aufgenommen werden, beispielsweise über die Haut, unter Einfluss von UV-Strahlung DNA-Schäden verursachen können. Bei der Auswertung des *in vitro* Experiments wird deutlich, dass bereits die vergleichsweise energiearme UV-A-Strahlung in Kombination mit Photosensibilisatoren, besonders nach einer langen Belichtungszeit, Schäden bedingt.

Aufgrund der geringen Anzahl an durchgeführten Versuchen können die Ergebnisse nur als erste Anhaltspunkte betrachtet werden. Um statistisch verwendbare Ergebnisse zu erhalten, sollten mindestens drei Messwerte vorliegen. Da dies aber unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich war, muss bei der prozentualen Ausbeutebestimmung der CPD-Schäden nach Einschätzung von Arthur Kuhlmann von einer Abweichung von mindestens 5 % oder höher ausgegangen werden (mündliche Mitteilung Juni 2020). Zu den Fehlerquellen bei den Versuchen zählen Pipettierfehler, Geräteabweichungen und Messfehler, sowie Fehler bei der Integralbestimmung.

In weiteren Forschungsarbeiten könnte man umfangreichere Versuchsreihen ansetzen. Neben den acht bereits positiv getesteten Substanzen gibt es weitere Stoffe mit photosensibilisierender Wirkung, die als Auslöser von CPD-Schäden in Betracht kommen. Eine weitere Überlegung wäre, die Wirkung der photoaktiven Substanzen in der Zelle (*in vivo*) zu testen sowie die Aufnahme und den intrazellulären Transport der Photosensibilisatoren zu untersuchen.

Nicht zuletzt bieten photosensibilisierende Substanzen auch interessante Chancen. So können sie in photodynamischen Therapien (kurz PDT) angewandt werden, um Tumorzellen zu behandeln.

Ob Gefahr oder Nutzen – Grundlage für eine mögliche Verwendung photoaktiver Substanzen ist die genaue Erforschung ihrer Wirkung auf Organismen.

5 Danksagung

Wir bedanken uns bei Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Organische Chemie (IOC), Karlsruher Institut für Technologie, die uns einen Einblick in ihr Forschungsgebiet ermöglicht haben. Insbesondere gilt unser Dank Fabienne Speck und Arthur Kuhlmann, die uns in den Laboren zu jeder Zeit unterstützend zur Seite standen und uns durch das Projekt geführt haben. Dank ihnen konnten wir unser Projekt trotz der Bedingungen während der Corona-Pandemie beenden. Des Weiteren danken wir dem Hector–Seminar mit seinen Stiftern Dr. Hans-Werner und Josephine Hector für die langjährige Förderung. Abschließend möchten wir uns für die tatkräftige Unterstützung während des gesamten Projektes bei unseren Kursleitern Anke Richert und Thomas Hermann bedanken.

6 Quellenverzeichnis

Literaturverzeichnis:

- Alberts, Bruce et al.: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 4. Auflage, Wiley-VCH, 2012
- Asselborn, Wolfgang, et al.: Chemie Heute SII, Schroedel, Karlsruhe, Deutschland, 2009
- Graw, Jochen: Genetik, Springer Spektrum, 2015

Internetquellen:

- ATDBio: „Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis.“, o.J., www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis. [Stand: 03.07.2020]
- Beaudry, Christopher M.: „Safety Web.“ SOP - Freeze-Pump-Thaw Degassing of Liquids | Safety Web | Oregon State University, Oregon State University, 2011, chemsafety.chem.oregonstate.edu/content/sop-freeze-pump-thaw-degassing-liquids. [Stand: 03.07.2020]
- Die Chemie-Schule: „UV/VIS-Spektroskopie – Chemie-Schule.“, 2020, www.chemie-schule.de/KnowHow/UV/VIS-Spektroskopie. [Stand: 22.06.2020]
- Pieck, Jan Carsten: „Reparatur Und Replikation Des Sporen Photoproduktes Sowie Ortsspezifische Generierung Eines CPD Bzw. Sporen Photoproduktes in DNA.“ LMU, LMU München: Fakultät Für Chemie Und Pharmazie, 2007, edoc.ub.uni-muenchen.de/6948/1/Pieck_Jan_Carsten.pdf. [Stand: 16.07.2020]
- Spektrum: „Hybridisierung.“ *Lexikon Der Biochemie*, o.J., Spektrum Akademischer Verlag, www.spektrum.de/lexikon/biochemie/hybridisierung/2958. [Stand: 06.08.2020]
- Studyflix: „Extinktionskoeffizient · Einfach Erklärt, Berechnung.“, 2020, studyflix.de/chemie/extinktionskoeffizient-1601. [20.07.2020]
- Wikipedia: „Photodynamische Therapie.“, Wikimedia Foundation, 13 Aug. 2019, de.wikipedia.org/wiki/Photodynamische_Therapie. [Stand:13.07.2020]

Bildquellen:

- Alfred Nordheim und Rolf Knippers: *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag, 2018, pp. 272–273.
- Alle weitem verwendeten Abbildung sind eigene Aufnahmen und Ergebnisse.

