

Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

UV-induzierte CO-Freisetzung aus Mangankomplexen (CORMs):
Untersuchung der toxischen Eigenschaften in Säugerzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Marbod Frederick Kohns

2015

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Wätjen

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. Unfried

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Brückmann, N. E., Wahl, M., Reiß, G. J., Kohns, M., Wätjen, W. & Kunz, P. C. (2011). Polymer Conjugates of Photoinducible CO-Releasing Molecules. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 29, 4571–4577.

Zusammenfassung

Kohlenstoffmonoxid ist ein Gas, das vor allem für seine toxische Wirkung auf den Organismus bekannt ist. Abgesehen davon wird CO in den letzten Jahren intensiv in seiner Rolle als zellulärer Botenstoff untersucht.

Um CO besser applizierbar zu machen, wurden sogenannte CO-releasing molecules (CORMs) entwickelt, in denen das CO komplex-gebunden vorliegt und durch physikalische Reize freigesetzt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten CORMs können das CO durch die Einwirkung von UV-Licht freisetzen. Das besondere an diesen Molekülen ist, dass sie aufgrund ihrer Größe in der Lage sein sollen, sich über Endotheldefekte in geschädigtem Gewebe anzusammeln während sie ins gesunde Gewebe nicht übertreten können (*EPR-effect*).

Die folgende Arbeit befasst sich mit den manganhaltigen CO-freisetzenden Molekülen [(BPMA)Mn(CO)₃]OTf (**K1**), [(BPMEA)Mn(CO)₃]OTf (**K2**), [(BPMVBA)Mn(CO)₃]OTf (**K3**), den CO-freisetzenden Makromolekülen [{HPMA-co-bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamin}Mn(CO)₃]OTf (**Mn(CO)₃@P1**) und [{HPMA-co-Methacrylat-Polylactid-(N,N bis (2-pyridylmethyl)ethylamin)} Mn(CO)₃]OTf (**Mn(CO)₃@P2**), sowie den nicht CO-beladenen Polymeren HPMA-co-bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamin (**P1**) und HPMA-co-Methacrylat-Polylactid-(N,N bis (2-pyridylmethyl)ethylamin) (**P2**) und deren toxischen Wirkungen auf die humanen Tumorzelllinien Hct116 und HepG2.

Es konnte gezeigt werden, dass K3 und Mn(CO)₃@P2 eine zytotoxische Wirkung entfalten. Diese ist bei K3 relativ schwach ausgeprägt. Bei Mn(CO)₃@P2 zeigt sich eine mäßige Toxizität mit IC₅₀ – Werten von 50 +/- 21 µg/ml (unter UV-Licht) und 41 +/- 6 µg/ml (im Dunkeln) in Hct116 Zellen, sowie 60 +/- 13 µg/ml und 61 +/- 10 µg/ml in HepG2 Zellen.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die manganhaltigen Monomere CO freisetzen können, welches in der Lage ist den cGMP-Signalweg in Hct116 Zellen zu aktivieren.

Summary

Carbon monoxide is a gaseous molecule, which is mainly known for its toxic impact on the organism. Apart from that, over the last years CO has been investigated intensively in its role as a transmitter substance in cells.

To make CO easier to apply, so called CO-releasing molecules (CORMs) have been synthesized, in which CO is bound to a metal complex and can be released by physical stimuli. The CORMs used in this dissertation can release CO when irradiated with ultraviolet light. Another special thing about the molecules is, that their size is meant to allow them to accumulate in aggrieved tissues, by passing the endothelium of damaged vessels, whereas they cannot pass over into intact tissues (*EPR-effect*).

The following dissertation is about the manganiferous, CORMs [(BPMA)Mn(CO)₃]OTf (**K1**), [(BPMEA)Mn(CO)₃]OTf (**K2**), [(BPMVBA)Mn(CO)₃]OTf (**K3**), the CO-releasing macromolecules [{HPMA-co-bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamine}Mn(CO)₃]OTf (**Mn(CO)₃@P1**) and [{HPMA-co-methacrylate-poly lactide-(N,N bis (2-pyridylmethyl)ethylamin)} Mn(CO)₃]OTf (**Mn(CO)₃@P2**), as well as the polymers HPMA-co-bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamine (**P1**) and HPMA-co-methacrylate-poly lactide-(N,N bis (2-pyridylmethyl)ethylamine) (**P2**) that do not carry CO. The toxicity of these substances is tested in the human cancer cell lines Hct116 and HepG2.

K3 and Mn(CO)₃@P2 showed some toxicity in these cells. Whereas K3 only has a weak toxic effect, Mn(CO)₃@P2 shows a higher toxicity with IC₅₀ – values of 50 +/- 21 µg/ml (upon UV-irradiation) and 41 +/- 6 µg/ml (in the dark) in Hct116-cells, as well as 60 +/- 13 µg/ml and 61 +/- 10 µg/ml in HepG2 cells.

It was also demonstrated, that the manganiferous monomers are able to release CO, that can activate the cGMP-signalling pathway in Hct116 cells.

Abkürzungsverzeichnis

BPMA	Bis(2-pyridylmethyl)amin
BPMEA	N,N,-Bis(2-pyridylmethyl)ethylamin
BPMVBA	Bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamin
BSA	bovines Serumalbumin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CORM	carbon-monoxide releasing molecule
CORM-2	Tricarbonyldichlororuthenium-Dimer
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EPR-effect	enhanced permeability and retention effect
FCS	fetales Kälberserum
GC	Guanylat Zyklastase
HO	Hämoxigenase
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
K1	[(BPMA)Mn(CO) ₃]OTf
K2	[(BPMEA)Mn(CO) ₃]OTf
K3	[(BPMVBA)Mn(CO) ₃]OTf
MA	Methacrylat
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mb	Myoglobin
Mn	Mangan
Mn(CO) ₃ @P1	[[P1]Mn(CO) ₃]OTf
Mn(CO) ₃ @P2	[[P2]Mn(CO) ₃]OTf
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NO	Stickstoffmonoxid
OTf	Triflylgruppe (Ester der Trifluormethansulfonsäure)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PDE	Phosphodiesterase
PKG	Proteinkinase G
PLA	Polylactid
P1	Polymer: HPMA-co-bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamin
P2	Polymer: HPMA-co-Methacrylat-Polylactid-(N,N bis (2-pyridylmethyl)ethylamin)
SNP	Nitroprussid-Natrium
UV	Ultraviolet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Kohlenstoffmonoxid im menschlichen Körper.....	1
1.2. Durch Kohlenstoffmonoxid beeinflusste Signalwege und potentielle Wirkungen als Pharmakon.....	3
1.3. CO-Releasing Molecules.....	5
1.4. CORMs und der EPR-effect.....	6
1.5. Charakterisierung und bekannte Eigenschaften der Testsubstanzen	8
2. Ziele der Arbeit.....	12
3. Material und Methoden	14
3.1. Material.....	14
3.1.1. Zelllinien.....	14
3.1.2. Zellkulturmedium.....	14
3.1.3. Lösungen und Puffer.....	14
3.1.4. Chemikalien und Kits.....	14
3.1.5. Geräte.....	15
3.1.6. Computersoftware.....	16
3.1.7. sonstige Materialien.....	16
3.2. Methoden.....	17
3.2.1. Kultivierung der Zellen.....	17
3.2.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	18
3.2.3. Inkubation und Schädigung der Zellen mittels löslicher Noxen.....	18
3.2.4. Schädigung der Zellen mittels UV-Lichts.....	19
3.2.5. Zytotoxizitätstest (MTT-Assay).....	19
3.2.6. Untersuchung der CO-Freisetzung (Myoglobin-Assay).....	20
3.2.7. Untersuchung des GC/cGMP Signalwegs (cGMP-Assay).....	24
3.2.8. Aufarbeitung und Lyse der Zellen.....	24
3.2.9. Proteinbestimmung (Lowry).....	25

3.2.10. Statistische Auswertungen.....	25
4. Ergebnisse.....	26
4.1. Toxische Wirkung von UV-Licht.....	26
4.2. CO-Freisetzung aus den Mangankomplexen.....	28
4.3. Toxizitätstests der Substanzen mit UV-induzierter CO-Freisetzung.....	33
4.4. Induktion des GC / cGMP Signalweges durch CO-freisetzende Mangankomplexe.....	39
5. Diskussion und Schlussfolgerungen.....	43
5.1. Toxische Wirkungen von UV-Licht.....	43
5.2. CO-Freisetzung im Myoglobin-Assay.....	45
5.3. Toxizitätstests der Substanzen mit UV-induzierter CO-Freisetzung.....	48
5.4. Aktivierung des GC/cGMP Signalwegs.....	51
5.5. Schlussfolgerungen.....	53
7. Literaturverzeichnis.....	55
8. Anhang.....	61
Originaldatentabellen.....	61
Danksagung.....	76
Eidesstattliche Versicherung	77

1. Einleitung

Gasotransmitter sind kleine, gasförmige Moleküle, die im Körper synthetisiert werden und Signalfunktionen erfüllen können (Wang, 2002). Bereits in den 80er Jahren wurde Stickstoffmonoxid (NO) als Gasotransmitter entdeckt, der für die Relaxation von Gefäßmuskulatur verantwortlich ist (Ignarro et al., 1987, Hutchinson et al., 1987, Furchgott & Vanhoutte, 1989). Seither wurde NO intensiv untersucht. Bis heute sind zahlreiche Wirkungen des NO im Körper aufgedeckt worden und das Gas wird in Form von Pharmaka wie Glyceroltrinitrat oder Nitroprussid-Natrium (SNP) erfolgreich zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt. Im Laufe der Zeit wurden mit Kohlenstoffmonoxid (CO) und Schwefelwasserstoff (H₂S) bisher zwei weitere endogen produzierte Gasotransmitter entdeckt. Zwar wurden diese Stoffe teilweise schon lange im Körper nachgewiesen, jedoch wurde ihnen zunächst keine Wirkung als Signalmolekül zugeschrieben. Sie wurden stattdessen als Abfallprodukt im Stoffwechsel angesehen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Gasotransmitter CO, welcher seit einigen Jahren sehr intensiv untersucht wird. Hierfür wurden verschiedene Moleküle entwickelt, in welchen CO an unterschiedliche Metalle als Komplex gebunden ist und auf einen jeweils bestimmten physikalischen Reiz hin abgegeben werden kann.

1.1. Kohlenstoffmonoxid im menschlichen Körper

CO ist hauptsächlich für seine toxische Wirkung bekannt, die es beim Einatmen des Gases im Körper entfaltet. Die toxische Wirkung resultiert hierbei aus der höheren Bindungskapazität an Hämoglobin im Vergleich zum Sauerstoff. CO bindet etwa 200-300 mal stärker an das Hämoglobin-Molekül als Sauerstoff und verhindert somit sowohl die Sauerstoffaufnahme in der Lunge, als auch die Sauerstoffabgabe im Gewebe (Varon et al., 1999). Durch die starke Bindung wird das Gas nur sehr langsam aus dem Blutkreislauf ausgeschieden. So ist es möglich, dass schon eine Konzentration von 0,072 % in der Atemluft ausreicht um nach wenigen Minuten 50 % des Hämoglobins zu besetzen, was schon zu einem Bewusstseinsverlust führen kann (Douglas et al., 1912, Dolan, 1985, Prockop &

Chichkova, 2007). Das Gas ist darüber hinaus farb- und geruchlos und nicht reizend, weswegen eine Luftbelastung zunächst unbemerkt bleiben kann. Vergiftungen mit CO sind aufgrund dieser Eigenschaften sehr gefürchtet, da sie erst spät erkannt werden und danach verhältnismäßig schwer zu behandeln sind. Andererseits wurde schon früh herausgefunden, dass CO im Körper in kleinen Mengen durch die Hämoxigenase freigesetzt wird, welche die Hämgruppe des Hämoglobins zu Biliverdin, Eisen und CO oxidiert (Tenhunen et al., 1968, Maines, 1997). Auf die möglichen physiologischen Rollen des so entstandenen CO, sowie einige der beeinflussten Signalwege wird im folgenden eingegangen (s. Kapitel 1.2).

Die Hämoxigenase ist ein Enzym, das im menschlichen Körper in zwei Isoformen vorkommt. Die HO-2 wird konstitutiv exprimiert und ist hauptsächlich in den Gefäßen von Hoden und ZNS lokalisiert. Über ihre spezifische Funktion ist noch relativ wenig bekannt (Ryter et al., 2006), neuere Studien belegen eine wichtige Wirkung bei der Regulation des Blutflusses in die jeweiligen Gewebe und bei der Entzündungshemmung (Chen et al., 2014, Kang et al., 2013). Die HO-1 ist induzierbar und kommt ubiquitär im menschlichen Körper vor. Sie erfüllt offenbar wichtige Aufgaben zum Schutz und zur Regulation der Zellfunktion und wird durch zahlreiche Noxen aktiviert, die zellulären Stress ausüben. Dazu gehören zum Beispiel reaktive Sauerstoffspezies, Interleukine und UV-Licht (Keyse & Tyrell, 1989, Lee & Chau, 2002). Unter Einwirkung dieser Noxen wird die HO-1 unterschiedlich stark aktiviert, so dass die endogene CO- und Biliverdinproduktion, sowie die Freisetzung von Eisen deutlich zunehmen kann. Von diesen drei Produkten haben besonders CO und Biliverdin offenbar positive Auswirkungen auf die Zellfunktion und wirken antiinflammatorisch (Ryter et al., 2006, Yao et al., 2009, Anyanwu et al., 2014, Bisht et al., 2014). Freies Eisen hingegen wirkt über die Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies zytotoxisch (Halliwell & Gutteridge, 1984). Trotzdem gibt es Hinweise darauf, dass sich HO-1 Expression über einen erhöhten Efflux von Eisenionen und über eine Induktion von Ferritin positiv auf die Zellfunktion auswirkt (Ferris et al., 1999, Ryter et al., 2006).

1.2. Durch Kohlenstoffmonoxid beeinflusste Signalwege und potentielle Wirkungen als Pharmakon

Über CO ist bekannt, dass es im Körper als Signalmolekül wirken kann, da es einen Einfluss auf verschiedene Signalwege unserer Zellen hat. Bereits in den 1980er Jahren konnte nachgewiesen werden, dass CO als Gas appliziert einen vasodilatierenden Effekt zeigt (Lin & McGrath, 1988), welcher ähnlich dem Effekt von NO als Gasotransmitter hauptsächlich über zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt wirkt (Sammut et al., 1998). Es wurde außerdem gezeigt, dass CO protektiv gegen Bluthochdruck wirken kann. (Matterlini et al., 1998). Im Laufe der Zeit konnte eine kardioprotektive Wirkung der HO und des CO im Mausmodell nachgewiesen werden (Wang et al., 2010). Auch antiinflammatorische Effekte durch Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6, sowie Induktion des antiinflammatorisch wirksamen Zytokins IL-10 wurden gezeigt (Morse et al., 2003, Otterbein et al., 2000, Allanson & Reeve, 2007). CO besitzt also neben seiner offenkundigen toxischen Wirkung noch einige, bisher nur wenig erforschte, protektive Wirkungen, die CO als potentielles Therapeutikum für eine Vielzahl von Erkrankungen interessant machen.

In einer Arbeit von Niesel et al. (2008) wurde eine starke zytotoxische Wirkung des CO-Releasers [Mn(CO)₃(tpm)]PF₆ nachgewiesen. Diese Substanz setzt, ähnlich wie die in dieser Arbeit verwendeten CORMs, Kohlenstoffmonoxid erst nach Bestrahlung mit UV-Licht frei. Auch die Toxizität entwickelte sich erst nach Bestrahlung mit UV-Licht und dadurch ausgelöster CO-Freisetzung. Jedoch konnte die toxische Wirkung in dieser Arbeit nicht sicher auf das CO zurückgeführt werden, da sie auch durch toxische Reaktionsprodukte hervorgerufen werden könnte (Niesel et al., 2008). Da CO mit Hämgruppen interagiert, ist es allerdings möglich, dass CO auch über eine Interaktion mit mitochondrialen Cytochromen eine von der kompetitiven Hemmung des Sauerstofftransports am Hämoglobin unabhängige, direkte toxische Wirkung entfalten kann (Cooper & Brown, 2008).

Eine solche Wirkung wurde sowohl für CORMs, als auch für gasförmig appliziertes CO bei Bakterien nachgewiesen (Nobre et al., 2007, Jesse et al., 2013). Eine starke zytotoxische Wirkung würde CO potentiell auch als Chemotherapeutikum zur Behandlung bösartiger Tumoren interessant machen.

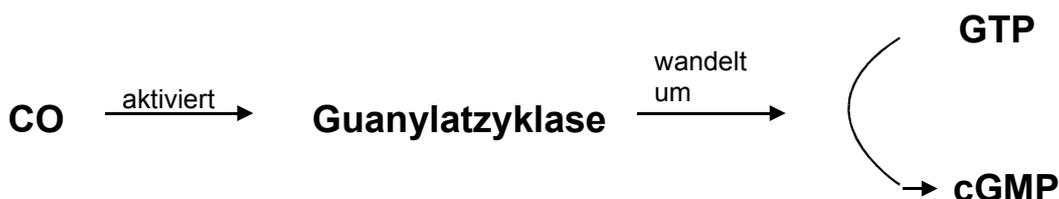


Abb. 1: Wirkung von CO auf den GC / cGMP-Signalweg

Nachgewiesen ist die Wirkung des CO auf den Guanylatzyklase (GC) / cGMP-Signalweg (Abb. 1) (Morita et al., 1997). Dieser Signalweg spielt auch bei der Wirkung eines anderen Gasotransmitters, nämlich NO, eine wichtige Rolle. Es gibt im Körper verschiedene Formen der GC, wovon die meisten membrangebunden (pGCs) vorliegen und als Rezeptor fungieren. Eine andere Form liegt gelöst im Zytosol vor, die sGC. An dieser sGC befindet sich eine Hämgruppe, an die CO (wie auch NO) binden kann um sie zu aktivieren (Gunn et al., 2012). Die sGC katalysiert daraufhin die Umwandlung von GTP in cGMP, welches dann als Second Messenger Enzyme aktivieren kann. Deaktiviert wird cGMP durch Phosphodiesterasen (PDE), die es wieder zu GMP umsetzen. cGMP beeinflusst in der Zelle vor allem drei verschiedenen Arten von Proteinen – die cGMP-abhängigen Proteinkinasen PKG I und II, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen (Chen et al., 2012). Die Auswirkungen eines erhöhten cGMP Spiegels sind abhängig vom Zielgewebe. Eine bekannte Wirkung ist die Relaxation der glatten Muskulatur in Blutgefäßen und Bronchien, der Hauptanwendungsbereich beim therapeutischen Einsatz von NO. Diese Wirkung wird zu einem großen Teil über die Aktivierung der PKG I entfaltet, wie 1998 an Knockout-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Pfeifer et al., 1998). cGMP gesteuerte Ionenkanäle spielen zum Beispiel eine Rolle in sensorischen Neuronen der Retina (Kaupp & Seifert, 2002).

Phosphodiesterasen führen zu einem negativen Feedback im Regelkreis da sie cGMP zu GMP umsetzen. Darüber hinaus interagieren sie aber unspezifisch noch mit weiteren zyklischen Nukleotiden wie beispielsweise cAMP. Hierdurch können komplexe Wirkungen entstehen. Die Induktion von cGMP durch CO wird in dieser Arbeit untersucht und in Hct116 Zellen bestätigt.

Ein anderer Signalweg, mit dem vor allem die antiinflammatorische Wirkung des CO in Verbindung gebracht wird, ist der MKK3-p38 MAPK-Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass CO höchstwahrscheinlich über diesen Signalweg die Produktion des proinflammatorischen Faktors TNF- α senken und die Produktion des antiinflammatorischen Faktors IL-10 erhöhen kann (Otterbein et al., 2000, Li et al., 2013).

Der MKK3-p38 Signalweg wird mit einer komplexen Wirkung auf das Immunsystem und die Inflammation in Verbindung gebracht. Insgesamt beeinflusst die p38-MAPK aber noch sehr viele weitere Enzyme, die unter anderem auch für die Zellzykluskontrolle und den Aufbau des Zytoskeletts verantwortlich sind (Cuenda & Rousseau, 2007).

1.3. CO-Releasing Molecules

Aufgrund der vielfältigen Wirkungen des CO wurden vor einigen Jahren Moleküle entwickelt, die es möglich machen CO in quantifizierbaren Mengen freizusetzen, sogenannte CO-Releasing Molecules (Motterlini et al., 2002). In diesen Molekülen liegt CO meist an einem Metallkomplex gebunden vor und kann durch physikalische Reize, oder auch spontan beim Lösen des Feststoffs freigesetzt werden. Die CORMs sollten darüber hinaus relativ gut löslich in Wasser sein. Um später eventuell *in vivo* einsetzbar zu sein, sollten sie eine geringe Toxizität besitzen oder, bei Einsatz als Chemotherapeutikum, diese erst nach Freisetzung des CO entfalten. Durch die Erfindung der CORMs war es bald möglich die CO-vermittelten Effekte besser zu untersuchen und einige der angesprochenen Wirkungen erst zu entdecken. Eines der ersten einfachen CORMs ist das Tricarbonyldichlororuthenium-Dimer (CORM-2) (Abb.2). Dieses Molekül ist bisher weitgehend als nicht toxisch beschrieben (Motterlini et al., 2002, Sawle et al.,

2005). Lediglich eine Arbeit von Winburn et al. beschreibt einen zytotoxischen Effekt des Zerfallsprodukts nach CO-Freisetzung auf bestimmte Zelllinien (2012). Die Freisetzung von CO aus CORM-2 erfordert allerdings einen Ligandenaustausch, der durch Lösung in DMSO oder durch Interaktion mit Proteinen herbeigeführt werden kann (Motterlini et al., 2002). In reinem Wasser ist CORM-2 nur schwer löslich und es erfolgt keine CO-Freisetzung (Yin et al., 2014). Aufgrund der relativ umfangreichen Verwendung von CORM-2 in vielen vorhergehenden Studien, der geringen Toxizität und der sehr einfachen Freisetzung des CO aus CORM-2, wurde dieses Molekül als Positivkontrolle in dieser Arbeit verwendet.

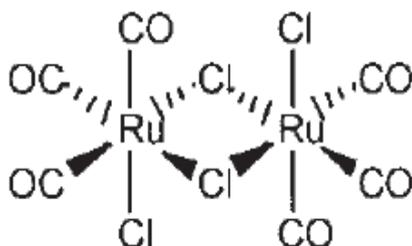


Abb. 2: Struktur des Tricarbonyldichlororuthenium-Dimer (CORM-2)
(Bildquelle: Motterlini et al., 2002, S.20)

1.4. CORMs und der *EPR-effect*

Um die Effekte des CO zielgerichtet einzusetzen, ist es von Interesse, die Verteilung des CO beziehungsweise des CORM so zu steuern, dass es in den Geweben akkumuliert, in denen es therapeutisch genutzt werden soll. Im Institut für anorganische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden zu diesem Zweck die in dieser Arbeit verwendeten Makromoleküle P1 bzw. $\text{Mn}(\text{CO})_3@P1$ und P2 bzw. $\text{Mn}(\text{CO})_3@P2$ synthetisiert. Sie können sich aufgrund ihrer molekularen Größe nur in Geweben mit erhöhter Gefäßpermeabilität ansammeln. Diese Bereiche sind insbesondere Tumorgewebe oder entzündetes Gewebe.

Der zugrunde liegende Effekt wird als „*enhanced permeability and retention-effect*“ (*EPR-effect*) bezeichnet (Matsumura & Maeda, 1986). Er wurde ursprünglich als Methode beschrieben, Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebs gezielter an den Wirkort zu transportieren um die insgesamt benötigte Menge und somit die Nebenwirkungen zu reduzieren. Die Makromoleküle müssen dabei optimalerweise eine Masse von etwa 15-70 kDa besitzen. Diese Größe ermöglicht zum einen einen Übertritt in Gewebe mit erhöhter Gefäßpermeabilität, wie Tumorgewebe und entzündetes Gewebe, andererseits verhindert sie den Übertritt durch intakte Gefäßwände (Maeda et al., 2000). Sowohl durch Tumoren als auch durch Entzündungen wird darüber hinaus der Lymphabfluss behindert, wodurch die Makromoleküle gleichzeitig länger im Zielgewebe verbleiben können (*retention-effect*). Somit akkumuliert die Substanz in diesem Gewebe. Der *EPR-effect* ist deswegen für eine Vielzahl von Arzneimitteln interessant, bei denen mit starken Nebenwirkungen in gesundem Gewebe gerechnet werden muss. Voraussetzung ist hierbei natürlich, dass der Wirkstoff trotz seiner Bindung an das Makromolekül aktiv bzw. aktivierbar bleibt.

Beispiele für bereits zugelassene Pharmaka, die den *EPR-effect* nutzen sind Doxil® (Wirkstoff: Doxorubicin) und Abraxane® (Paclitaxel). Gebunden sind die Wirkstoffe an Liposomen (Doxil®) beziehungsweise Albumin (Abraxane®). (Barenholz, 2012, Miele et al., 2009). An diesen Beispielen wird deutlich, dass bei den sehr verschiedenen Trägersubstanzen, für die Wirksamkeit des *EPR-effectes* tatsächlich die Molekülgröße maßgeblich ist und weniger die sonstigen Eigenschaften der Moleküle.

Bei der Bindung von CO an Makromoleküle, die dem *EPR-effect* unterliegen, sind entsprechend der aktuellen Studienlage zwei verschiedene Wirkungen des Moleküls relevant, um solche Stoffe in Zukunft eventuell therapeutisch nutzbar zu machen: Zum einen wäre denkbar, dass die protektiven Wirkungen des CO gezielt in entzündetem Gewebe nutzbar gemacht werden können. Hierbei wäre eine relativ große Behandlungsbreite absehbar, da die Inflammation bei sehr vielen akuten und chronischen Krankheitsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Zum anderen könnte man das CO einsetzen um Tumorgewebe zu schädigen, falls in höheren Konzentrationen eine starke zytotoxische Wirkung nachgewiesen wird.

1.5. Charakterisierung und bekannte Eigenschaften der Testsubstanzen

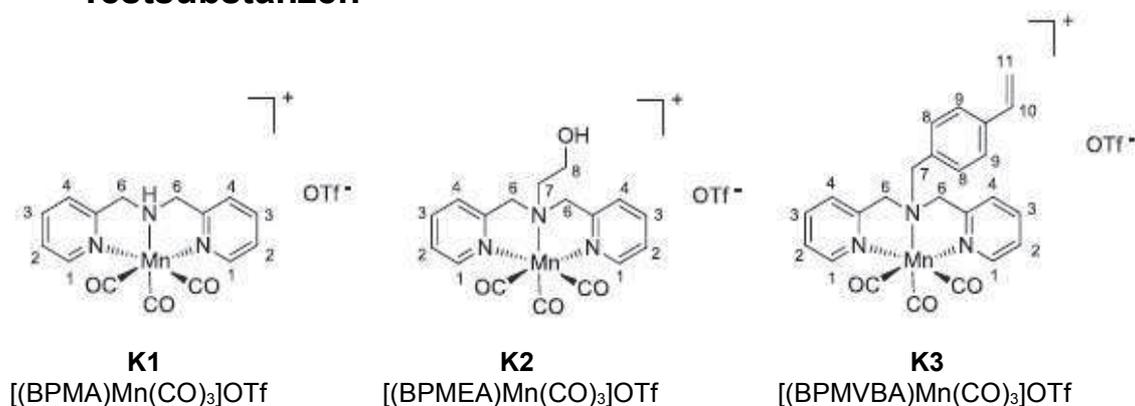


Abb 3: Struktur der CO-beladenen Monomere K1-K3
(Bildquelle: Wahl, 2010, S. 21)

Für diese Arbeit wurden drei CO-beladene Monomere, sowie zwei polymere Trägermoleküle in CO-beladener und unbeladener Form zur Verfügung gestellt. All diesen Stoffen gemeinsam ist, dass sie einen Mangantricarbonyl-Komplex als CO-tragende Gruppe enthalten. Der Vorteil dieses Komplexes ist, dass er das CO leicht und relativ schnell freisetzen kann und als untoxisch beschrieben ist (Schatzschneider, 2010). Außerdem zeigte der Komplex unter Versuchsbedingungen in Dunkelheit über mindestens 1-2 Stunden keinerlei CO-Freisetzung, diese muss also durch UV-Licht induziert werden. (Kunz et al., 2009, Schatzschneider, 2010). Das Mn-Atom ist zudem an jeweils einem der N,N,N,-tridentaten Chelatliganden K1-K3 koordiniert, welche die Möglichkeit bieten an ein polymeres Trägersystem gebunden zu werden (im Falle der Monomere) (Abb. 3), beziehungsweise welcher schon an ein solches System gebunden ist (im Falle der Polymere) (Abb. 4).

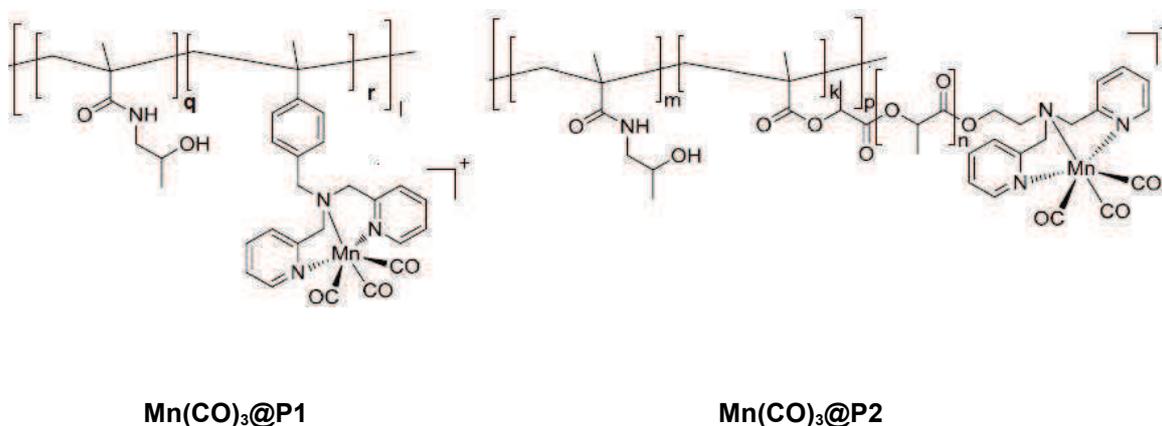


Abb. 4: Struktur der beladenen Polymere Mn(CO)₃@P1 und Mn(CO)₃@P2

q/r: Verhältnis der HPMA-Einheiten zu den BPMVBA-Einheiten in Mn(CO)₃@P1 : $\approx 9 / 1$

l: variable Kettenlänge des Gesamtpolymers Mn(CO)₃@P1: Länge nicht bestimmt

m/k: Verhältnis der HPMA-Einheiten zu den Lactid Seitenketten in Mn(CO)₃@P2 : $\approx 5 / 1$

n: variable Kettenlänge der Lactid-Einheit in Mn(CO)₃@P2: Durchschnittswert: $\approx 3,9$

p: variable Kettenlänge des Gesamtpolymers Mn(CO)₃@P2: Länge nicht bestimmt

(Bildquelle: Wahl, 2010, S. 25)

Bei der Einwirkung von energiereichem UV-Licht kann nun die Komplexbindung zwischen dem Mn-Ion und den CO-Molekülen gelöst werden, wodurch das CO freigesetzt wird. Wie viele der drei CO-Moleküle dabei aus jedem Komplex gelöst werden ist dabei je nach den zugehörigen Liganden variabel und muss gesondert untersucht werden. Werte aus vorherigen Versuchen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Für die beiden Makromoleküle wurde der Mangankomplex auf unterschiedliche Art und Weise an das Polymerrückgrat gekoppelt. Das Molekül Mn(CO)₃@P1 ist ein Copolymer aus HPMA (N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) Monomeren und BPMVBA (Bis(2-pyridylmethyl)4-vinylbenzylamin) Monomeren, welche mit dem Mangantricarbonylkomplex beladen sind. BPMVBA entspricht dem unbeladenen Vorläufer des Monomers K3. Beim Mn(CO)₃@P2 wird ein Copolymer aus HPMA-Einheiten und MA-PLA-BPMEA-Seitenketten verwendet (Abb. 4). Beide Polymere haben eine variable Kettenlänge und haben ein Molekulgewicht von etwa 50 kDa um den *EPR-effect* auszunutzen (Brückmann et al., 2011). Da die Polymere eine variable Kettenlänge besitzen, wurde in dieser Arbeit auf eine Angabe der Molarität in Lösung verzichtet. Stattdessen werden die Konzentrationen in $\mu\text{g} / \text{ml}$ angegeben.

HPMA-Polymere werden häufig als Trägersystem eingesetzt, da sie wasserlöslich sind und im Körper keine Immunreaktion auslösen (Rihova et al., 1983). Die Größe der HPMA-Polymere kann darüber hinaus variiert werden, wodurch sich die Verteilung im Körper und die Ausscheidungsgeschwindigkeit über die Nieren verändern kann (Allmeroth et al., 2011). Die Geschwindigkeit der Ausscheidung ist aber ebenso abhängig von den Seitenketten. Beim Molekül $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ wurden Seitenketten aus Poly-Milchsäure eingefügt, da diese vom Körper abbaubar sind. Es ist also möglich den funktionellen Mangankomplex vom Polymerrückgrat zu trennen und so eventuell eine größere Wirkung zu erzielen. Zudem könnte das nun kleinere Polymerrückgrat leichter ausgeschieden werden. Andererseits ist $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ weniger gut löslich in Wasser (Wahl, 2010). Es fiel in unseren Versuchen bereits ab einer Konzentration von 112,5 $\mu\text{g/ml}$ nach einiger Zeit aus. Die Löslichkeit von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ ist etwas besser, hier bildeten sich Niederschläge erst ab etwa 225 $\mu\text{g/ml}$. Obwohl die schlechte Löslichkeit einen späteren Einsatz limitieren könnte, wird auch für diese polymeren Trägersysteme getestet, ob sie in der Zellkultur toxisch wirken und ob sie sich für den Einsatz als CO-Träger eignen.

Bei der Synthese und den dazugehörigen Vorversuchen zu den Substanzen sind schon einige wichtige Parameter bestimmt worden, auf Basis derer wir annehmen können, dass eine Freisetzung von CO möglich ist und sogar abschätzen können wie viel CO von jeder der Substanzen freigesetzt wird. Aus der Arbeit von Brückmann et al. (2011) geht hervor, dass die Komplexe K1 – K3, sowie die Polymer-Komplexe $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ in einer wässrigen Myoglobinlösung bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bei Raumtemperatur eine Halbwertszeit von etwa 20 min aufweisen, das heißt, dass nach dieser Zeit jeweils die Hälfte des noch gebundenen CO freigesetzt worden ist. Außerdem wurde versucht zu bestimmen, wie viele Moleküle CO die Stoffe im Schnitt freisetzen können.

Zwar wurden hier für die Komplexe K1-K3 bereits Zahlen bestimmt, jedoch wurden diese gleichzeitig kritisch kommentiert, da die Schwankungen zwischen den Stoffen recht groß waren und die Versuchsbedingungen Fehlerquellen nicht sicher ausschließen konnten. Als Anhaltspunkt sind die damals erhobenen Zahlen trotzdem in Tabelle 1 aufgelistet. Zur Erhebung diente die quantitative Auswertung eines Myoglobinassays.

Substanz	Freigesetztes CO pro Molekül
K1	1,59
K2	2,65
K3	1,65

Tab. 1: Menge an freigesetzten CO-Molekülen pro Molekül der Substanzen

Die Werte für die Polymere konnten nicht bestimmt werden
(Quelle: Brückmann, 2011)

Noch etwas schwieriger gestaltete sich die Bestimmung der CO-Freisetzungsraten für die Polymerkomplexe $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$. Zum einen ist die Löslichkeit in wässrigem Medium vor allem bei dem Komplex $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ nicht besonders gut (Wahl, 2010), zum anderen ist an den Polymerkomplexen verhältnismäßig wenig CO pro Gewicht gebunden, so dass die freigesetzte Menge auch bei einer „gesättigten“ Lösung relativ klein war. Außerdem wurde vermutet, dass die Polymere mit dem Myoglobin, was zur Bestimmung der CO-Freisetzung eingesetzt wurde in Wechselwirkung treten. Aus diesem Grund konnte der Myoglobinassay für die Polymerkomplexe $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ nicht quantitativ ausgewertet werden. Die schlechte Löslichkeit der Substanzen limitiert ihren Einsatz in höheren Konzentrationen. Nichtsdestotrotz kann eine Zytotoxizitätstestung wichtige Anhaltspunkte dazu liefern, ob die Polymerkomplexe und die eingesetzten Strukturelemente tendenziell eine zytotoxische Wirkung haben.

2. Ziele der Arbeit

In der Arbeit soll die toxische Wirkung der Moleküle K1, K2, K3, P1, P2, $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ auf verschiedene humane Tumorzelllinien untersucht werden. Hierbei wird nach Hinweisen darauf gesucht, dass die Moleküle bzw. das freigesetzte CO als Chemotherapeutikum Einsatz finden können. Außerdem könnten mögliche Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und toxischer Wirkung aufgedeckt werden. Des Weiteren wird untersucht, ob nach der Abgabe des CO zytotoxische Spaltprodukte entstehen, selbst wenn die Ausgangssubstanz keine Toxizität zeigt.

Die Substanzen wurden vor dem Hintergrund entwickelt Erkenntnisse über den Nutzen dieser oder ähnlicher Substanzen in der Krebstherapie oder der antiinflammatorischen Therapie zu gewinnen. Die Aktivierbarkeit der Substanzen durch UV-Licht in Kombination mit dem *EPR-effect* ist dabei eine Innovation auf dem Gebiet der Forschung mit CORMs. Bei Hinweisen auf eine Anwendbarkeit der Substanzen kann daran gearbeitet werden alternative Wege der Aktivierung zu entwickeln, da die Aktivierung durch UV-Licht *in vivo* nicht immer praktikabel ist.

Um die zytotoxische Wirkung zu untersuchen, muss zunächst die Wirkung des UV-Lichts, welches wir zur Freisetzung des CO verwenden untersucht werden. Hierbei soll eine Intensität gewählt werden, welche eine zuverlässige CO-Freisetzung bewirkt, dabei aber eine möglichst geringe Auswirkung auf die Zellviabilität hat.

Nach der optimalen Wahl des UV-Lichts und nachdem die Fähigkeit der beladenen Stoffe zur CO-Freisetzung unter unseren Laborbedingungen ausreichend bestätigt wurde, kann die Testung der Stoffe in einem dritten Schritt durchgeführt werden.

Für einen eventuellen späteren Gebrauch als Therapeutikum ist es Voraussetzung, dass die getesteten Substanzen einen zytotoxischen Effekt zeigen, der gegebenenfalls durch UV-Bestrahlung ausgelöst werden kann. Der Nachweis eines zytotoxischen Effekts des CO würde zum einen eine potentielle Wirkung als Krebstherapeutikum nahelegen, zum anderen würde es die CO-Freisetzung der Substanzen noch einmal bestätigen.

Unabhängig davon soll in einem letzten Schritt die Wirkung des freigesetzten CO auf den cGMP-Signalweg untersucht werden. Dies dient dem Nachweis, dass entweder die eingesetzten Moleküle oder das CO selbst in einem relevanten Maße in die Zellen diffundiert oder transportiert werden kann, damit bei Folgeversuchen mit einem ausreichenden Effekt gerechnet werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien

Hct116 humane Kolonkarzinomzellen (Brattain et al., 1981)

HepG2 humane hepatozelluläre Karzinomzellen (Knowles et al., 1980)

3.1.2. Zellkulturmedium

DMEM + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

3.1.3. Lösungen und Puffer

Einfriermedium (Zellen)	6,2 ml Zellkulturmedium + 1 ml DMSO
MTT-Lösung	5 mg/ml in dH ₂ O, Lagerung 4°C
Myoglobinlösung	75 µM Pferde-Skelettmuskel-Myoglobin in 0,1 M Phosphatpuffer
PBS (10x)	1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄
Phosphatpuffer für Myoglobin-Assay	77,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 22,6 mM NaH ₂ PO ₄

3.1.4. Chemikalien und Kits

Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad	München, Deutschland
BSA Proteinstandard	Calbiochem	San Diego, Kalifornien/ USA
DetectX® High Sensitivity Direct Cyclic GMP CLIA Kit	Arbor Assays	Michigan, USA
DMEM (<i>high glucose</i> , LGlutamin, Phenolrot)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck	Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Dithiotreitol	Sigma	Steinheim, Deutschland

Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
FCS gold	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
MTT	Sigma	Steinheim, Deutschland
Pferde-Skelettmuskel-Myoglobin	Sigma	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA – HNa)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland

3.1.5. Geräte

Eismaschine	Icematic F90, Compact Electronics
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab, Zeiss
	Axiovert 40 CFL, Zeiss
	Olympus BX43, Olympus
Heizblock	Ori-Block® DB-3, Techne
	Dry Bath System, Starlab
Inkubator	Jouan IG 150
	Binder
inverses Lichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss
Kamera Fluoreszenzmikroskop	CoolSNAP-Pro (INAS)
	Axio Cam ICm1, Zeiss
	Olympus XC 10
pH - Meter	Radiometer Copenhagen PHM 93
Photometer	Lambda 25 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer Lambda 12 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer
Plattenlesegerät	Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer
	Sunrise Multiplate Absorbance Reader, Tecan

Rührer	Heidolph MR2002
Schüttler	Swip, Edmund Bühler (EB)
Sterilbänke	Jouan IC2.12
	Gelaire BSB4
	Hera safe, Thermo Scientific
Ultraschallbad	Branson 2210, Branson
Ultraschallstab	B. Braun Labsonic 1510, 100 Watt
UV-Handlampen	Vilber Lourmat VL-6M, 312nm 6W
	Konrad Benda N6.L, 365nm 4W
Waage	Sartorius 3716MP
	Sartorius Analysenwaage MC1
	Kern ABS
Vortex	Vortex Genie 2
Wasserbad	W22, Mendingen
	Köttermann
Wasser-Deionisierungsanlage	Milli-Q Advantage A10, Millipore
Zentrifugen	Hettich universal 30F
	Eppendorf 5415R
	Beckman Microfuge R
	Sysmatec MC-6

3.1.6. Computersoftware

Axio Vision	Zeiss
GraphPad Prism 5	GraphPad
OpenOffice.org 3	Oracle (Version 2010)
UV-Winlab	Perkin Elmer
Wallac 1420 Workstation	Perkin Elmer
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation (Version 2007)

3.1.7. sonstige Materialien

Reaktionsgefäße	SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml, Sarstedt
	Safe Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf
Zählkammer (Neubauer)	Welabo
Zellkulturmaterialien	Cellstar, Greiner bio-one Falcon, Becton Dickinson

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung der Zellen

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien Hct116 (humane Kolonkarzinomzellen) und HepG2 (humane hepatozelluläre Karzinomzellen) verwendet. Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C in wasserdampfgesättigter Luft mit einem CO₂-Anteil von 5% inkubiert. Als Zellkulturmedium wurde DMEM *high Glucose* verwendet und mit hitzeinaktiviertem FCS (10 %) sowie Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) komplettiert.