7 Abkürzungsverzeichnis

CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CPG	Controlled Pore Glas
DMT	Dimethoxytrityl
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
PDT	photodynamische Therapie
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolettstrahlung
Vis	visible light (sichtbares Licht)

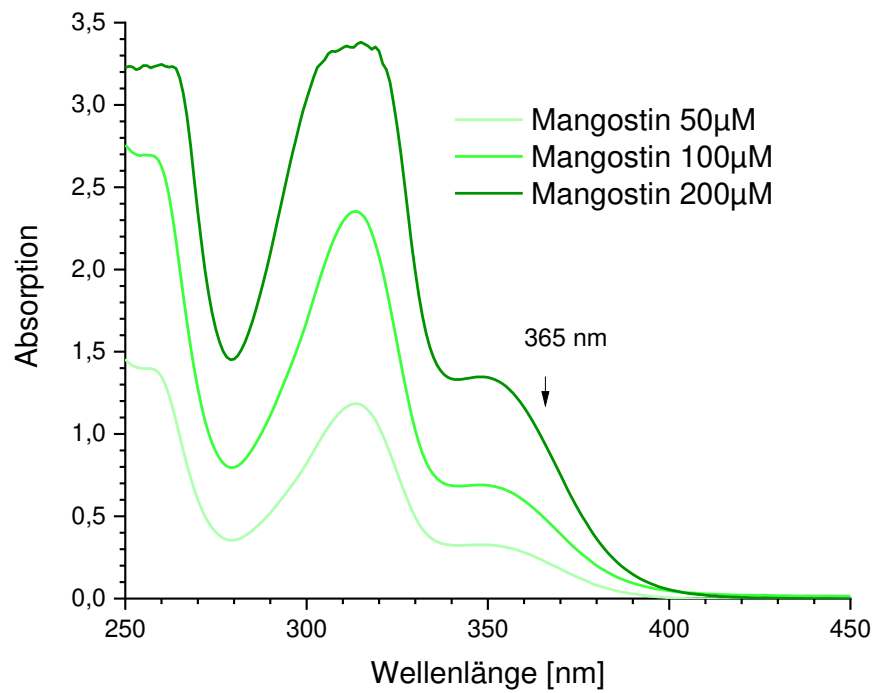
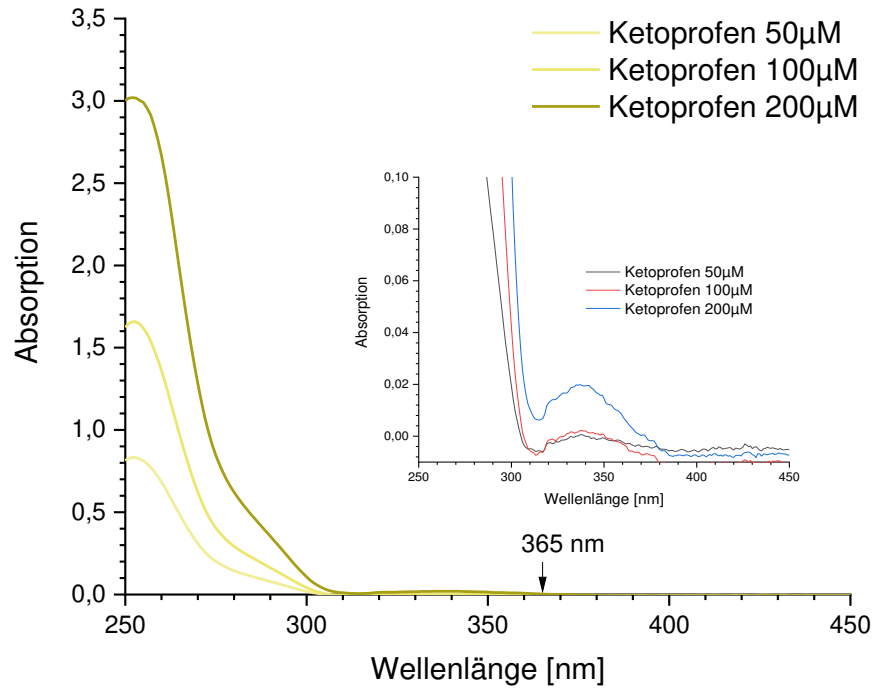
8 Chemikalienverzeichnis