Beide Zelllinien wurden in T75 Kulturflaschen ausgesät und zweimal die Woche bei Erreichen einer Konfluenz von 70-85 % subkultiviert. Bei der Subkultivierung wurden die Hct116 Zellen mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ und die HepG2 Zellen mit einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die Zellen wurden hierfür zunächst lichtmikroskopisch auf Konfluenz, Viabilität, Morphologie und Kontamination untersucht. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml einer 0,5 % Trypsin/EDTA Lösung für 2 min bei Hct116 Zellen beziehungsweise 5 min bei HepG2 Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 8 ml erwärmtem Kulturmedium vom Flaschengrund abgespült und unter mehrmaligem vorsichtigen Resuspendieren darin aufgenommen und 5 min bei 560 rpm zentrifugiert. Die Zellzahl wurde aus 100 µl der Zellsuspension in einer 1:10 Verdünnung mittels Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das durch die Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde anschließend vom Medium getrennt und mit neuem Medium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. In dieser Konzentration wurde die Zellsuspension für die entsprechenden Versuche und die Subkultivierung verwendet.

3.2.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben von den Zellkulturflaschen abgelöst und auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. In jedes Kryoröhrchen wurden 0,5 ml dieser Zellsuspension zusammen mit 0,6 ml des Einfriermediums (6,2 ml Zellkulturmedium + 1 ml DMSO) gefüllt. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden zunächst 15 min auf Eis gelagert, dann etwa 2 h bei -20°C eingefroren und im Anschluss bei -80°C dauerhaft gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst zügig durch kurzes Reiben des Kryoröhrchens in den Händen. Nach dem Antauen der Zellsuspension wurde sie in eine vorbereitete T75 Zellkulturflasche mit 20 ml vorgewärmtem Medium überführt. Nach einer Anwachszeit von 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Vor dem Einsatz in Experimenten wurden die aufgetauten Zellen mindestens dreimal wie oben beschrieben subkultiviert.

3.2.3. Inkubation und Schädigung der Zellen mittels löslicher Noxen

Für die Versuche wurden die Zellen in sterilen 96-Well Platten oder in 60 mm Zellkulturschalen in der jeweils in der Versuchsbeschreibung definierten Zelldichte ausgesät. Die Anwachszeit betrug mindestens 24 h für Hct116 Zellen und mindestens 48 h für HepG2 Zellen. Die Zellen wurden anschließend lichtmikroskopisch überprüft bevor sie mit den zu testenden Substanzen inkubiert wurden. Für alle Toxizitätstests wurden die Substanzen hierfür in frischem Medium gelöst. Für die Versuche zur cGMP-Induktion wurde konditioniertes Medium verwendet. Die Substanzen wurden zuvor in DMSO gelöst und nach Herstellerangaben gelagert. Die verwendeten Substanzen CORM-2 sowie SNP konnten nicht in Lösung gelagert werden, da sie spontan reagieren. CORM-2 reagiert dabei durch Ligandenaustausch mit dem verwendeten Lösungsmittel DMSO (Klein et al., 2014). Die Freisetzung von NO aus SNP kann durch Photolyse oder Reduktion des Nitroprussidanions erfolgen (Bates et al., 1991). CORM-2 und SNP wurden als Feststoff gelagert und für jeden Versuch unmittelbar vor Gebrauch in DMSO gelöst und entsprechend den anderen Substanzen verwendet. DMSO wurde in allen Versuchen als Kontrolle mitgeführt.

3.2.4. Schädigung der Zellen mittels UV-Lichts

Die Anwuchszeiten und die Vorbereitung der Zellen verlief in den Versuchen identisch zu den Versuchen mit löslichen Noxen. Zur Schädigung der Zellen wurden zunächst zwei UV-Lampen getestet. Die ausgestrahlte Leistung und Wellenlänge betrug bei der *Vilber Lourmat VL-6M* 6 W bei 312 nm und bei der *Konrad Benda N6.L* 4 W bei 365 nm. Die Lampen wurden jeweils an einem Stativ montiert. Danach wurde ein Abstand von 2 – 10 cm zur Oberkante der 96-Wellplatte ausgemessen und Stativ und Platte dementsprechend justiert. Die Bestrahlung erfolgte über eine Dauer von 0-16 min um herauszufinden ob eine Schädigung nachgewiesen werden kann. Da die Zellen durch die *Vilber Lourmat VL-6M* (6 W bei 312 nm) zu stark geschädigt wurden, wurde für weiterführende Experimente wurde nur noch mit der *Konrad Benda N6.L* (4 W bei 365 nm) bestrahlt. Hierbei wurde im Abstand von 2 cm für 40 min bestrahlt, da mit dieser Bestrahlungsdauer in den weiteren Experimenten zur CO-Freisetzung gerechnet wurde und in den Vorversuchen über 16 min keine nachweisbare Schädigung eintrat. Bei den Schädigungsversuchen mit UV-Licht wurde stets eine Dunkelkontrolle mitgeführt. Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt.

3.2.5. Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)

Durch den MTT-Assay kann die Viabilität einer Zellpopulation durch Bestimmung der metabolischen Aktivität indirekt nachgewiesen werden (Mosmann, 1983). Hierfür wird eine wässrige Lösung des Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) verwendet und vorsichtig auf die adhärennten Zellen pipettiert. Das MTT wird in die Zelle aufgenommen und dort zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan umgewandelt. Diese Reaktion wird hauptsächlich durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert, in wesentlich geringerem Maße kann sie aber auch NADH oder NADPH abhängig im Zytosol und im endoplasmatischen Reticulum stattfinden (Berridge & Tan, 1993). Das gebildete Formazan kann die Zellmembran nicht passieren und kann deswegen nach Entfernung der MTT Lösung in DMSO gelöst werden und photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen werden. Die Absorption bei dieser

Wellenlänge ist proportional zum Anteil an blauem Formazan. Da das Formazan hauptsächlich durch mitochondriale Dehydrogenasen gebildet wird, welche nur in viablen Zellen aktiv sind, kann die gemessene Absorption indirekt zur Bestimmung der Viabilität verwendet werden.

Bei allen Zytotoxizitätstests wurden die Zellen in 96-Wellplatten ausgesät und 24 h lang anwachsen lassen. Die Hct116 Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät, die HepG2 Zellen aufgrund der geringeren Teilungsrates in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen. Die Zellen wurden daraufhin geschädigt und nach weiteren 24 h wurde der MTT Test durchgeführt. Bei der Schädigung mit den löslichen Noxen wurden diese zunächst in Reaktionsgefäßen in frischem Kulturmedium gelöst. Danach wurde das konditionierte Medium aus der 96-Wellplatte schrittweise abgesaugt woraufhin die Wells sogleich wieder mit der angesetzten Lösung befüllt wurden. Auf diese Weise wirkten die Noxen 24 h lang auf die Zellen ein. Bei der Schädigung mit UV-Licht wurde das UV-Licht für die angegebene Dauer (2 - 40 min) einwirken lassen. Danach wurden die Zellen weitere 24 h im Inkubator gelagert und dann mittels MTT Test auf Viabilität überprüft. Alle Versuche wurden pro Versuchsansatz in dreifacher Ausführung angesetzt, bei der Auswertung wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berücksichtigt.

Zur Durchführung des MTT Tests wurden die Zellen in ihrem Medium mit 20 µl MTT-Gebrauchslösung versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Wells komplett geleert und mit 100 µl DMSO aufgefüllt um das blaue Formazan zu lösen. Nach 10 minütigem Schütteln wurde die Farbtintensität im Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt.

3.2.6. Untersuchung der CO-Freisetzung (Myoglobin-Assay)

Um das Freisetzungsverhalten der CO-beladenen Komplexe zu untersuchen wurde ein modifizierter UV/Vis-spektrometrischer Myoglobin-Assay verwendet (Motterlini et al., 2002, Metzler-Nolte & Schatzschneider, 2009). Mit diesem Testverfahren lässt sich gelöstes CO in einer Desoxymyoglobinlösung photometrisch anhand der Veränderung der Absorptionsmaxima nachweisen, welche sich je nach Bindung spezifisch verändern. Für den Assay muss das

Myoglobin aus Pferdeskelettmuskelzellen zunächst zu Desoxymyoglobin reduziert werden. Desoxymyoglobin enthält eine Häm-Gruppe mit freier Bindungsstelle, an welche freies CO binden kann. Durch die Bindung des CO verändert das Molekül sein Absorptionsspektrum.

Myoglobin kann in verschiedenen Formen vorliegen, abhängig vom Redoxzustand des Eisens als Zentralatom der Hämgruppe sowie der daran gebundenen Liganden. Beim Metmyoglobin (Ferrimyoglobin) liegt das Zentralatom der Häm-Gruppe in der Fe^{3+} Form vor. Liegt das Zentralatom in der Fe^{2+} Form vor, so spricht man von Ferromyoglobin (Schenkman et al. 1997, Millar et al., 1996). Nur als Ferromyoglobin ist es in der Lage Sauerstoff (Oxymyoglobin) und Kohlenmonoxid (Carboxymyoglobin) reversibel zu binden. Das kristalline Myoglobin hat zunächst eine braune Farbe, was dafür spricht, dass es hauptsächlich als Metmyoglobin vorliegt (Millar et al., 1996). Es wird zunächst in Wasser gelöst. Nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT) im Überschuss, welches als Reduktionsmittel fungiert, wird die Myoglobinlösung vollständig zu Desoxymyoglobin reduziert (Motterlini et al., 2002). Die Farbe ändert sich ins rötliche. Desoxymyoglobin besitzt ein einziges Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 557 nm und kann anhand seines Absorptionsspektrums zu Versuchsbeginn identifiziert werden. Gelangt nun freies CO in die Desoxymyoglobinlösung, bindet das CO an das Fe^{2+} -Ion in der Häm-Gruppe. Es entsteht CO-Myoglobin. COMb hat zwei Absorptionsmaxima, eines bei 540 nm und eines bei 577 nm (Motterlini et al., 2002). Der Vergleich der Absorptionsspektren von Desoxymyoglobin und COMb ist in Abbildung 5 dargestellt.

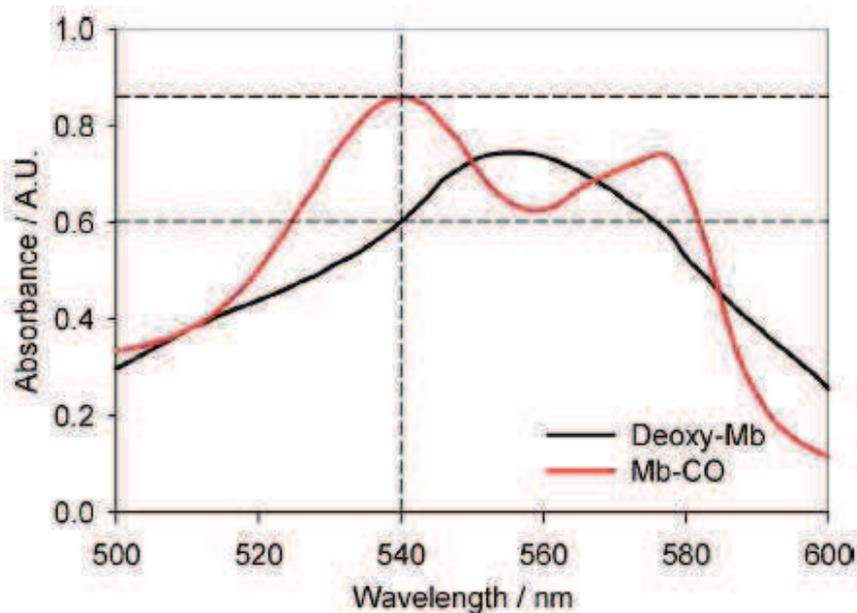


Abb. 5: Vergleich der UV/Vis Spektren von Deoxy-Myoglobin und Carboxymyoglobin (Bildquelle: Atkin et al., 2011, S. 5756)

Je mehr freies CO in die Lösung gelangt und daraufhin an das Desoxymyoglobin gebunden wird, desto mehr verliert das zu Versuchsbeginn vorhandene Absorptionsmaximum bei 557 nm an Intensität. Im Gegenzug gewinnen die Absorptionsmaxima des COMb bei 540 nm und 577 nm an Intensität. Je nach CO Menge ergibt sich also zunächst ein Mischbild, im Falle einer „CO-Sättigung“ des Myoglobins ergibt sich am Ende des Versuchs das reine Absorptionsspektrum des COMb (Motterlini et al., 2002).

Im Idealfall findet der Myoglobin-Assay unter Sauerstoffabschluss und Stickstoffatmosphäre statt um Verfälschungen, zum Beispiel durch Reoxidation des Desoxymyoglobins zu Oxymyoglobin oder Metmyoglobin, möglichst gering zu halten. Da in dieser Arbeit aber Experimente an metabolisch aktiven Zellen durchgeführt wurden, war ein kompletter Sauerstoffabschluss nicht sinnvoll und der Assay musste angepasst werden. Ziel war es, das Freisetzungverhalten unter genau den Laborbedingungen zu untersuchen, welche in unserem Labor für

Zellkulturuntersuchungen zu erreichen waren. Der Myoglobin-Assay musste deswegen dahingehend angepasst werden, dass er in 96-Wellplatten bei normaler Raumluft durchgeführt wurde. Die Platten wurden dafür mit klarer Folie bedeckt ohne jedoch vorher die Raumluft zu entfernen.

Neben dem qualitativen Nachweis ist unter guten Bedingungen auch ein quantitativer Nachweis des COs möglich, das heißt man kann bestimmen, wie viele Moleküle CO pro Komplex freigesetzt werden. Hierfür wird die Menge an COMb herangezogen, welche photometrisch mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden kann. Aufgrund der Anpassung des Assays an die Laborbedingungen, eigneten sich die Ergebnisse im Nachhinein jedoch nicht für eine quantitative Analyse. Ein Grund hierfür ist, dass kein Sauerstoffabschluss des Systems hergestellt wurde. Weitere mögliche Gründe werden im Diskussionsteil besprochen.

Eine 75 μM Myoglobinlösung wurde in 0,1 M Phosphatpuffer hergestellt. Diese Lösung wurde mit einem Überschuss an DTT reduziert und die beladenen Komplexe in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die unbeladenen Komplexe P1 und P2 werden zur Kontrolle ebenfalls untersucht.

Zu Versuchsbeginn wurde das Absorptionsspektrum der Lösung im Bereich von 500 - 600 nm in jedem Well gemessen. Danach wurde die Lösung in unter der UV-Lampe bei 356 nm und einem Abstand von 2 cm zur Plattenoberkante bestrahlt. Hierbei wurde alle 10 min die Bestrahlung unterbrochen und die Messung der Absorptionsspektren wiederholt. Insgesamt wurde auf diese Weise über 80 min bestrahlt und die Änderung der Absorptionsspektren beobachtet. Die Absorptionsspektren wurden in einer Auflösung von 3 nm Schritten gemessen.

3.2.7. Untersuchung des GC/cGMP Signalwegs (cGMP-Assay)

Zur Untersuchung des GC/cGMP Signalwegs wurde das „DetectX High Sensitivity Direct cGMP CLIA“ Kit der Firma Arbor Assays verwendet. Zum Nachweis des cGMPs wird in diesem Kit ein Chemilumineszenz Immunoassay verwendet.

Mit diesem Assay Kit ist es unter anderem möglich, die intrazelluläre cGMP-Konzentration zu bestimmen. Die Lumineszenz wird hierbei über cGMP-anhängige, enzymatische Umwandlung eines mitgelieferten Substrats erreicht.

Die verwendeten Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen in 4 ml Zellkulturmedium ausgesät und über 24 h (Hct116 Zellen) bzw. 48 h (HepG2 Zellen) anwachsen lassen. Die Hct116 Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen, die HepG2 Zellen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen je 60 mm Schale ausgesät. Nach der Anwachszeit wurden die Schalen lichtmikroskopisch untersucht und bei einer Konfluenz von 80-90 % für die Versuche verwendet.

Das konditionierte Medium wurde abpipettiert und in einem Falcon mit der zu testenden Substanz vermischt. Danach wurde es vorsichtig zurück pipettiert. Die Zellkulturschalen wurden dann unter der UV-Lampe bei 365 nm in einem Abstand von 2 cm über 40 min bestrahlt. Bei jedem Ansatz wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit 1 % DMSO mitgeführt. Zu jedem getesteten Stoff und zur Lösungsmittelkontrolle wurde eine Dunkelkontrolle mitgeführt. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle sowohl CORM-2 als auch SNP verwendet. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen wie unten beschrieben lysiert und aufgearbeitet. Der Assay wurde mit je 50 µl des Lysats nach dem mitgelieferten Protokoll in einer Antikörperbeschichteten 96-Wellplatte durchgeführt. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte im Wallac Victor 1420 über 0,1 Sekunden pro Well.

3.2.8. Aufarbeitung und Lyse der Zellen

Die Zellen wurden vom Medium getrennt und dreimal mit jeweils frischem PBS gespült. Im Anschluss wurden 500 µL des im Assay Kit mitgelieferten Lysepuffers auf die Zellen pipettiert. Dieser Puffer soll einerseits die Zellmembran auflösen und andererseits die cGMP abbauenden Phosphodiesterasen (PDE) inaktivieren. Nach 30 min Einwirkzeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet um

eine erfolgte Lyse sicherzustellen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Zellschaber möglichst vollständig abgekratzt und zusammen mit dem Lysepuffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach intensivem Vortexen wurden die Proben bei 13.200 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde für den cGMP-Assay verwendet. Die Proben wurden bei -80°C gelagert und später nach nochmaligem Vortexen und anschließender Zentrifugation für die Proteinbestimmung verwendet.

3.2.9. Proteinbestimmung (Lowry)

Die Proteinbestimmung des Zelllysates aus dem cGMP-Assay (siehe Kapitel 2.3.8.) wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit Hilfe des „Bio-Rad DC Protein-Assay“ Kit von Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Proteinstandard diente BSA, welches zur Erstellung einer Kalibrierung verwendet wurde (0,1 – 1,0 mg/ml). Die Proben wurden zunächst 1:2 mit dH₂O verdünnt. Danach wurden jeweils 5 µl der Lösungen auf einer 96-Wellplatte mit den in dem Kit enthaltenen Lösungen für 15 min inkubiert. Alle Proben wurden dreifach bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte im Plattenlesegerät bei 595 nm.

3.2.10. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Die Daten sind jeweils als Mittelwerte +/- SD angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde beim Myoglobinassay auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Alle Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen. Die statistische Signifikanz wurde anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (oneway ANOVA) mit anschließendem „*Dunnett's Multiple Comparison Test*“ ermittelt. Unterschiede mit $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Toxische Wirkung von UV-Licht

Zur Untersuchung der toxischen Wirkung des UV-Lichts wurde der MTT-Assay verwendet. Die Hct116 Zellen und die HepG2 Zellen wurden mit zwei verschiedenen UV-Handlampen bestrahlt. Dabei wurde der Abstand der Zellen zur Lampe variiert und über eine unterschiedliche Dauer bestrahlt. Durch dieses Vorgehen sollte im Zusammenhang mit den weiter unten aufgeführten Ergebnissen zur CO-Freisetzung herausgefunden werden ob sich eine der beiden verfügbaren Lampen zur Freisetzung des COs aus den Mangankomplexen eignet, ohne dabei die verwendeten Zellen zu stark zu schädigen. Es zeigt sich deutlich, dass die Zellviabilität durch die Bestrahlung mit dem Licht der Wellenlänge 312 nm in beiden Zelllinien schon nach 2-4 min Bestrahlungsdauer auf etwa den halben Wert im Vergleich zur Kontrolle abnimmt. Eine längere Bestrahlung hat bis zu der maximal getesteten Dauer von 16 min keinen signifikanten Effekt mehr auf die Viabilität der Zellen. Dieser Effekt wurde sowohl bei einem Abstand der Lampe zur 96-Wellplatte von 2 cm, als auch bei allen weiteren getesteten Abständen bis hin zu einem Abstand von 10 cm unverändert beobachtet. Bei beiden Zelllinien zeigte sich, dass die Viabilität mit steigendem Abstand der Lampe zu den Zellen leicht zunahm. In Abbildung 6 sind diese Ergebnisse exemplarisch für die Abstände 2 cm und 10 cm dargestellt. Lichtmikroskopisch zeigten die bestrahlten Zellen eine deutliche Veränderung der Morphologie mit geringerem Zytoplasmaanteil und Auflösung der Zellkontakte.

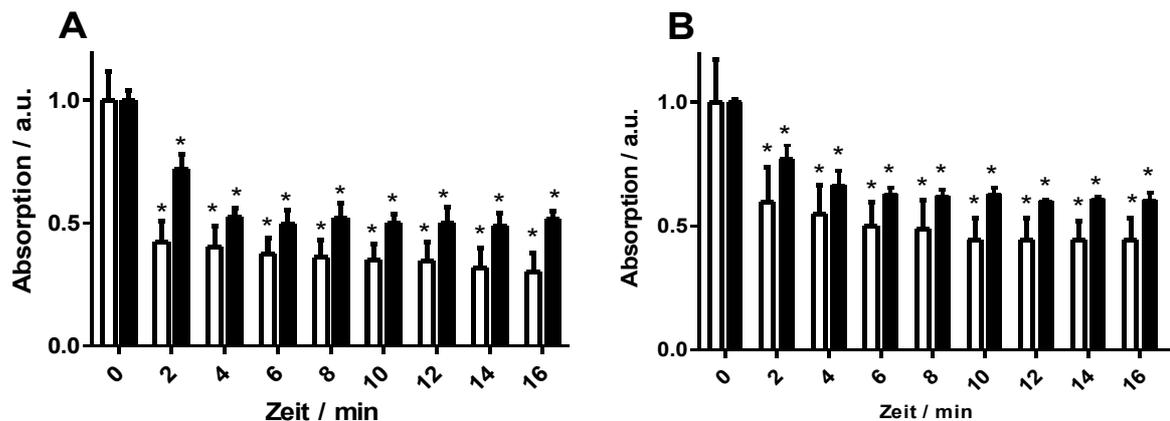


Abb. 6: Zellviabilität von Hct116 (A) und HepG2 (B) Zellen nach Bestrahlung. (312 nm)

15.000 (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) wuchsen über 24 h an. Danach wurden sie für die angegebene Zeit mit UV-Licht bestrahlt (365 nm). Die Viabilität wurde 24 h nach der Bestrahlung per MTT-Assay gemessen. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. Die Werte wurden auf die Kontrolle normiert (Kontrolle = 1, Mittelwert +/- SD, n=2/3, p<0.05).

A: weiße Balken: Hct116 Zellen, Bestrahlt aus 2 cm Entfernung (312 nm)

schwarze Balken: Hct116 Zellen, Bestrahlt aus 10 cm Entfernung (312 nm)

B: weiße Balken: HepG2 Zellen, Bestrahlt aus 2 cm Entfernung (312 nm)

schwarze Balken: HepG2 Zellen, Bestrahlt aus 10 cm Entfernung (312 nm)

Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm zeigte sich dagegen in beiden getesteten Zelllinien kein signifikant negativer Effekt auf die Zellviabilität. Dies gilt über eine Bestrahlungsdauer von 0-16 min und für alle getesteten Abstände. Auch Lichtmikroskopisch erschienen die Zellen morphologisch wie unbestrahlte Vergleichszellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse, sowie der ersten Ergebnisse aus den Versuchen zur CO-Freisetzung (s.u.) wurden die Versuche mit 365 nm Wellenlänge ausgeweitet, so dass die Bestrahlungsdauer auf 40 min erhöht wurde. Der Abstand der Lampe wurde auf 2 cm eingestellt. Wie Abbildung 7 zeigt, ist auch bei verlängerter Bestrahlungsdauer kein negativer Effekt auf die Zellviabilität nachweisbar.

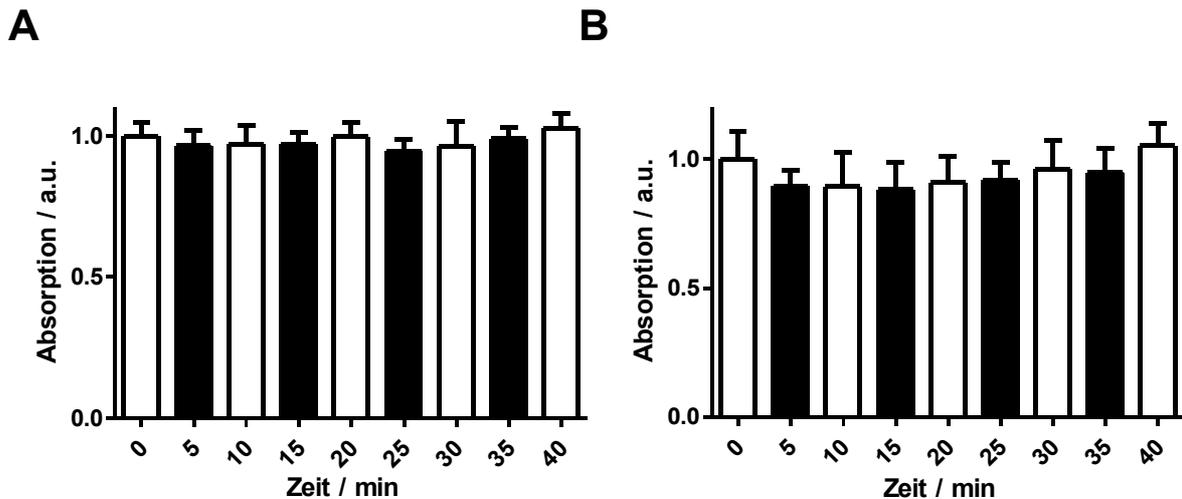


Abb. 7: Zellviabilität von Hct116 (A) und HepG2 (B) Zellen nach Bestrahlung. (365 nm)

15.000 (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) wuchsen über 24 h an. Danach wurden sie für die angegebene Zeit mit UV-Licht bestrahlt (365 nm). Die Viabilität wurde 24 h nach der Bestrahlung per MTT-Assay gemessen. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05).

4.2. CO-Freisetzung aus den Mangankomplexen

Parallel zu den Versuchen zur toxischen Wirkung von UV-Licht wurde getestet, welche Bestrahlungsdauer, Intensität und Wellenlänge mindestens benötigt wird, um CO aus den Mangankomplexen freizusetzen. Diese Parameter sollten wie bereits erwähnt möglichst so gewählt werden, dass die Zellen durch das UV-Licht nicht direkt geschädigt werden.

Zum Nachweis der CO-Freisetzung wurde ein modifizierter Myoglobin-Assay verwendet.

Mit Hilfe von DTT als Reduktionsmittel gelang es Desoxymyoglobin herzustellen und über sein Absorptionsspektrum nachzuweisen. Ohne weitere Behandlung blieb das Absorptionsmaximum über die gesamte Versuchsdauer von 80 min stabil bei 557 nm. Die Gesamtabsorption fiel über die Versuchsdauer ab. Ein repräsentativer Graph eines solchen Versuchsaufbaus ist in Abbildung 8 zu sehen

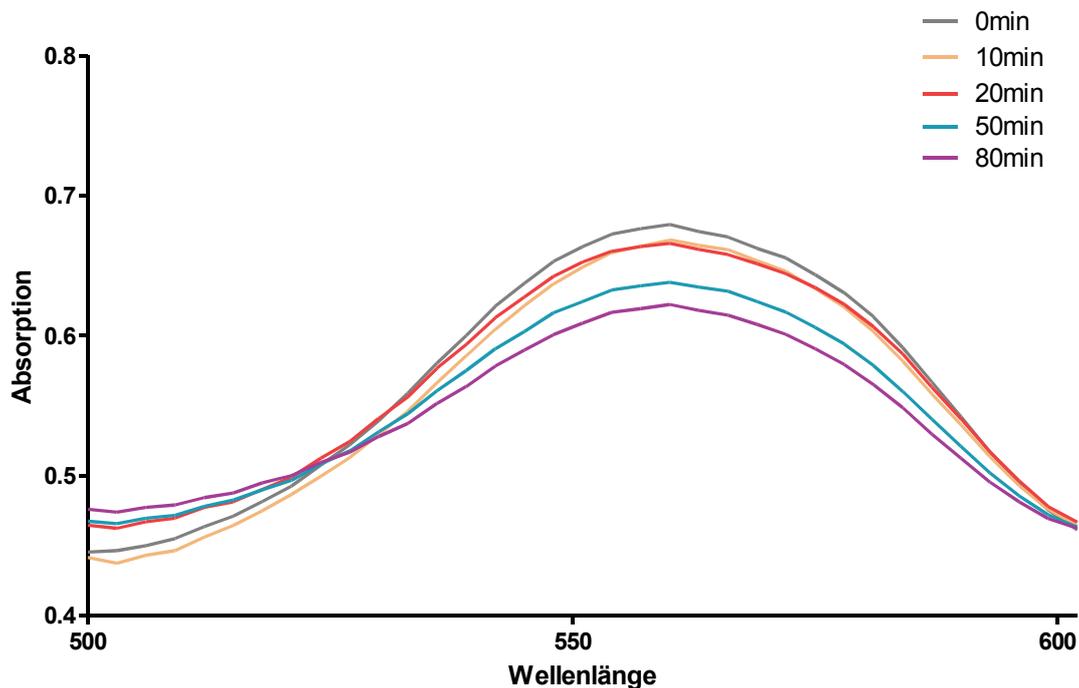


Abb. 8: Myoglobinassay ohne Substanz. (entspricht Kontrolle)

Die Myoglobinlösung wurde über die angegebene Dauer mit der Konrad-Benda N6.L bei 356 nm im Abstand von 2 cm bestrahlt (+1,2 % DMSO).

Die Bestrahlung der Desoxymyoglobinlösung ohne Zusatz von CO-freisetzenden Substanzen führte zu entsprechenden Kurvenverläufen. Ebenso zeigte sich bei Zugabe der Mangankomplexe, aber ohne UV-Bestrahlung keine Veränderung des Absorptionsmaximums. Vor allem beim braunfarbenen Polymerkomplex $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ zeigte sich jedoch eine absolut etwas höhere Absorption.

Bei Zugabe der CO-freisetzenden Substanzen und Bestrahlung sollte aufgrund des freigesetzten CO eine Veränderung des Absorptionsspektrums sichtbar werden. Für den Mangankomplex K1 ist diese Veränderung konzentrationsabhängig in Abbildung 9 abgebildet. Es fällt zum einen auf, dass zwei neue Absorptionsmaxima bei 545 nm und etwa 575 nm ausbilden. Zum anderen verschwindet das Absorptionsmaximum bei 557 nm. Diese Entwicklung ist vor allem beim Absorptionsmaximum bei 575 nm nur relativ schwach zu beobachten. Insgesamt ist die Veränderung der Absorptionsmaxima bei hohen Konzentrationen ab nach 20 – 30 min größtenteils abgeschlossen.

Ab einer Konzentration von 60 μM ist die Veränderung der Absorptionsmaxima in voller Ausprägung zu sehen. Bei Konzentrationen von K1 ab 60 μM zeigt sich ein deutlicher absoluter Anstieg der Absorption. Mögliche Gründe hierfür werden im Diskussionsteil beleuchtet.

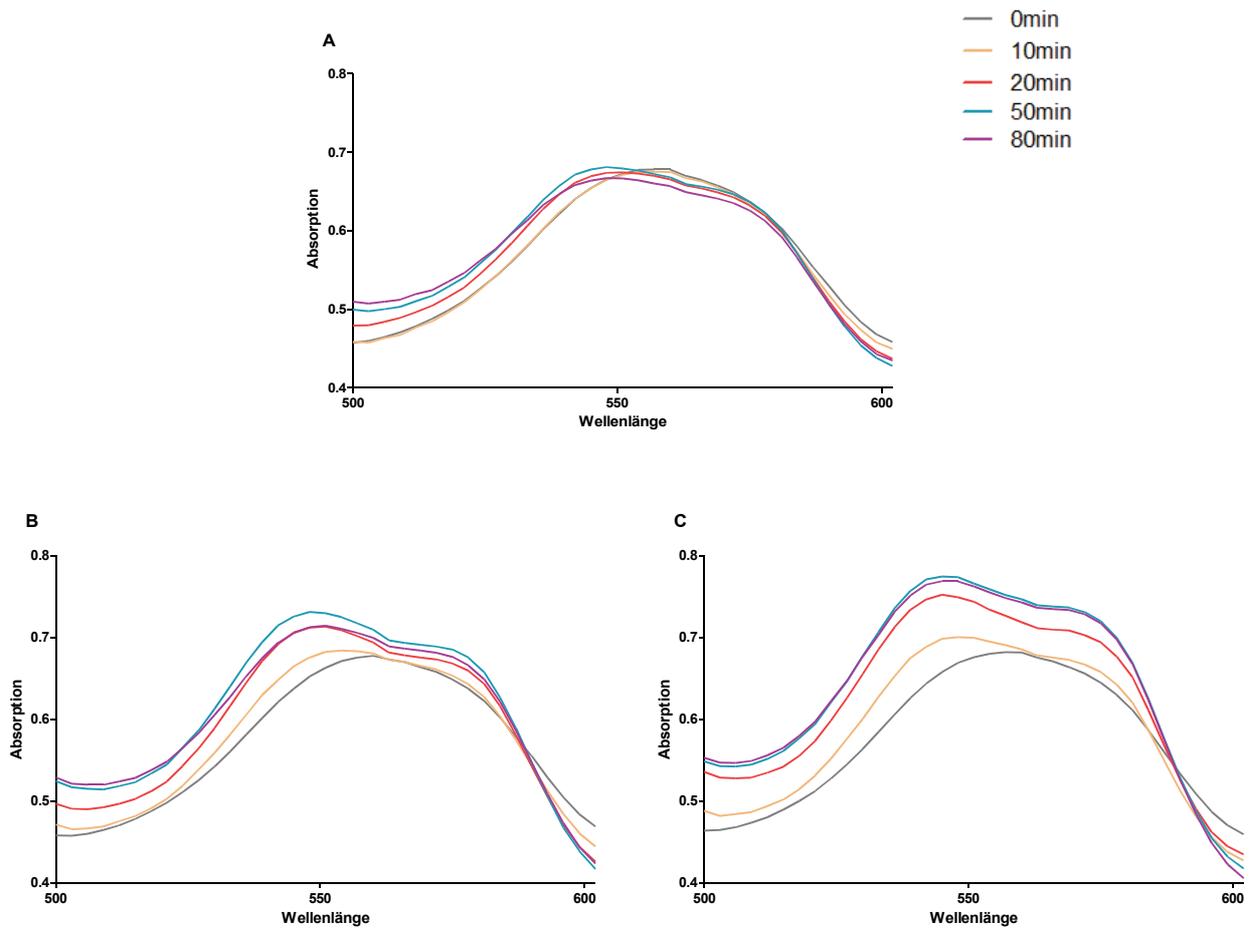


Abb. 9: Myoglobinassay von K1 in verschiedenen Konzentrationen und nach Bestrahlung (Konrad-Benda N6.L., 365 nm).

K1 wurde in Myoglobinlösung gelöst und über die angegebene Dauer bestrahlt. Die Konzentration wurde variiert:

A: 30 μM K1

B: 60 μM K1

C: 120 μM K1

Ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf ist für die anderen beiden monomeren Mangankomplexe K2 und K3 zu beobachten. Auch hier ist die Veränderung der Absorptionsmaxima nach 20-30 min weitgehend abgeschlossen. Ein absoluter Anstieg der Absorption, wie er bei K1 beobachtet wurde, lässt sich bei diesen beiden Stoffen nicht beobachten. Stattdessen bleibt die Kurve über 30 – 80 min stabil. Die Kurvenverläufe für die monomeren Mangankomplexe K2 und K3 sind in Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

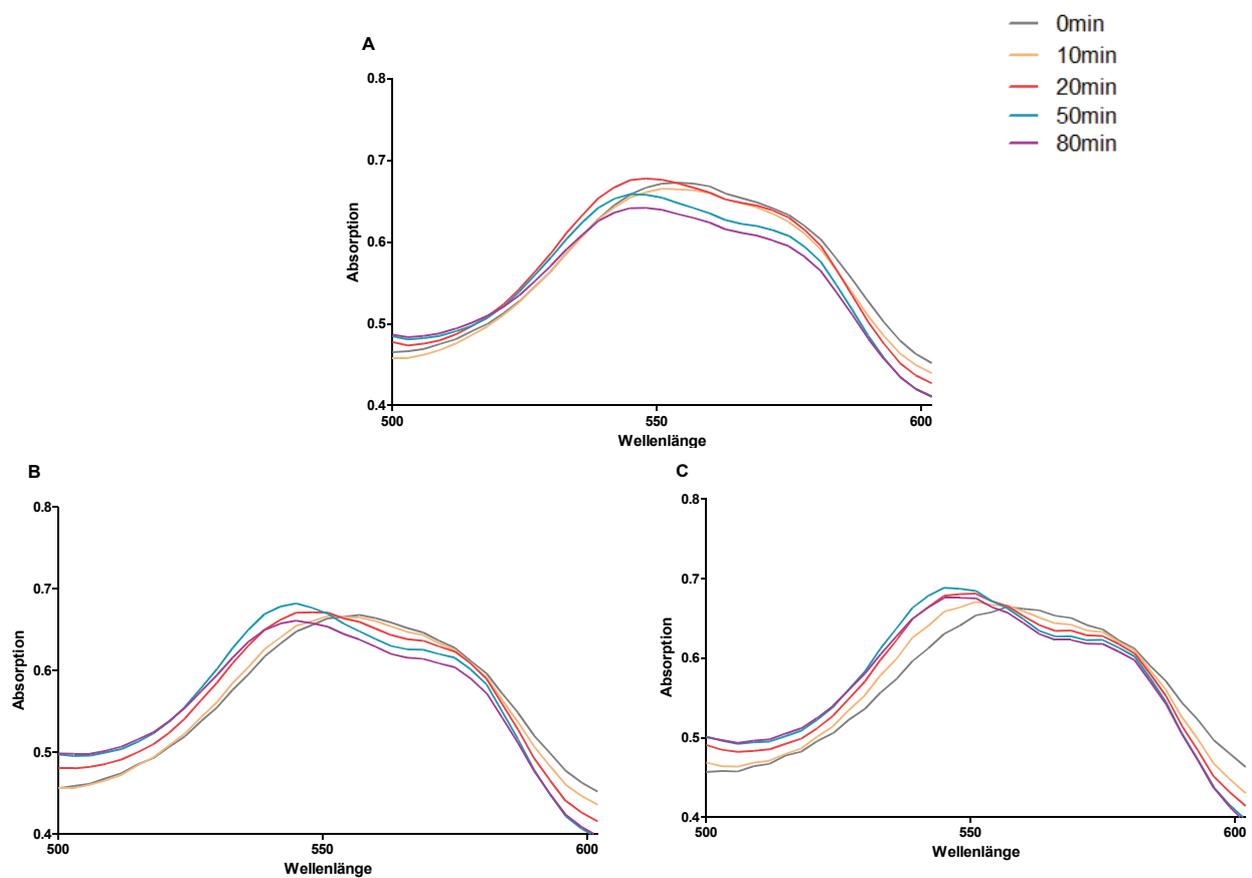


Abb. 10: Myoglobinassay von K2 in verschiedenen Konzentrationen und nach Bestrahlung (Konrad-Benda N6.L, 365 nm).

K2 wurde in Myoglobinlösung gelöst und über die angegebene Dauer bestrahlt. Die Konzentration wurde variiert:

A: 30 μM K2

B: 60 μM K2

C: 120 μM K2

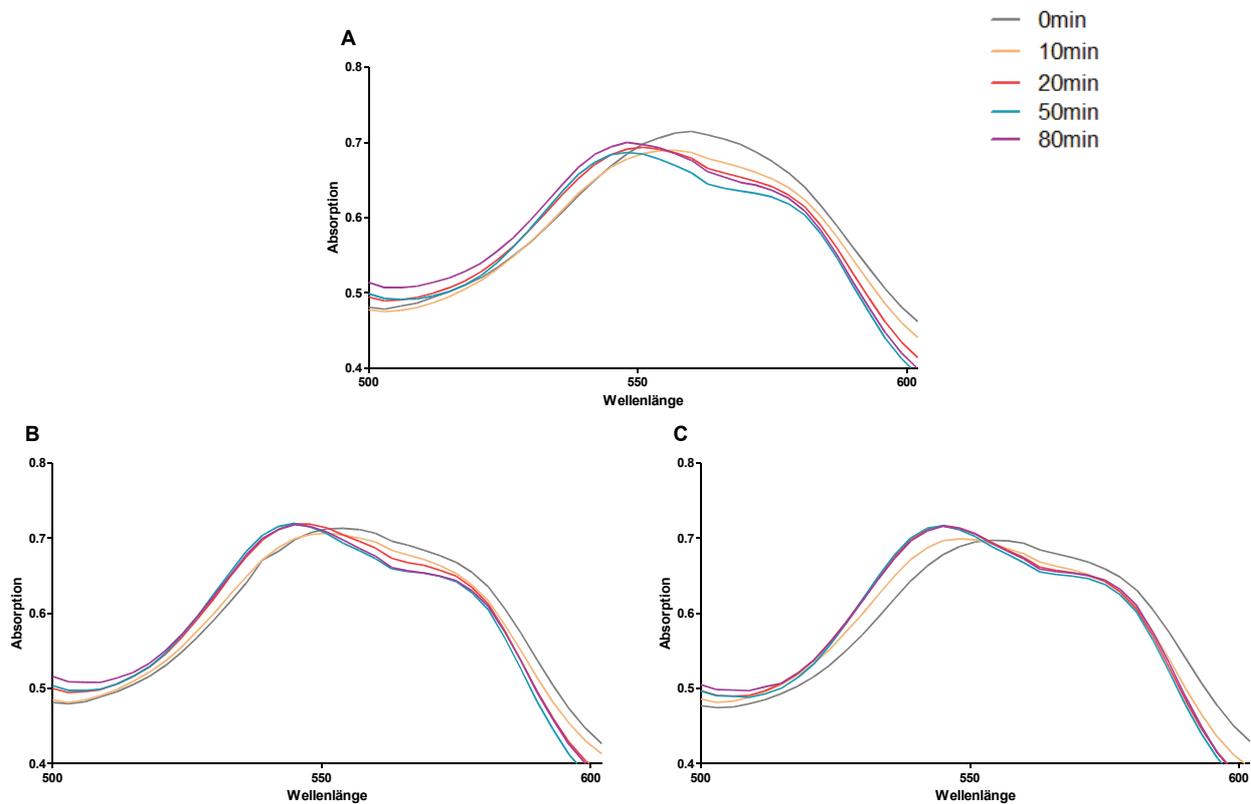


Abb. 11: Myoglobinassay von K3 in verschiedenen Konzentrationen und nach Bestrahlung (Konrad-Benda N6.L, 365 nm).