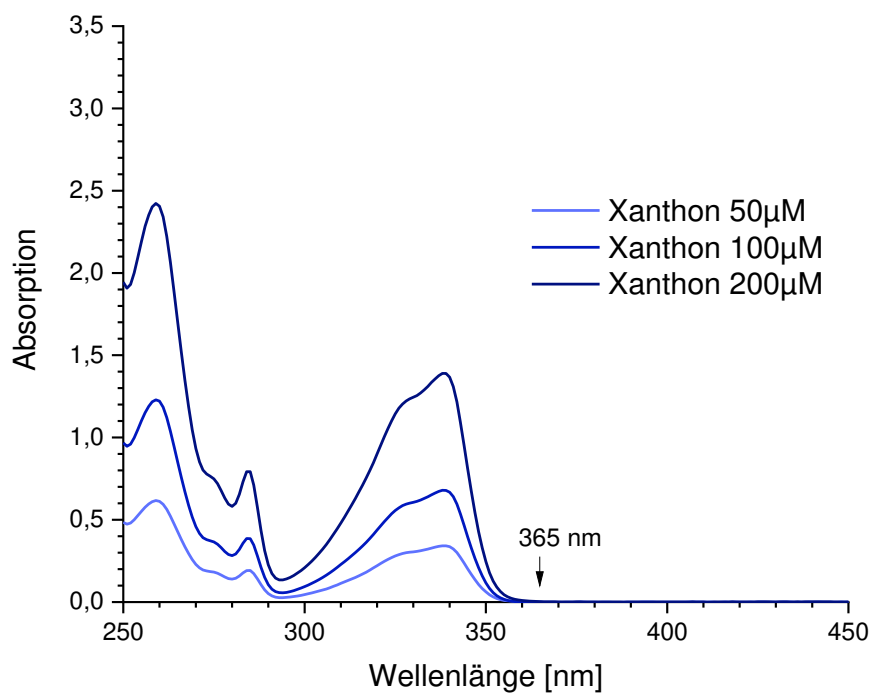
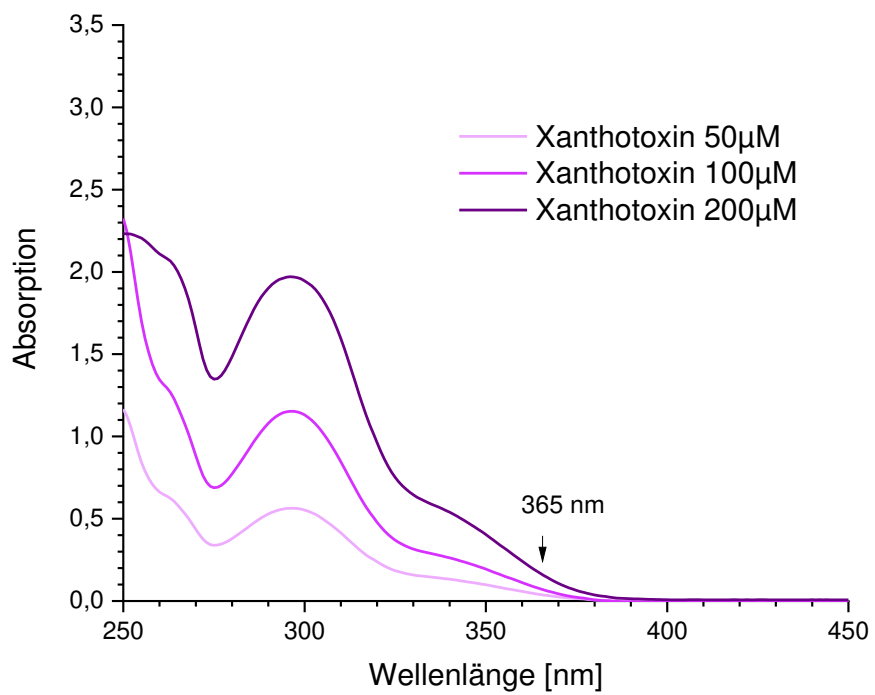
Produkt	Katalognummer	Hersteller
Glen-Pak™ DNA 50mg Purification Cartridge	60-5000-96	Glen Research
2 % Trifluoroacetic Acid (TFA)	60-4040-57	Glen Research

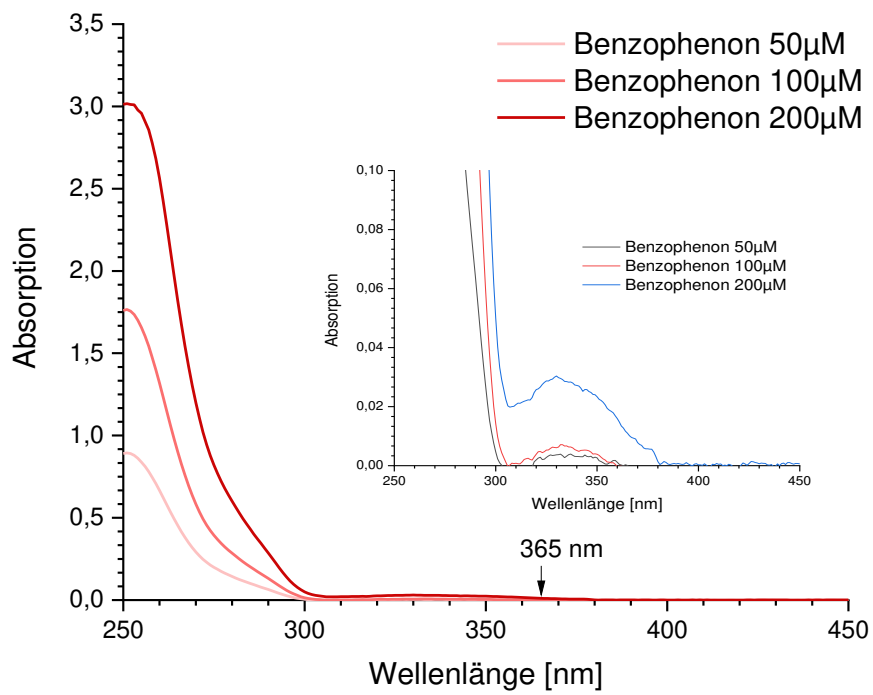
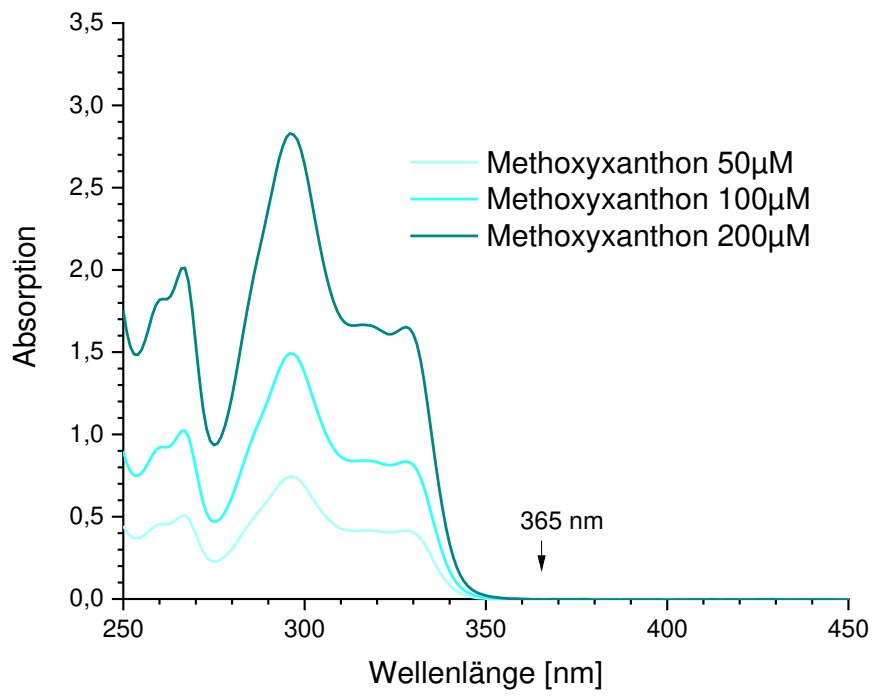
Stoff	CAS-Nummer	Hersteller
Benzophenon	119-61-9	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials
Ketoprofen	22071-15-4	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials
Silibinin	22888-70-6	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials
Silymarin	65666-07-1	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials
Xanthon	90-47-1	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials
Xanthotoxin	298-81-7	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials
α-Mangostin	6147-11-1	Sigma-Aldrich - Lab & Production Materials