K3 wurde in Myoglobinlösung gelöst und über die angegebene Dauer bestrahlt. Die Konzentration wurde variiert:

A: 30 μM K3

B: 60 μM K3

C: 120 μM K3

Die CO Freisetzung durch die Polymere $\text{Mn}(\text{CO})_3@P1$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3@P2$ konnte durch den Myoglobinassay nicht eindeutig nachgewiesen werden. Mögliche Erklärungen hierzu werden im Diskussionsteil erläutert.

Das bereits bekannte CORM-2 wurde bei der Durchführung des Myoglobin-Assays als Positivkontrolle verwendet. Da CORM-2 direkt beim Lösen in DMSO in einer heftigen Reaktion CO freisetzt, musste es möglichst zügig in die Myoglobinlösung pipettiert werden. Auch bei CORM-2 werden die Absorptionsmaxima bei 545 nm und 575 nm, welche für eine COMb Bildung

sprechen ausgeprägt. Ein zeitlicher Verlauf ist hier nicht zu erkennen, das heißt die Ausprägung ist schon bei der initialen Messung maximal. In höheren Konzentrationen sind die Absorptionsmaxima etwas deutlicher ausgeprägt als in niedrigen. Abbildung 12 zeigt die Absorptionsmaxima beim Einsatz von CORM-2 in einer Konzentration von 50 μM bzw. 100 μM .

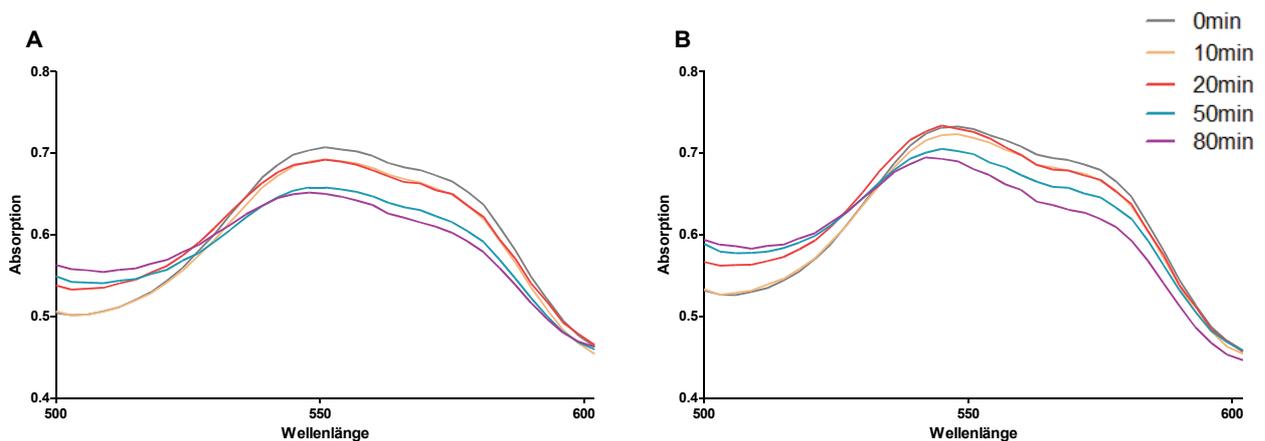


Abb. 12: Myoglobinassay von CORM-2 in verschiedenen Konzentrationen und nach Bestrahlung (Konrad-Benda N6.L, 365 nm).

CORM-2 wurde in Myoglobinlösung gelöst und über die angegebene Dauer bestrahlt.

A: 50 μM CORM-2

B: 100 μM CORM-2

4.3. Toxizitätstests der Substanzen mit UV-induzierter CO-Freisetzung

Um Aussagen über die Verträglichkeit der Substanzen sowie die potentielle Wirkung als Chemotherapeutikum zu erhalten wurden Toxizitätstests durchgeführt. Zur Überprüfung der Zellviabilität wurde der MTT-Assay verwendet. Hierbei wurden die CO-beladenen Mangankomplexe K1, K2 und K3, die CO-beladenen Polymere Mn(CO)₃@P1 und Mn(CO)₃@P2 sowie die unbeladenen Polymere P1 und P2 untersucht. Alle CO beladenen Substanzen wurden unter UV-Bestrahlung und in Dunkelheit getestet. Hierbei sollte die toxische Wirkung der Substanzen und deren Spaltprodukte – insbesondere CO untersucht werden. CORM-2 wurde zum Vergleich ebenfalls eingesetzt.

Die Ergebnisse der Toxizitätstests für das CO-beladenen Monomers K1 sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Substanz zeigt in den in beiden Zelllinien getesteten Konzentrationen bis 50 μM keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität. Dies gilt sowohl für die mit UV-Licht bestrahlten Proben, als auch für die Dunkelkontrollen. Allenfalls bei einer Konzentration von 100 μM , die nur in HepG2 Zellen getestet wurde zeigt sich eine sehr leichte Verringerung der Viabilität in den belichteten Proben.

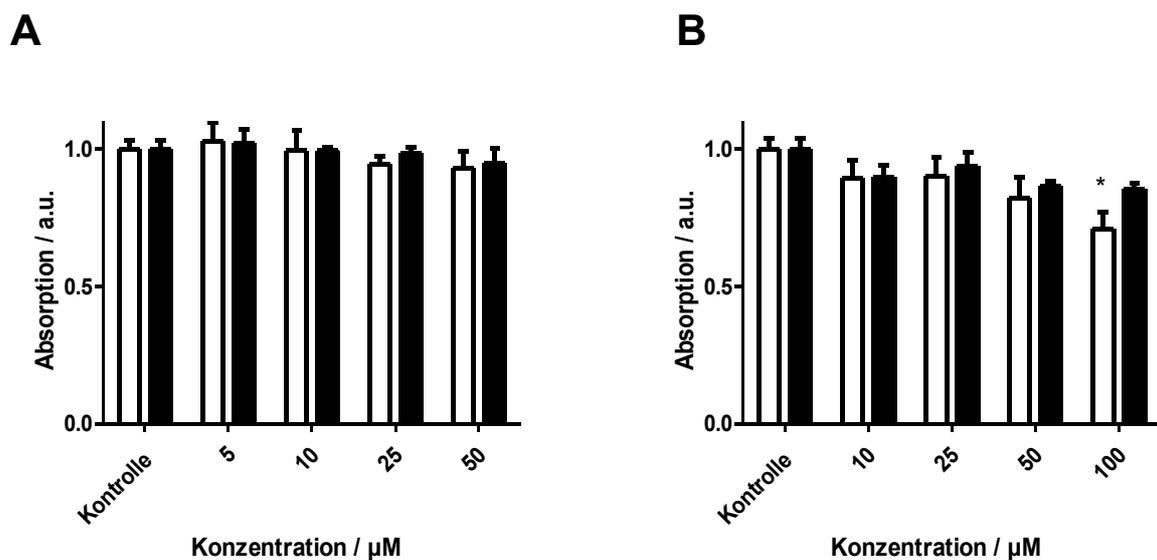


Abb. 13: Toxizität von K1 in Hct116 und HepG2 Zellen +/- Bestrahlung.

Nach 24-stündiger Anwachszeit wurden 15.000 Zellen (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) mit den angegebenen Konzentrationen von **K1** inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Die Viabilität wurde 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05).

A: weiße Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit K1 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit K1 ohne Bestrahlung

B: weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit K1 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit K1 ohne Bestrahlung

Das Monomer K2 zeigt in getesteten Konzentrationsbereich bis 100 μM ebenfalls in beiden Zelllinien keine signifikante Verringerung der Viabilität. Getestet wurde auch hier sowohl in Hct116 Zellen als auch in HepG2 Zellen. Die Ergebnisse der Versuche mit K2 sind in Abbildung 14 dargestellt.

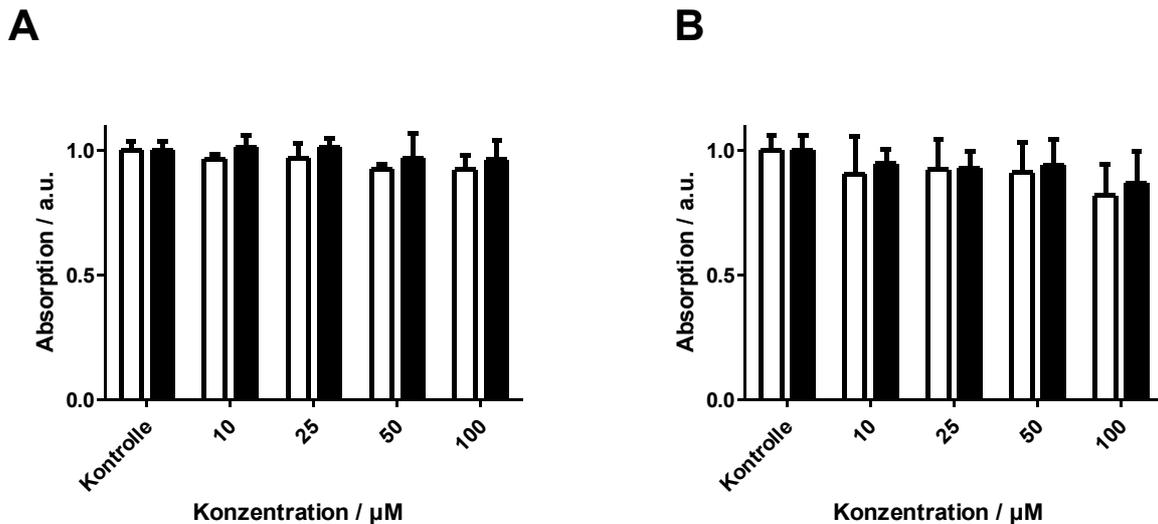


Abb. 14: Toxizität von K2 in Hct116 und HepG2 Zellen +/- Bestrahlung.

Nach 24-stündiger Anwachszeit wurden 15.000 Zellen (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) mit den angegebenen Konzentrationen von **K2** inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Die Viabilität wurde 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, $p < 0.05$).

A: weiße Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit K2 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit K2 ohne Bestrahlung

B: weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit K2 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit K2 ohne Bestrahlung

Eine leichte Abnahme der Viabilität zeigt sich bei der Testung mit dem Monomer K3. Diese Abnahme ist in beiden Zelllinien in signifikantem Ausmaß zu beobachten. So liegt die Viabilität der Zellen bei einer Konzentration von K3 von 50 μM zwischen 55 % und 65 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Abnahme der Viabilität ist aber bereits bei einer Konzentration von 5-10 μM signifikant nachweisbar. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Viabilität der bestrahlten Probe immer etwas niedriger ist als in der unbestrahlten Probe. Dieser Effekt ist allerdings nicht signifikant. Abbildung 15 zeigt eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität nach Inkubation mit K3 in einer Konzentration von 5 bis 50 μM .

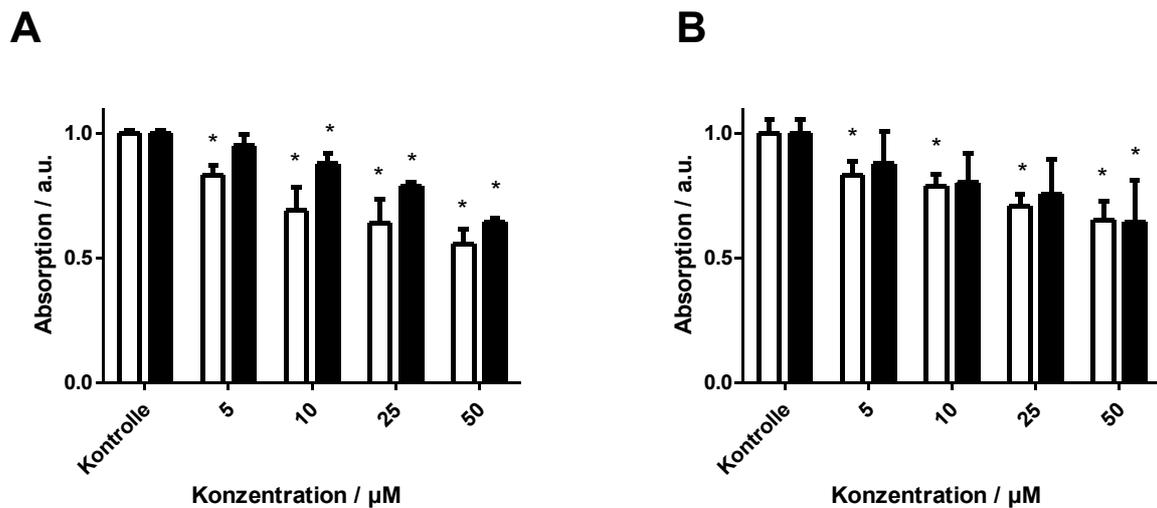


Abb. 15: Toxizität von K3 in Hct116 und HepG2 Zellen +/- Bestrahlung.

Nach 24-stündiger Anwachszeit wurden 15.000 Zellen (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) mit den angegebenen Konzentrationen von **K3** inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Die Viabilität wurde 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05).

A: weiße Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit K3 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit K3 ohne Bestrahlung

B: weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit K3 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit K3 ohne Bestrahlung

Das CO beladene Polymer $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ wurde bis zu einer Konzentration von 225 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Die Ergebnisse werden in Abbildung 16 gezeigt. Bei diesem Polymer zeigte sich keine Verringerung der Viabilität in Dunkelheit und unter UV-Licht. Auch eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der geringen Löslichkeit nicht getestet werden.

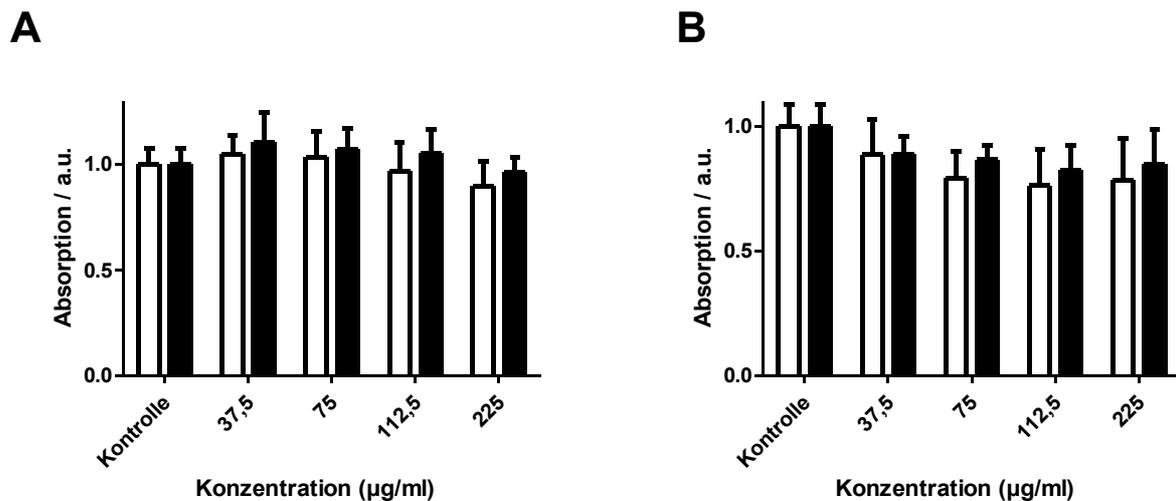


Abb. 16: Toxizität von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ in Hct116 und HepG2 Zellen +/- Bestrahlung.

Nach 24-stündiger Anwachszeit wurden 15.000 Zellen (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) mit den angegebenen Konzentrationen von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Die Viabilität wurde 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05).

- A:** weiße Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
 schwarze Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ ohne Bestrahlung
- B:** weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
 schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ ohne Bestrahlung

Deutlich anders verhält sich das andere CO beladene Polymer $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$, dessen graphische Versuchsauswertung in Abbildung 17 zu sehen ist. Hier nimmt die Viabilität bereits in einer geringen Konzentration von 75 µg/ml ab und ist ab einer Konzentration von 112,5 µg/ml praktisch nicht mehr nachweisbar. Auch bei dieser Substanz verhalten sich beide Zelllinien sehr ähnlich.

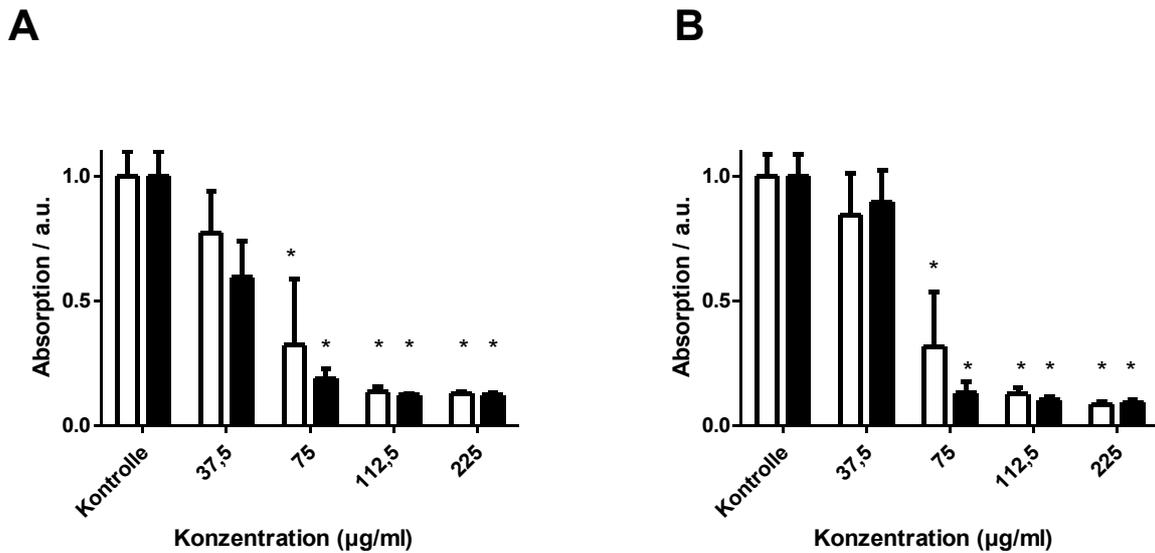


Abb. 17: Toxizität von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ in Hct116 und HepG2 Zellen +/- Bestrahlung.

Nach 24-stündiger Anwachszeit wurden 15.000 Zellen (Hct116) bzw. 25.000 Zellen (HepG2) mit den angegebenen Konzentrationen von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Die Viabilität wurde 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05 *=signifikant gegenüber Kontrolle).

- A:** weiße Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ mit Bestrahlung (365 nm, 40min)
 schwarze Balken: Hct116 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ ohne Bestrahlung
- B:** weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
 schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ ohne Bestrahlung

An HepG2 Zellen wurden außerdem noch die beiden unbeladenen Polymere P1 und P2 getestet. Auch wenn hier kein Zerfall durch UV-Licht zu erwarten war, wurden auch hier die bestrahlten mit den unbestrahlten Proben gegenübergestellt um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Ergebnisse aus den Versuchen sind in Abbildung 18 dargestellt. Bei den unbeladenen Substanzen zeigt sich keine signifikante Verringerung der Viabilität. Es ist weiterhin kein Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben nachweisbar.

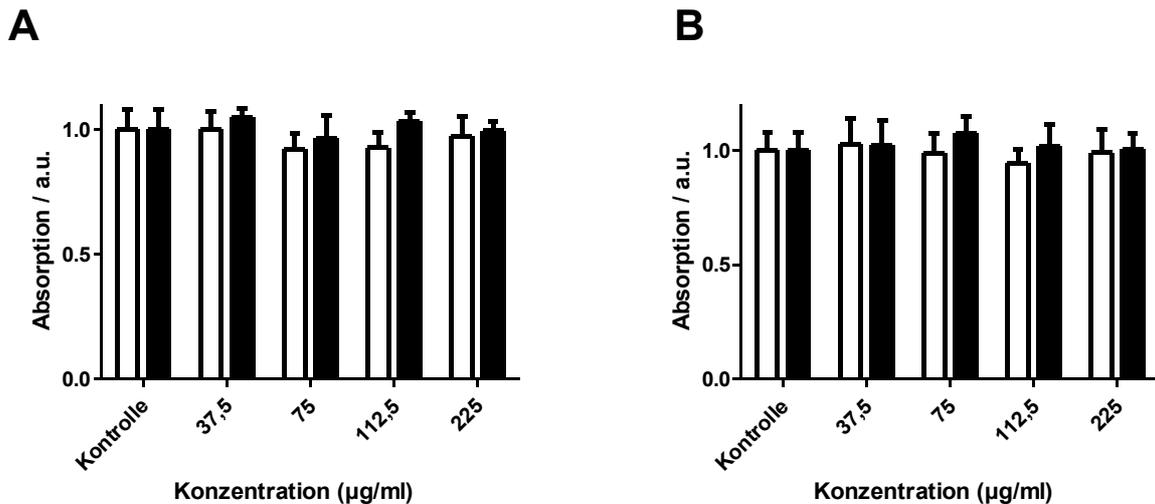


Abb. 18: Toxizität von P1 (A) und P2 (B) in HepG2 Zellen +/- Bestrahlung.

Nach 24-stündiger Anwachszeit wurden 25.000 Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von P1 und P2 inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Die Viabilität wurde 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Die Absorption korreliert mit der Zellviabilität. (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05).

A: weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit P1 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit P1 ohne Bestrahlung

B: weiße Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit P2 mit Bestrahlung (365 nm, 40 min)
schwarze Balken: HepG2 Zellen, 24 h inkubiert mit P2 ohne Bestrahlung

4.4. Induktion des GC / cGMP Signalweges durch CO-freisetzende Mangankomplexe

Um nochmalig zu beweisen, dass die Substanzen CO freisetzen und um die Wirkung des freigesetzten CO auf die Zellen durch einen zellulären Signalweg nachzuweisen, wurde der GC / cGMP Signalweg gewählt. Der cGMP Gehalt wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenzassays bestimmt. Zunächst wurde überprüft, ob ein Anstieg des cGMP Gehalts bei einer hohen eingesetzten Konzentration der jeweiligen CO - freisetzenden Substanz erreicht werden kann. Als Positivkontrolle wurde hierfür SNP verwendet, welches den GC / cGMP Signalweg über die Freisetzung von NO aktiviert (Katsuki et al., 1977). Hierbei zeigte sich in Vorversuchen, dass die Hct116 Zellen deutlich reaktiver gegenüber SNP waren als die HepG2 Zellen. Aus diesem Grund wurden die weiteren

Versuche mit den zu testenden Substanzen an Hct116 Zellen durchgeführt. Dafür wurde eine Konzentration von 225 µg / ml für die Polymere, bzw. von 100 µM für alle anderen Substanzen verwendet. Wie in Abbildung 19 abgebildet fällt auf, dass die belichteten Proben bei den monomeren CO-Trägern K1, K2 und K3 einen signifikanten, etwa um das dreifache höheren cGMP Gehalt aufweisen als die Lösemittelkontrolle und die unbelichtete Kontrolle der jeweiligen Substanz. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Anstieg, der durch die CO-freisetzende Kontrollsubstanz CORM-2 erreicht wurde. Das als weitere Positivkontrolle eingesetzte, NO-freisetzende SNP konnte den cGMP Gehalt noch deutlich stärker Anstiegen lassen, nämlich etwa auf das 12-fache. Die polymeren Mangankomplexe Mn(CO)₃@P1 und Mn(CO)₃@P2 konnten in der eingesetzten Konzentration keine nachweisbare Erhöhung des intrazellulären cGMP Gehalts bewirken.

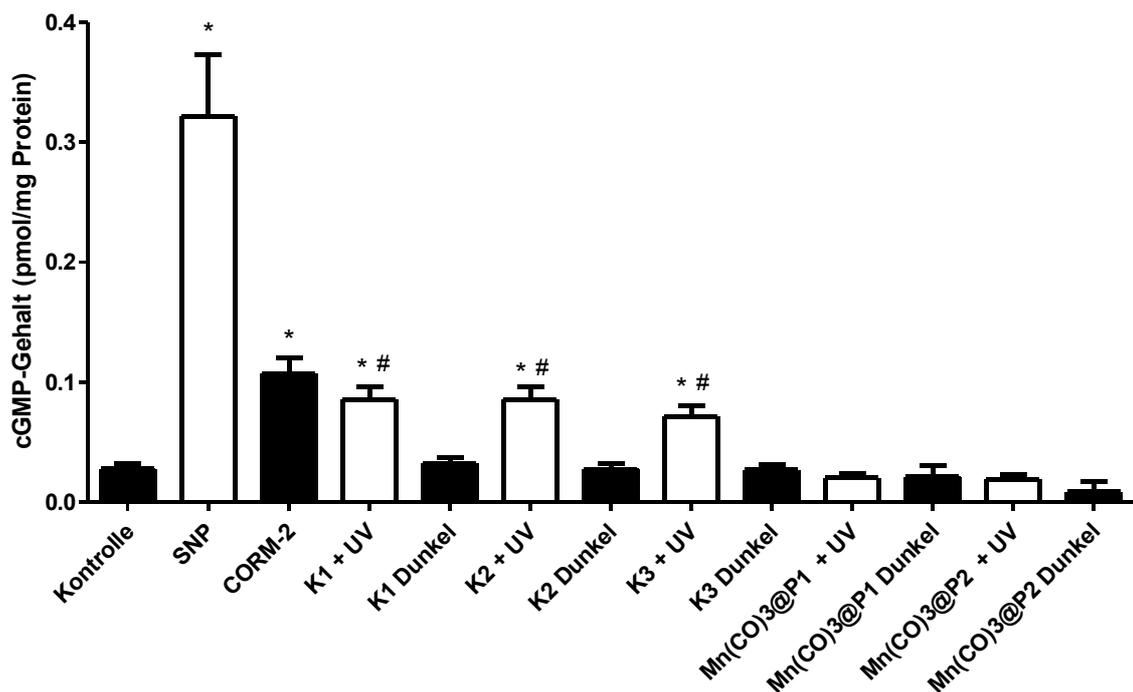


Abb. 19: Intrazellulärer cGMP Gehalt in Hct116 Zellen

Nach 48-stündiger Anwachszeit wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen mit 100µM der angegebenen Substanz (bzw. 225 µg/ml bei Mn(CO)₃@P1 und Mn(CO)₃@P2) inkubiert, +/- Bestrahlung (365 nm) über 40 min. Der intrazelluläre cGMP Gehalt wurde anschließend mit Hilfe eines CLIA-Kits bestimmt. Angegeben ist der cGMP Gehalt (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05).

* = signifikant gegenüber Kontrolle ; # = signifikant gegenüber unbelichteter Probe

Nach Abschluss dieser ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Erhöhung des intrazellulären cGMP Gehalts auch konzentrationsabhängig ist. Hierfür wurden exemplarisch die Substanzen K1 und K3, sowie die Positivkontrolle SNP untersucht. Abbildung 20 zeigt zunächst die Konzentrationsabhängigkeit bei SNP. Bereits ab 25 μM ist der intrazelluläre cGMP Gehalt signifikant erhöht. Bei einer Verdopplung der SNP-Konzentration auf 50 μM steigt der cGMP Gehalt um etwa das dreifache. Eine weitere Verdopplung auf 100 μM zeigt einen geringeren Effekt.

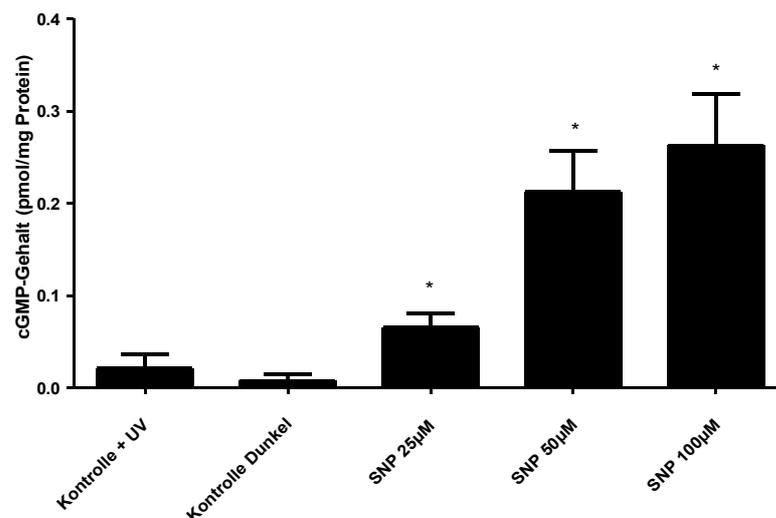


Abb. 20: Intrazellulärer cGMP Gehalt in Hct116 Zellen inkubiert mit SNP

Nach 48-stündiger Anwachszeit wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen mit der angegebenen Konzentration von SNP inkubiert. Der intrazelluläre cGMP Gehalt wurde anschließend mit Hilfe eines CLIA-Kits bestimmt. Angegeben ist der cGMP Gehalt (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $p<0.05$). * = signifikant gegenüber Kontrolle

Vergleichbare Ergebnisse zeigt die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären cGMP Steigerung in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge der Mangankomplexe K1 und K3. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 abgebildet. Auch hier steigt der cGMP Gehalt abhängig von der eingesetzten Menge, wird jedoch erst bei einer Konzentration von 50 μM signifikant. Insgesamt fällt der Anstieg aber deutlich geringer aus als beim NO-Donator SNP. Bei den nicht belichteten Proben zeigt sich keine Erhöhung des intrazellulären cGMP Gehalts. Bereits bei der Lösemittelkontrolle scheint sich jedoch schon ein geringer Anstieg des cGMP Gehalts nur durch die UV-Bestrahlung bemerkbar zu machen. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant.

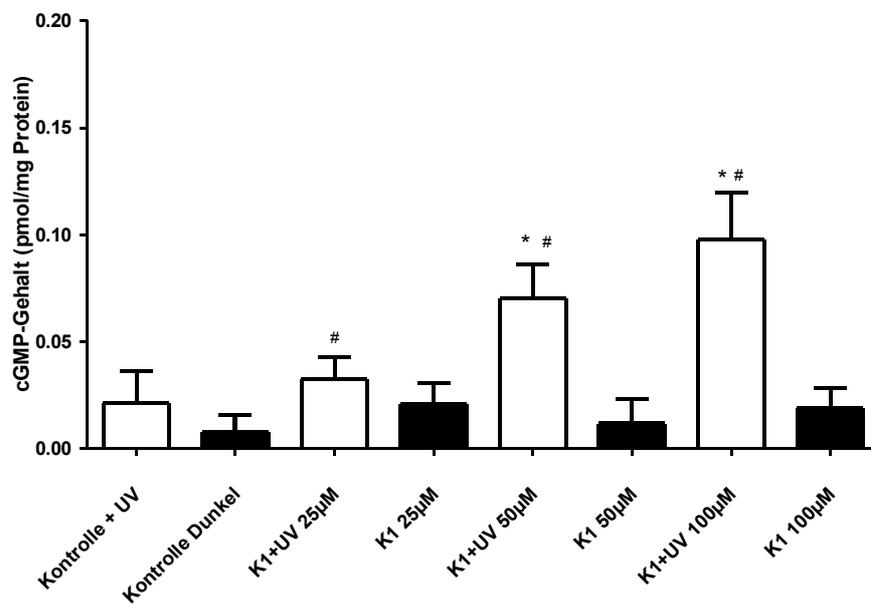
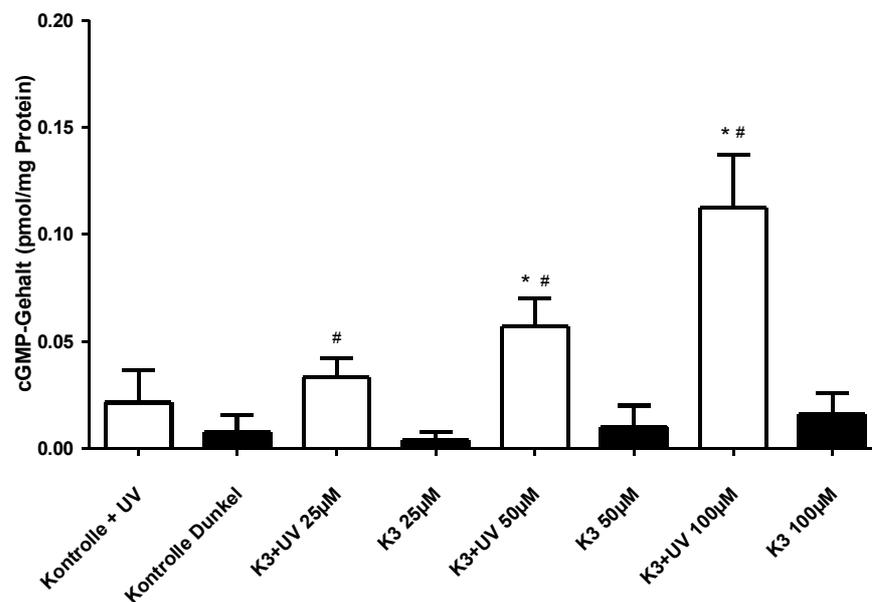
A**B**

Abb. 21: Intrazellulärer cGMP Gehalt in Hct116 Zellen inkubiert mit K1 (A) & K3 (B)

Nach 48-stündiger Anwachszeit wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen mit der angegebenen Konzentration von **K1** (A) bzw **K3** (B) inkubiert. Der intrazelluläre cGMP Gehalt wurde anschließend mit Hilfe eines CLIA-Kits bestimmt. Angegeben ist der cGMP Gehalt (Mittelwert +/- SD, n=3, p<0.05). * = signifikant gegenüber belichteter Kontrolle # = signifikant gegenüber unbelichteter Kontrolle

A: Hct116 Zellen inkubiert mit K1

B: Hct116 Zellen inkubiert mit K3

5. Diskussion und Schlussfolgerungen

CO ist ein zellulärer Botenstoff mit vielfältigen Wirkungen auf intrazelluläre Signalwege. Inwiefern diese Wirkungen pharmakologisch nutzbar gemacht werden können, ist bisher nur schwer abzusehen. Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, dass vor allem Effekte im Bereich der Inflammation und Immunmodulation vielversprechend untersucht werden (Otterbein et al., 2000, Allanson & Reeve, 2007). Vor dem Hintergrund eines möglichen pharmakologischen Einsatzes von CO wurden in dieser Arbeit Trägermoleküle für CO auf ihre Toxizität und die Möglichkeit der CO Freisetzung im Nährmedium untersucht. Diese Trägermoleküle waren zum Teil an ein Polymerrückgrat gebunden, damit zukünftig der *EPR-effect* auf die Wirkungen des CO kombiniert angewendet werden kann. Die Nutzung des *EPR-effects* bietet sich vor allem im Hinblick auf die toxische Wirkung von CO im Blut an, welche eine systemische Anwendung in hohen Konzentrationen limitieren würde. Bei der Herstellung der untersuchten Substanzen wurden zum ersten Mal CO-tragende Mangankomplexe mit dem Ziel der Nutzung des *EPR-effects* an entsprechende Polymere gebunden. Die Verträglichkeit dieser Verbindungen wurde in dieser Arbeit an humanen Krebszelllinien getestet.

5.1. Toxische Wirkungen von UV-Licht

Es ist bekannt, dass die Bestrahlung mit UV-Licht die DNA im Zellkern vor allem durch Bildung von Pyrimidindimeren schädigt (Weinfeld et al., 1989). Diese können bei intakten Reparaturmechanismen durch die Nukleotidexzisionsreparatur beseitigt werden. Es ist also davon auszugehen, dass auch die in den Experimenten verwendeten Zellen in der Lage sind, Schäden zu reparieren, die durch die UV-Bestrahlung induziert wurden (Wani et al., 2002). Es ist jedoch auch bekannt, dass diese Reparaturmechanismen oft eine Unterbrechung des Zellzyklus erfordern, welche dazu führt, dass Wachstum und metabolische Aktivität der Zellen verringert werden (Pines, 1999, Bulavin et al., 2001). Dieser Effekt soll möglichst gering gehalten werden, damit er die Ergebnisse der Toxizitätstests und des cGMP-Assays möglichst wenig beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei der Bestrahlung mit 4 W bei 365 nm selbst bei einem geringen Abstand und einer relativ langen Bestrahlungsdauer keine signifikante Verringerung der Zellviabilität in Hct116 Zellen und HepG2 Zellen nachgewiesen werden konnte. Somit konnten die zugefügten DNA-Schäden sehr schnell repariert werden oder waren zu gering um zu Apoptose oder Zellzyklusarrest zu führen. Im Gegensatz dazu wurden beide Zelllinien bei Bestrahlung mit 6 W bei 312 nm schon nach kurzer Zeit geschädigt. Betrachtet man bei der Bestrahlung auf dieser Wellenlänge den Grad der Abnahme der Viabilität in Zusammenhang mit der Bestrahlungsdauer wird klar, dass schon ab einer Dauer von etwa 4 min keine weitere Abnahme der Viabilität mit zunehmender Bestrahlungsdauer mehr erreicht werden kann. Da man bei einer direkten Zellschädigung durch Nekrose oder bei einer Induktion von Apoptose davon ausgehen müsste, dass auch die verbleibenden Zellen konzentrationsabhängig zu Grunde gehen sind beide Vorgänge in diesem Falle unwahrscheinlich. Vielmehr deutet dieser Verlauf darauf hin, dass die Zellen durch die Bestrahlung mit der UV-Lampe in Zellzyklusarrest gehen und sich deswegen nach der Anwachszeit nicht mehr teilen. Die Viabilität bleibt deswegen auch bei weiterer Bestrahlung zunächst gleich. Die Tatsache, dass UV-Licht zu einem Zellzyklusarrest, vor allem in der G2/M-Phase, führen kann wurde unter anderem von Bulavin et al. (2001) untersucht. Dort wurde die Rolle der p38-Kinase bei der Initiation des Zellzyklusarrests nach UV-Bestrahlung beschrieben, welche benötigt wird um den Zellzyklusarrest in der G2-Phase einzuleiten (Bulavin et al., 2001).

Die Ergebnisse aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen lassen keinen Schluss darüber zu, ob ein Wiedereintritt in den Zellzyklus nach der Schädigung mit der 312 nm UV-Lampe möglich gewesen wäre. In Einzelversuchen, bei denen die Zellen nach der Bestrahlung und einem Austausch des Kulturmediums für weitere 48 h kultiviert wurden, konnte jedoch keine erneute Zellvermehrung beobachtet werden. Es wäre auch denkbar, dass der DNA-Schaden so groß geworden ist, dass ein Wiedereintritt in den Zellzyklus verhindert wird.

Nachdem die Bestrahlungsversuche mit den beiden verwendeten UV-Lampen in beiden Zelllinien durchgeführt wurden, wurde aufgrund der geringeren Schädigung entschieden, die Wirkungen des durch UV-Bestrahlung freigesetzten CO im Folgenden nur unter Einsatz der 365 nm Lampe weiter zu untersuchen. Auf weitere Untersuchungen mit den im Zellzyklusarrest befindlichen Zellen nach Bestrahlung mit 312 nm UV-Licht wurde also verzichtet.

5.2. CO-Freisetzung im Myoglobin-Assay

Der UV/Vis-spektrometrische Myoglobin-Assay wurde verwendet um zu beweisen, dass CO unter den hergestellten Versuchsbedingungen aus den Mangankomplexen freigesetzt werden kann. Die präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies der Fall ist. Sie sind jedoch kritisch zu hinterfragen, da der eigentlich benötigte Sauerstoffabschluss bei unserer Versuchsdurchführung nicht hergestellt werden konnte. Dass dies den Verlauf des Spektrums beeinflusst wird deutlich, wenn man das Verhalten des Absorptionsmaximum des Desoxymyoglobins betrachtet. Das Maximum bildet sich sogar in den unbelichteten bzw. in den Lösemittelkontrollen über die Zeit etwas zurück. (vgl. Abb. 8). Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist die Reoxidation des Myoglobins. Zu Beginn des Assays muss dieses in der maximal reduzierten Form als Desoxymyoglobin vorliegen. Hierbei ist das zentrale Eisenatom der Hämgruppe 2-fach positiv geladen und besitzt eine freie Bindungsstelle. Unter Einwirkung von in der Myoglobinlösung gelöstem Sauerstoff kann das Desoxymyoglobin über die Zeit zum einen zu Oxymyoglobin oxidieren, bei dem ein Molekül O_2 an die freie Bindungsstelle bindet. Zum anderen kann das Eisenatom in seine 3-wertige Form oxidiert werden, wodurch Metmyoglobin entsteht. Diese Oxidationen können unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig verhindert werden. Bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse führte dieser Störfaktor dazu, dass auf eine quantitative Bestimmung der CO-Freisetzung komplett verzichtet werden musste.