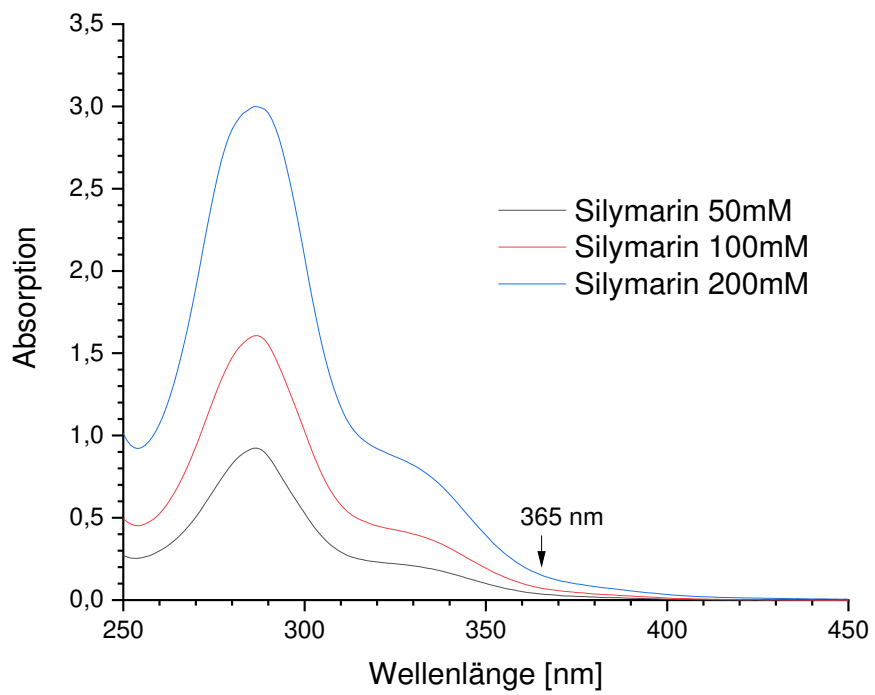
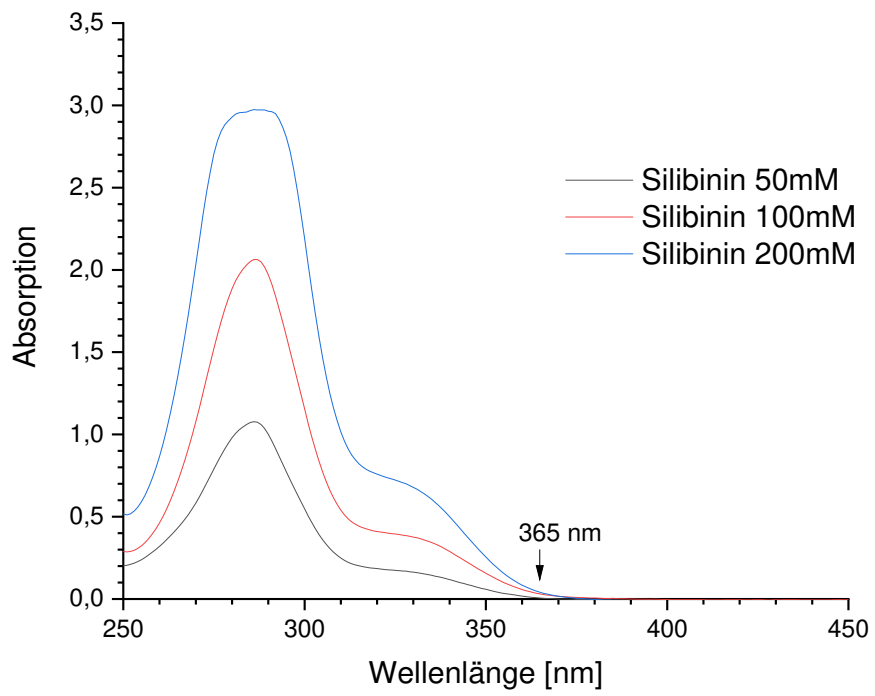
9 Anhang

9.1 Spektroskopie









10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass wir diese Arbeit unter der Beratung durch Fabienne Speck, Arthur Kuhlmann, Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht und Anke Richert selbstständig verfasst haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden, sowie Zitate kenntlich gemacht wurden.

Karlsruhe, den

.....

Amelie Zabler

.....

Carina Blache