Bei CO-beladenen Komplexen K2-K3 konnte gezeigt werden, dass sich das UV/Vis-Spektrum dahingehend verändert, dass die Absorptionsmaxima des COMb (540 nm und 577 nm) nach UV-Bestrahlung hervortreten. Gleichzeitig bildet sich das vorher bestehende Absorptionsmaximum bei 557 nm leicht zurück. Gleichartige Veränderungen des Absorptionsspektrums wurden sowohl in der Arbeit von Michaela Wahl, in der die Substanzen synthetisiert wurden (2010), als auch in vergleichbaren Arbeiten (Berends & Kurz, 2012, Kunz et al., 2013), welche diese Methode verwenden, beobachtet. Auch bei K1 zeigt sich diese Veränderung der Absorptionsmaxima, wobei jedoch über die Zeit ein Anstieg der Absorption über das gesamte gemessene Spektrum beobachtet werden kann. Die Freisetzung von CO aus den Polymeren $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, da die gemessenen Absorptionsspektren kaum die dafür charakteristischen Änderungen zeigten und stattdessen durch andere Effekte überlagert wurden.

Während bei K1 die Absorption über das gesamte Spektrum über die Zeit ansteigt, fällt sie bei $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ über die Zeit stark ab (vgl. Abb. 9 und Anhang 12). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre zum Beispiel eine Verfärbung der jeweiligen Substanz bei Zerfall. Dies gilt vor allem im Falle von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$, welches relativ stark gefärbt ist und somit auch über den gesamten Wellenlängenbereich stärker absorbiert als die anderen Substanzen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die Interaktion des Myoglobins mit den betroffenen Substanzen oder deren Spaltprodukten. Im Falle von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ könnte wegen der schlechten Löslichkeit in Wasser außerdem eine Veränderung des gelösten Anteils ursächlich für die Verschiebung sein.

Die CO-Freisetzung wurde jeweils für verschiedene Konzentrationen der Mangankomplexe überprüft. Da die eingesetzte Menge an Myoglobin konstant ist, ließe sich unter guten Bedingungen berechnen, wieviel Mol CO jedes Molekül der Substanz freisetzen kann, da ab einer bestimmten Menge an freigesetztem CO das gesamte DesoxyMb zu COMb umgesetzt wurde.

Ab diesem Punkt würde das Spektrum sich dann nicht mehr schneller bzw. mehr dem Spektrum des COMb angleichen, wenn höhere Konzentrationen der CO-freisetzenden Substanz eingesetzt werden. In den vorher von M. Wahl (2010) durchgeführten Versuchen wurde die maximale Menge an freigesetztem CO für die Stoffe K1-K3 bereits ermittelt (siehe Tab. 1).

Bei unseren Versuchen zeigte sich, dass bei sehr geringen Konzentrationen auch die Absorptionsmaxima des COMb nur schwach anstiegen. Offensichtlich reicht in diesen Konzentrationen die Menge an freigesetztem CO noch nicht aus, um den Anteil an COMb gegenüber dem Anteil an DesoxyMb stark genug zu erhöhen. Ab einer Konzentration von 30-40 μM (K1-K3) treten die Absorptionsmaxima des COMb hingegen deutlicher hervor. Ab einer Konzentration von etwa 60 μM ist keine deutliche Konzentrationsabhängigkeit mehr zu beobachten, so dass eine komplette Umsetzung des DesoxyMb zu COMb vermutet werden kann. Die Myoglobinkonzentration wurde zuvor auf 75 μM eingestellt. Deswegen lässt sich die insgesamt freigesetzte Menge an CO pro Molekül abschätzen. Werden also tatsächlich 60 μM einer Substanz benötigt um bei voller Freisetzung das gesamte Desoxymyoglobin umzuwandeln so würde jedes CORM-Molekül 1,25 Moleküle CO freisetzen. Durch auftragen des zeitlichen Verlaufs gegen die Veränderung der Absorption an den Wellenlängen der drei Absorptionsmaxima der unterschiedlichen Myoglobinverbindungen ließe sich die genaue Menge an benötigter Substanz ablesen (Metzler-Nolte & Schatzschneider, 2009). Aufgrund der möglichen Verfälschungen wurde auf diese Rechnungen allerdings verzichtet.

Zeitlich betrachtet verändert sich das Absorptionsspektrum bei allen eingesetzten Substanzen etwa 30 min lang in Richtung des COMb, solange keine zu hohen Konzentrationen gewählt werden (komplette Umsetzung des DesoxyMb). Später stellt sich kaum noch eine Veränderung ein. Dieser zeitliche Verlauf ist vergleichbar mit dem aus der Arbeit von Brückmann et al. (2011). Dort wurde eine Halbwertszeit aller Komplexe von etwa 20 min ermittelt.

Insgesamt erscheint der verwendete Myoglobinassay unter den in dieser Arbeit durchgeführten Bedingungen nur bedingt als geeignet, eine Aussage über die CO-Freisetzung zu machen, da einige Störfaktoren nicht beseitigt werden konnten. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf versucht, die CO-Freisetzung indirekt sichtbar zu machen. Dieses wäre zum einen über eine toxische Wirkung des CO auf die Zellen möglich, zum anderen über die Induktion des GC/cGMP-Signalwegs. Dieser indirekte Nachweis gelang in dieser Arbeit durch den cGMP-Assay, bei dem eine Induktion nachgewiesen werden konnte.

5.3. Toxizitätstests der Substanzen mit UV-induzierter CO-Freisetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Toxizität der synthetisierten CORMs zu untersuchen. Wie bereits erwähnt wurden als CO-freisetzende Gruppe N,N,N,-tridentate Mangankomplexe verwendet. Diese wurden unter anderem wegen ihrer geringen Toxizität in vorhergehenden Arbeiten (Schatzschneider, 2010) gewählt. Da schon kleine Veränderungen in der chemischen Struktur einer Substanz die Zytotoxizität beeinflussen können lässt sich aus der ähnlichen Struktur der Monomere nicht auf deren Toxizität schließen. Tatsächlich zeigte sich im MTT-Assay, dass Konzentrationen von K3 ab 10-50 μM signifikant auf die Zellviabilität auswirken. K1 ist dagegen ebenso wie K2 untoxisch.

Dabei ist die Toxizität des Komplex K3 höchstwahrscheinlich nicht auf das CO zurückzuführen, da sich ein toxischer Effekt auch ohne die Bestrahlung mit UV-Licht zeigt. Gegen eine Zytotoxizität durch CO spricht ebenfalls, dass sich beim Einsatz der anderen CO-freisetzenden Mangankomplexe und bei Einsatz der Positivkontrolle CORM-2 keine toxische Wirkung einstellt, obwohl mit einer ähnlichen CO Freisetzungsrates gerechnet werden kann. Die Toxizität von K3 ist wahrscheinlicher dadurch zu erklären, dass es ein Styrolderivat ist (Brückmann et al., 2011). Styrol und dessen Metabolite wirken in Säugetieren Hepato- und Pneumotoxisch. Zudem ist Styrol ein bekanntes Karzinogen (Huff & Infante, 2011). So wurde unter anderem beschrieben, dass Styrol bei exponierten Arbeitern zu DNA-Schäden in Leukozyten geführt hat (Costa et al., 2012).

Vergleicht man die Polymere P1, $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$, P2 und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ lassen sich einige interessante Beobachtungen machen. So sind sowohl P1 als auch $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ in allen getesteten Konzentrationen nicht zytotoxisch, obwohl das leicht toxische Styrolderivat K3 eines der Strukturelemente der Polymere ist. In diesem Fall scheint die Polymerisation der einzelnen Monomere die Toxizität dieser aufzuheben. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Moleküle durch die Polymerisation so groß werden, dass sie schlechter in die Zelle Eindringen oder mit Proteinen interagieren können. Außerdem erfolgt die Polymerisation an bestimmten funktionellen Gruppen, die damit nicht mehr für Interaktionen frei sind. Gegensätzlich verhält sich das Polymer $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$: Hier ist das zugrunde liegende Monomer K2 nicht toxisch, wohingegen die polymerisierte Form eine recht starke Zytotoxizität aufweist. Im Falle von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ kann dieser toxische Effekt nur für die Mangan- und CO-beladene Form nachgewiesen werden, das unbeladene Polymer P2 ist in den getesteten Konzentrationen untoxisch. $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ entwickelt also eine zytotoxische Wirkung, obwohl seine Grundbausteine diese nicht zeigen.

Eine ähnliche Beobachtung wurde an einem Cymantren-Konjugat des $\text{CpMn}(\text{CO})_3$ gemacht (Neundorf et al., 2008). In diesem Fall wurde das als Molekül nicht toxische $\text{CpMn}(\text{CO})_3$ mit einem Peptid verknüpft, welches leicht in die Zelle aufgenommen werden kann. Erst nach dieser Konjugation konnte eine zytotoxische Wirkung beobachtet werden. In der Arbeit von Neundorf wurden die Peptide jedoch gezielt als Träger eingesetzt um das $\text{CpMn}(\text{CO})_3$ in die Zelle zu befördern. Somit wird hier die Toxizität vor allem auf eine bessere Penetration durch die Zellmembran zurückgeführt.

In wie weit im Falle von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ das Polymerrückgrat eine bessere Aufnahme in die Zelle bewirken kann ist fraglich. Es gibt Hinweise darauf, dass bei anderen HPMA-basierten Polymeren, vor allem die Ladung der Seitenketten über die Kinetik der zellulären Aufnahme entscheidet. So beschreibt eine Arbeit von Liu et al. (2010), dass besonders HPMA-Polymere mit positiver Ladung der Seitenketten besonders gut in die Zelle aufgenommen werden können. Eine andere Arbeit von Callahan et al. (2009) bestätigt dies. Sie zeigt überdies, dass alle eingesetzten HPMA-basierten Polymere per Endozytose aufgenommen

werden, also auch die anionischen. Lediglich die Kinetik sei unterschiedlich. Tatsächlich ist die Seitenkette in beiden verwendeten Polymeren positiv geladen. Inwiefern die Polymere deswegen aber besser aufgenommen werden können als die zugehörigen Monomere wurde nicht untersucht. Für einen ähnlichen Mangantricarbonylkomplex, dem $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{PF}_6$ wurde die Aufnahme bereits untersucht. Die Ergebnisse deuten hier darauf hin, dass der Komplex hauptsächlich durch Diffusion in die Zelle gelangt (Niesel et al., 2008).

Die Toxizität von K3 und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ könnte den Einsatz der beiden Stoffe oder sehr ähnlicher Substanzen limitieren. Sie sind daher voraussichtlich weniger gut geeignet als CO-Träger in weiteren Zellkulturversuchen oder *in vivo* zu fungieren. Besonders im Bezug auf $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ wäre es interessant herauszufinden, warum das Polymer eine so starke toxische Wirkung entfaltet. Das Herausarbeiten einer von der Molekülstruktur abhängigen Toxizität, falls diese vorhanden ist, wäre dabei von besonderem Interesse. Die Kenntnisse hierüber könnten helfen in Zukunft bereits vor der Synthese einer Substanz und vor den Zytotoxizitätstests abzuschätzen, ob die herzustellende Substanz später eine toxische Wirkung entfalten wird. Insgesamt ist das Herausarbeiten eines solchen Zusammenhanges jedoch schon bei einfacher aufgebauten Molekülen sehr schwierig. Bei großen Polymeren ist eine weitere Schwierigkeit, dass variable Kettenlängen und eventuell vorhandene Restmonomere einen Einfluss auf die Toxizität haben können. Um hierfür einen Ansatzpunkt zu haben sind noch viele vergleichende toxikologische Untersuchungen mit ähnlichen Polymeren beziehungsweise deren Grundbausteinen nötig.

Die Ergebnisse der Toxizitätstests weisen an keiner Stelle darauf hin, dass das freigesetzte CO eine zytotoxische Wirkung besitzt. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Toxizität des CO im menschlichen Körper über die Verhinderung des Sauerstofftransportes am Hämoglobin entfaltet wird (Varon et al., 1999), während Sauerstoff unter unseren Versuchsbedingungen im Überschuss vorhanden ist. In Zellkultursystemen wird eine direkte toxische Wirkung von CO nur in sehr wenigen Arbeiten angenommen. Eine solche Wirkung wird zum Beispiel in einer Arbeit zu CORMs von Jackson angenommen (Jackson et al., 2011). Jedoch wird auch hier nicht eindeutig klar, inwieweit die toxische Wirkung nur vom CO und

nicht von anderen Zerfallsprodukten ausgeht. Viele andere Publikation befassen sich dagegen eher mit zytoprotektiven und positiven Wirkungen des CO (Johnson et al., 2003). Der Einsatz von CO als potentes Chemotherapeutikum ist somit nach den Ergebnissen dieser Arbeit eher unwahrscheinlich. Trotzdem wurde CO als potentiell Medikament für Hautkrebs beschrieben. Hierbei ist der entscheidende Mechanismus jedoch nicht die Zytotoxizität, sondern eine immunstimulierende Wirkung des freigesetzten CO (Allanson & Reeve, 2007).

5.4. Aktivierung des GC/cGMP Signalwegs

Die Tatsache, dass CO den GC/cGMP Signalweg aktiviert wurde bereits in mehreren Studien belegt (Johnson et al., 2003). Der GC/cGMP Signalweg ist auch in den verwendeten Zelllinien Hct116 und HepG2 bereits untersucht worden (Liu et al., 2001, Pacheco-Alvarez et al., 2005, Chin et al., 1997). In beiden Zelllinien konnte der Signalweg durch unterschiedliche Substanzen aktiviert werden. Es ist also wahrscheinlich, dass sich dieser Signalweg auch in Versuchen mit CORMs aktivieren lässt. In dieser Arbeit ist die Überprüfung des Signalweges auch sinnvoll, da in den Toxizitätstests keine toxische Wirkung des CO nachgewiesen werden konnte. Somit wurde durch diese Tests bisher noch gar keine Wirkung des CO auf die Zellen nachgewiesen. Neben dem zuvor durchgeführten Myoglobinassay liefert der cGMP-Assay somit einen weiteren Hinweis darauf, dass CO in einem Maße freigesetzt werden kann, in dem es Wirkung auf zelluläre Signalwege entfaltet.

Das freigesetzte CO erhöht in Hct116 Zellen die intrazelluläre cGMP-Konzentration. UV-Strahlung allein kann unter den von uns eingesetzten Bedingungen ebenso wenig wie die reine Inkubation mit den Substanzen eine Erhöhung des cGMP Gehaltes bewirken. Die Aktivierung fällt im Vergleich zum NO, welches durch SNP freigesetzt wird eher gering aus. Diese Tatsache belegt vorhergehende Ergebnisse bezüglich der Wirkung von CO auf diesen Signalweg. Während NO eine sehr starke Aktivierung zeigt, ist sie bei CO eher moderat ausgeprägt (Stone & Marletta, 1994, Johnson et al., 2003). Eine stärkere

Aktivierung des Signalwegs sowohl durch NO als auch durch CO hätte wahrscheinlich bei einem Zelltyp beobachtet werden können, der eine höhere Aktivität der Guanylatzyklase aufweist, wie zum Beispiel glatte Gefäßmuskelzellen.

Die Erhöhung des intrazellulären cGMP Gehalt kann bei den Substanzen K1-K3 sowie bei den Positivkontrollen CORM-2 und SNP nachgewiesen werden. Alle CO-freisetzenden Substanzen erhöhen den cGMP Gehalt in vergleichbarem Maße, was für eine ähnliche Menge an freigesetztem CO spricht. Bei allen Substanzen sind zwar pro Molekül drei Moleküle CO gebunden, jedoch wird das CO niemals komplett freigesetzt. Vor diesem Hintergrund ist diese Ähnlichkeit nicht selbstverständlich, zumal die errechneten Zahlen an freigesetztem CO pro Molekül im Myoglobin-Assay teils deutlich voneinander abweichen. Lediglich die Substanzen $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{-P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{-P2}$ führen zu keiner Erhöhung des cGMP Gehalts. Dies bestätigt die Beobachtung, die schon beim Myoglobin-Assay gemacht werden konnte. Durch die verhältnismäßig niedrige Menge an gebundenem CO pro Gewicht der Polymere, wird nur sehr wenig CO freigesetzt. Diese Menge reicht offenbar nicht aus, den zellulären Signalweg in signifikantem Maße zu aktivieren.

In HepG2 Zellen war der Nachweis von cGMP nicht möglich. Hier war selbst unter Verwendung von SNP kein höherer cGMP Gehalt nachweisbar, als in der Negativkontrolle des Assay Kits. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, dass HepG2 Zellen zu wenig Guanylatzyklase enthalten um durch die Gasotransmitter aktiviert zu werden. Verschiedene Arbeiten sprechen allerdings gegen diese Vermutung, da sie eine Aktivierung des GC/cGMP Signalweges in HepG2 Zellen beschreiben (Yuhas et al., 2014, Kim et al., 2014)

Um auszuschließen, dass die negativen Versuchsergebnisse auf ein erfolgloses Auflösen der Zellmembran zurückzuführen sind, wurde die Zellyse sowohl mit unterschiedlichen Lyse-Lösungen als auch mit Hilfe des Ultraschallstabes unterstützt. Trotzdem konnte in keinem Versuchsansatz ein cGMP-Anstieg beobachtet werden. Es könnte dennoch sein, dass für die in den Arbeiten

beobachteten Effekte bereits so kleine Mengen cGMP ausreichten, dass sie durch unser Assay-Kit nicht ausreichend detektiert werden konnten. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung ist eine erschwerte zelluläre Aufnahme des NO bzw. CO oder der jeweiligen freisetzenden Substanzen.

5.5. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die zur Herstellung der CORMs verwendeten N,N,N-tridentaten Mangankomplexe keine oder nur sehr geringe Zytotoxizität in Hct116 und HepG2 Zellen aufweisen. Deswegen sind vor allem K1 und K2 grundsätzlich als Trägermoleküle für CO geeignet. K3 ist zwar leicht toxisch, jedoch ist die toxische Wirkung nur sehr schwach ausgeprägt, so dass auch K3 weiter als potentes CORM verfolgt werden könnte. Alle drei Substanzen sind zudem gut in Wasser löslich und würden sich in der Zusammenschau potentiell für weitere Untersuchungen eignen.

Die Kopplung der Moleküle K2 und K3 an ein Polymerrückgrat führte zu einigen Schwierigkeiten beim Einsatz in Zellkultursystemen. So war die Löslichkeit beider Polymere zu schlecht um die CO-Freisetzung beziehungsweise die Wirkung des CO in befriedigender Weise sichtbar zu machen. Beim Polymer $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ entwickelte sich zudem eine relativ starke Toxizität. Insgesamt eignet sich eher $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ für weitere Untersuchungen über die Anwendbarkeit als CORM, welches dem *EPR-effect* unterliegt, wobei jedoch überlegt werden müsste, ob die Menge an gebundenem CO oder die Löslichkeit noch erhöht werden könnte. Im Falle von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ wären eher Untersuchungen über die Gründe für die Toxizität, wie zum Beispiel die Untersuchung der aktivierten Signalwege interessant. Für eine Anwendbarkeit als CORM in Zellkultursystemen oder *in vivo* ist $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ nach den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich weniger geeignet.

In der Arbeit wurde herausgefunden, dass auch die untoxischen Monomere bei Polymerisation eine Toxizität entwickeln können. Im Gegensatz dazu war es auch möglich ein unter den experimentellen Bedingungen untoxisches Polymer ($\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$) herzustellen, obwohl es leicht toxische Monomere enthielt (K3). Ein Rückschluss auf die Toxizität eines Polymeres durch die Beobachtung der

funktionell wirksamen Monomere ist also nicht ohne Weiteres möglich. Um eine eventuelle Abhängigkeit der Toxizität von der Molekülstruktur der Polymere aufzudecken oder zu widerlegen sind noch viele weitere Testergebnisse mit ähnlichen Molekülen notwendig. Deswegen ist es wichtig, dass hergestellte Polymere Toxizitätstests unterzogen werden, auch wenn aufgrund der untoxischen Monomere zunächst keine toxische Wirkung zu erwarten ist.

In dieser Arbeit gab es keinen Hinweis darauf, dass die Toxizität der eingesetzten Substanzen durch die Bestrahlung mit UV-Licht erhöht wird. Dieses wäre entweder durch die Bildung toxischer Spaltprodukte oder durch eine toxische Wirkung des freigesetzten COs möglich. Zwar erfolgte die Freisetzung des CO aus den Mangankomplexen langsam, so dass die CO Konzentration im Medium nicht maximal war, jedoch wurde insgesamt eine recht große Menge CO freigesetzt und wirkte über einen gewissen Zeitraum auf die Zellen. Vor diesem Hintergrund wirkt der Annahme, dass CO-freisetzende Substanzen alleine als potentes Chemotherapeutikum genutzt werden können zunächst unwahrscheinlich. Das gilt vor allem, da es sich bei den verwendeten Zelllinien um humane Krebszelllinien handelt. Dennoch wurde in anderen Arbeiten ein toxische Wirkung in hoher Konzentration und auf bestimmte Zelltypen beschrieben, so dass auch diese Fragestellung noch weiteren Stoff für Diskussionen bieten wird.

Die Wirkung von CO auf den cGMP Signalweg wurde in dieser Arbeit ein weiteres Mal bestätigt. Dabei fällt die Wirkung des CO auf diesen Signalweg deutlich geringer aus als die Wirkung von NO, welches in Form der Kontrollsubstanz SNP verwendet wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnissen anderer Untersuchungen. Insgesamt ist über die Wirkung von CO auf andere intrazelluläre Signalwege noch relativ wenig bekannt, so dass in Zukunft sicherlich noch viele Untersuchungen über dieses interessante Molekül folgen werden.

7. Literaturverzeichnis

- Allanson, M. & Reeve, V.E. (2007). Carbon monoxide signalling reduces photocarcinogenesis in the hairless mouse. *Cancer Immunol Immunother*, *56*, 1807-1815.
- Allmeroth, M., Moderegger, D., Biesalski, B., Koynov, K., Rösch, F., Thews, O. & Zentel, R. (2011). Modifying the Body Distribution of HPMA-Based Copolymers by Molecular Weight and Aggregate Formation. *Biomacromolecules*, *12*, 2841–2849.
- Anyanwu, A. C., Bentley, J. K., Popova, A. P., Malas, O., Alghanem, H., Goldsmith, A. M., Hershenson, M. B. & Pinsky, D. J. (2014). Suppression of inflammatory cell trafficking and alveolar simplification by the heme oxygenase-1 product carbon monoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *306*(8), L749-L763.
- Atkin, A. J., Lynam, J. M., Moulton, B. E., Sawle, P., Motterlini, R., Boyle, N. M., Pryce, M. T. & Fairlamb, I. J. (2011). Modification of the deoxy-myoglobin/carbonmonoxy-myoglobin UV-vis assay for reliable determination of CO-release rates from organometallic carbonyl complexes. *Dalton Transactions*, *40*(21), 5755-5761.
- Bates, J. N., Baker, M. T., Guerra Jr, R. & Harrison, D. G. (1991). Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical pharmacology*, *42*, S157-S165.
- Barenholz, Y. (2012). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, *160*, 117–134.
- Berends, H.-M. & Kurz, P. (2012). Investigation of light-triggered carbon monoxide release from two manganese photoCORMs by IR, UV–Vis and EPR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*, *380*, 141–147.
- Berridge, M. & Tan, S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.*, *303*(2), 474-482.
- Bisht, K., Tampe, J., Shing, C., Bakrania, B., Winearls, J., Fraser, J., Wagner, K-H. & Bulmer, A. C. (2014). Endogenous Tetrapyrroles Influence Leukocyte Responses to Lipopolysaccharide in Human Blood: Pre-Clinical Evidence Demonstrating the Anti-Inflammatory Potential of Biliverdin. *Journal of clinical & cellular immunology*, *5*(218).
- Brattain, M. G., Fine, W. D., Mahnaz Khaled, F., Thompson, J. & Brattain, D.E. (1981). Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma. *Cancer Research*, *41*, 1751-1756.
- Brückmann, N. E., Wahl, M., Reiß, G. J., Kohns, M., Wätjen, W. & Kunz, P. C. (2011). Polymer Conjugates of Photoinducible CO-Releasing Molecules. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *29*, 4571–4577.
- Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E. & Fornace Jr, A. J. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*, *411*, 102-107.
- Callahan, J., Kopečková, P. & Kopeček, J. (2009). Intracellular Trafficking and Subcellular Distribution of a Large Array of HPMA Copolymers. *Biomacromolecules*, *10*, 1704–1714.
- Chen, C. N., Watson, G., & Zhao, L. (2013). Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway in pulmonary arterial hypertension. *Vascular pharmacology*, *58*(3), 211-218.

- Chen, R. J., Yuan, H. H., Zhang, T. Y., Wang, Z. Z., Hu, A. K., Wu, L. L., Yang, Z. P., Mao, Y. J., Ji, D. J. & Zhu, X. R. (2014). Heme Oxygenase-2 Suppress TNF- α and IL6 Expression via TLR4/MyD88-Dependent Signaling Pathway in Mouse Cerebral Vascular Endothelial Cells. *Molecular neurobiology*, 1-8.
- Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S. & Esumi, H. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, 15, 437-442
- Cooper, C. E. & Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5), 533-539.
- Costa, C., Costa, S., Silva, S., Coelho, P., Botelho, M., Gaspar, J., Rueff, J., Laffon, B. & Teixeira, J.P. (2012). DNA damage and susceptibility assessment in industrial workers exposed to styrene. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 75, 735-746
- Cuenda, A. & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 1358–1375
- Dolan, M. C. (1985). Carbon monoxide poisoning. *Canadian Medical Association Journal*, 133(5), 392.
- Douglas, C. G., Haldane, J. & Haldane, J. B. S. (1912). The laws of combination of haemoglobin with carbon monoxide and oxygen. *The Journal of physiology*, 44(4), 275-304.
- Ferris, C. D., Jaffrey, S. R., Sawa, A., Takahashi, M., Brady, S. D., Barrow, R. K., Tysoe, S. A., Wolosker, H., Baranano, D. E., Doré, S., Poss, K.D. & Snyder, S. H. (1999). Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature cell biology*, 1(3), 152-157.
- Furchgott, R.F. & Vanhoutte, P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*, 3, 2007-2018
- Gunn, A., Derbyshire, E. R., Marletta, M.A. & Britt, R.D. (2012). Conformationally Distinct Five-Coordinate Heme–NO Complexes of Soluble Guanylate Cyclase Elucidated by Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance (EPR). *Biochemistry*, 51, 8384–8390.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1.
- Huff, J. & Infante, P. F. (2011). Styrene exposure and risk of cancer. *Mutagenesis*, 26(5), 583-584
- Hutchinson, P. J., Palmer R. M. & Moncada, S. (1987). Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur J Pharmacology*, 141, 445-51.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. & Wood, K.S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, 61, 866-879.
- Jackson, C. S., Schmitt, S., Dou, Q. P. & Kodanko, J. J. (2012). Synthesis, characterization, and reactivity of the stable iron carbonyl complex [Fe(CO)(N₄Py)](ClO₄)₂: photoactivated carbon monoxide release, growth inhibitory activity, and peptide ligation. *Inorganic Chemistry*, 50, 5336-5338.

- Jesse, H. E., Nye, T. L., McLean, S., Green, J., Mann, B. E. & Poole, R. K. (2013). Cytochrome bd-I in *Escherichia coli* is less sensitive than cytochromes bd-II or bo" to inhibition by the carbon monoxide-releasing molecule, CORM-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(9), 1693-1703.
- Johnson, T. R., Mann, B. E., Clark, J. E., Foresti, R., Green, C.J. & Motterlini, R. (2003). Metal carbonyls: a new class of pharmaceuticals?. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 3722-3729.
- Kang, L., Grande, J. P., Farrugia, G., Croatt, A. J., Katusic, Z. S. & Nath, K. A. (2013). Functioning of an arteriovenous fistula requires heme oxygenase-2. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 305(4), F545-F552.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. & Murad, F. (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *Journal of cyclic nucleotide research*, 3(1), 23-35.
- Kaupp, B. & Seifert, R. (2002). Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiol. Rev.*, 82, 769-824.
- Keyse, S. M. & Tyrrell, R. M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 99-103.
- Kim, S. K., Joe, Y., Zheng, M., Kim, H. J., Yu, J. K., Cho, G. J., Chang, K. C., Kim, H. K., Han, J., Ryter, S. W. & Chung, H. T. (2014). Resveratrol induces hepatic mitochondrial biogenesis through the sequential activation of nitric oxide and carbon monoxide production. *Antioxidants & redox signaling*, 20(16), 2589-2605.
- Klein, M., Neugebauer, U., Gheisari, A., Malassa, A., Jazzazi, T. M., Froehlich, F., Westerhausen, M., Schmitt, M. & Popp, J. (2014). IR Spectroscopic Methods for the Investigation of the CO Release from CORMs. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(29), 5381-5390.
- Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209, 497-499.
- Kunz, P.C., Huber, W., Rojas, A., Schatzschneider, U. & Spingler, B. (2009). Tricarbonylmanganese(I) and -rhenium(I) Complexes of Imidazol-Based Phosphane Ligands: Influence of the Substitution Pattern on the CO Release Properties. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 35, 5358-5366.
- Kunz, P. C., Meyer, H., Barthel, J., Sollazzo, S., Schmidt, A. M. & Janiak, C. (2013). Metal carbonyls supported on iron oxide nanoparticles to trigger the CO-gasotransmitter release by magnetic heating. *Chemical Communications*, 49(43), 4896-4898.
- Lee, T. S. & Chau, L. Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature medicine*, 8(3), 240-246.
- Li, Y., Gao, C., Shi, Y., Tang, Y., Liu, L., Xiong, T., Du, M., Xing, M., Liu, L. & Yao, P. (2013). Carbon monoxide alleviates ethanol-induced oxidative damage and inflammatory stress through activating p38 MAPK pathway. *Toxicology and applied Pharmacology*, 273(1), 53-58.
- Lin, H. & McGrath, J. J. (1988). Vasodilating effects of carbon monoxide. *Drug Chem. Toxicol.*, 11, 371-385.

- Liu, L., Li, H., Underwood, T., Lloyd, M., David, M., Sperl, G., Pamukcu, R. & Thompson, W. J. (2001). Cyclic GMP-dependent protein kinase activation and induction by exisulind and CP461 in colon tumor cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, 583-592.
- Liu, J., Bauer, H., Callahan, J., Kopečková, P., Pan, H. & Kopeček, J. (2010). Endocytic uptake of a large array of HPMA copolymers: Elucidation into the dependence on the physicochemical characteristics. *J. Control. Release.*, 143, 71-79.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release*, 65, 271-84.
- Maines, M. D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37(1), 517-554.
- Matsumura, Y. & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46, 6387-6392.
- Metzler-Nolte, N. & Schatzschneider, U. (2009). *Bioinorganic Chemistry: A Practical Course*, Berlin, de Gruyter.
- Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane[®] ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine*, 4, 99–105.
- Millar, S. J., Moss, B. W. & Stevenson, M. H. (1996). Some observations on the absorption spectra of various myoglobin derivatives found in meat. *Meat Science*, 42(3), 277-288.
- Morita, T., Mitsialis, S. A., Koike, H., Liu, Y. & Kourembanas, S. (1997). Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 272, 32804-32809.
- Morse, D., Pischke, S. E., Zhou, Z., Davis, R. J., Flavell, R. A., Loop, T., Otterbein, S. L., Otterbein, L. E., Choi, A. M. (2003). Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J. Biol. Chem.*, 278, 36993-36998
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Motterlini, R., Gonzales, A., Foresti, R., Clark, J. E., Green, C. J. & Winslow, R. M. (1998). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ. Res.*, 83, 568-577.
- Motterlini, R., Clark, J. E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Mann, B. E., Green, C. J. (2002). Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ. Res.*, 90, 17-24.
- Neundorff, I., Hoyer, J., Splith, K., Rennert, R., Peindy N'dongo, H. W. & Schatzschneider, U. (2008). Cymantrene conjugation modulates the intracellular distribution and induces high cytotoxicity of a cell-penetrating peptide. *Chem. Commun. (Camb.)*, 43, 5604-5606.
- Niesel, J., Pinto, A., Peindy N'Dongo, H. W., Merz, K., Ott, I., Gust, R. & Schatzschneider, U. (2008). Photoinduced CO release, cellular uptake and cytotoxicity of a tris(pyrazolyl)methane (tpm) manganese tricarbonyl complex. *Chem. Commun. (Camb.)*, 15, 1798-1800.

- Nobre, L. S., Seixas, J. D., Romão, C. C. & Saraiva, L. M. (2007). Antimicrobial action of carbon monoxide-releasing compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(12), 4303-4307.
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. & Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.*, 6, 422-428.
- Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., González-Noriega, A., Michalak, C., Zemleni, J. & León-Del-Río A. (2005). Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells. *Mol. Genet. Metab.* 85, 301-307.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszódi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fässler, R. & Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.*, 17, 3045-3051.
- Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell. Biol.*, 1, E73-E79.
- Pissuwan, D., Boyer, C., Gunasekaran, K., Davis, T. P. & Bulmus, V. (2010). In Vitro Cytotoxicity of RAFT Polymers. *Biomacromolecules*, 11, 412-420.
- Prockop, L. D. & Chichkova, R. I. (2007). Carbon monoxide intoxication: an updated review. *Journal of the neurological sciences*, 262(1), 122-130.
- Ríhová, B., Ulbrich, K., Kopeček, J. & Mancal, P. (1983). Immunogenicity of N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide copolymers-potential hapten or drug carriers. *Folia Microbiol. (Praha)*, 28, 217-227.
- Ryter, S.W., Alam, J. & Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.*, 86, 583-650.
- Sammut, I. A., Foresti, R., Clark, J. E., Exon, D. J., Vesely, M. J., Sarathchandra, P., Green, C. J. & Motterlini, R. (1998). Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br. J. Pharmacol.*, 125, 1437-1444.
- Sawle, P., Foresti, R., Mann, B. E., Johnson, T. R., Green, C. J. & Motterlini, R. (2005). Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, 145, 800-810.
- Schatzschneider, U. (2010). Photoactivated Biological Activity of Transition-Metal Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 10, 1451-1467
- Schenkman, K. A., Marble, D. R., Burns, D. H. & Feigl, E. O. (1997). Myoglobin oxygen dissociation by multiwavelength spectroscopy. *Journal of Applied Physiology*, 82(1), 86-92.
- Stone, J. R. & Marletta, M. A. (1994). Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 33, 5636-5640.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 748.
- Varon, J., Marik, P. E., Fromm Jr, R. E. & Gueler, A. (1999). Carbon monoxide poisoning: a review for clinicians. *The Journal of emergency medicine*, 17(1), 87-93.

- Wahl, M (2010). Polymere Trägersysteme für CO-freisetzende Moleküle. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Wang, G., Hamid, T., Keith, R. J., Zhou, G., Partridge, C. R., Xiang, X., Kingery, J. R., Lewis, R. K., Li, Q., Rokosh, D. G., Ford, R., Spinale, F. G., Riggs, D. W., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Bolli, R. & Prabhu, S. D. (2010). Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation*, 121, 1912-1925.
- Wang, R. U. I. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal*, 16(13), 1792-1798.
- Wani, M. A., Wani, G., Yao, J., Zhu, Q. & Wani, A. A. (2002). Human cells deficient in p53 regulated p21waf1/cip1 expression exhibit normal nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage. *Carcinogenesis*, 23(3), 403-410.
- Weinfeld, M., Liuzzi, M. & Paterson, M. C. (1989). Enzymatic analysis of isomeric triphosphates containing ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers. II. Phosphorylation by phage T4 polynucleotide kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(11), 6364-6370.
- Winburn, I. C., Gunatunga, K., McKernan, R. D., Walker, R. J., Sammut, I. A. & Harrison, J. C. (2012). Cell damage following carbon monoxide releasing molecule exposure: implications for therapeutic applications. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 111, 31-41
- Yao, P., Hao, L., Nussler, N., Lehmann, A., Song, F., Zhao, J., Neuhaus, P., Liu, L. & Nussler, A. (2009). The protective role of HO-1 and its generated products (CO, bilirubin, and Fe) in ethanol-induced human hepatocyte damage. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 296, G1318-1323.
- Yin, H., Fang, J., Liao, L., Nakamura, H. & Maeda, H. (2014). Styrene-maleic acid copolymer-encapsulated CORM2, a water-soluble carbon monoxide (CO) donor with a constant CO-releasing property, exhibits therapeutic potential for inflammatory bowel disease. *Journal of Controlled Release*, 187, 14-21.
- Yuhas, Y., Berent, E. & Ashkenazi, S. (2014). Effect of nitric oxide on microRNA-155 expression in human hepatic epithelial cells. *Inflammation Research*, 63(7), 591-596.

8. Anhang

Originaldatentabellen

1. Rohdaten zu Abbildung 6:

1a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, Bestrahlung mit Vilber Lourmat VL-6M UV Handlampe, 312 nm

Bestrahlung der Hct116 Zellen mit 2cm Abstand zur Platte (n=2)

Dauer (min)	0,000	2,000	4,000	6,000	8,000	10,000	12,000	14,000	16,000
Ansatz 1	0,600	0,270	0,260	0,240	0,230	0,220	0,230	0,210	0,200
Ansatz 2	0,480	0,190	0,170	0,160	0,160	0,160	0,140	0,130	0,120
Mittelwert	0,540	0,230	0,215	0,200	0,195	0,190	0,185	0,170	0,160
SD	0,085	0,057	0,064	0,057	0,049	0,042	0,064	0,057	0,057

Bestrahlung der Hct116 Zellen mit 10cm Abstand zur Platte (n=2)

Dauer (min)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Ansatz 1	0,622	0,472	0,339	0,332	0,344	0,327	0,337	0,321	0,331
Ansatz 2	0,575	0,396	0,286	0,267	0,287	0,276	0,27	0,264	0,284
Mittelwert	0,599	0,434	0,313	0,300	0,316	0,302	0,304	0,293	0,308
SD	0,033	0,054	0,037	0,046	0,040	0,036	0,047	0,040	0,033

1b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, Bestrahlung mit Vilber Lourmat VL-6M UV Handlampe, 312 nm

Bestrahlung der HepG2 Zellen mit 2cm Abstand zur Platte (n=3)

Dauer (min)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Ansatz 1	0,710	0,430	0,400	0,360	0,370	0,320	0,320	0,320	0,320
Ansatz 2	0,720	0,450	0,400	0,360	0,350	0,320	0,320	0,310	0,320
Ansatz 3	0,520	0,280	0,270	0,250	0,230	0,220	0,220	0,230	0,220
Mittelwert	0,650	0,387	0,357	0,323	0,317	0,287	0,287	0,287	0,287
SD	0,113	0,093	0,075	0,064	0,076	0,058	0,058	0,049	0,058

Bestrahlung der HepG2 Zellen mit 10cm Abstand zur Platte (n=2)

Dauer (min)	0,000	2,000	4,000	6,000	8,000	10,000	12,000	14,000	16,000
Ansatz 1	0,821	0,652	0,548	0,509	0,488	0,515	0,494	0,508	0,513
Ansatz 2	0,824	0,632	0,555	0,516	0,529	0,523	0,487	0,485	0,486
Mittelwert	0,823	0,642	0,552	0,513	0,509	0,519	0,491	0,497	0,500
SD	0,002	0,014	0,005	0,005	0,029	0,006	0,005	0,016	0,019

2. Rohdaten zu Abbildung 7:

2a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, Bestrahlung mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 365 nm

Bestrahlung mit 2cm Abstand zur Platte (n=3)

Dauer (min)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Ansatz 1	0,731	0,717	0,715	0,721	0,722	0,699	0,724	0,733	0,741
Ansatz 2	0,714	0,720	0,707	0,714	0,741	0,699	0,684	0,709	0,756
Ansatz 3	0,738	0,670	0,699	0,684	0,718	0,670	0,692	0,720	0,744
Mittelwert	0,728	0,702	0,707	0,706	0,727	0,689	0,700	0,721	0,747
SD	0,012	0,028	0,008	0,020	0,012	0,017	0,021	0,012	0,008

2b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, Bestrahlung mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 365 nm

Bestrahlung mit 2cm Abstand zur Platte (n=3)

Dauer (min)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Ansatz 1	0,731	0,620	0,584	0,593	0,599	0,620	0,639	0,621	0,741
Ansatz 2	0,735	0,679	0,652	0,671	0,678	0,677	0,705	0,755	0,717
Ansatz 3	0,720	0,665	0,714	0,671	0,716	0,714	0,755	0,717	0,823
Mittelwert	0,729	0,655	0,650	0,645	0,664	0,670	0,700	0,698	0,760
SD	0,008	0,031	0,065	0,045	0,060	0,047	0,058	0,069	0,056

3. Rohdaten zu Abbildung 13:

3a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, inkubiert mit K1 (n=3)

Unbestrahlt

Konzentration (μ M) Kontrolle	5	10	25	50	
Ansatz 1	0,871	0,907	0,845	0,839	0,846
Ansatz 2	0,830	0,830	0,841	0,842	0,794
Ansatz 3	0,826	0,845	0,827	0,811	0,754
Mittelwert	0,842	0,860	0,838	0,831	0,798
SD	0,025	0,041	0,009	0,017	0,046

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μ M) Kontrolle	5	10	25	50	
Ansatz 1	0,871	0,935	0,857	0,822	0,841
Ansatz 2	0,830	0,833	0,887	0,782	0,742
Ansatz 3	0,826	0,832	0,767	0,786	0,771
Mittelwert	0,842	0,867	0,837	0,797	0,785
SD	0,025	0,059	0,063	0,022	0,051

3b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, inkubiert mit K1 (n=3)

Unbestrahlt

Konzentration (μM) Kontrolle	10	25	50	100	
Ansatz 1	1,108	1,043	1,100	0,939	0,953
Ansatz 2	1,100	0,935	0,975	0,935	0,899
Ansatz 3	0,980	0,887	0,918	0,884	0,874
Mittelwert	1,063	0,955	0,998	0,919	0,909
SD	0,072	0,080	0,093	0,031	0,041

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM) Kontrolle	10	25	50	100	
Ansatz 1	1,108	1,083	1,092	1,025	0,851
Ansatz 2	1,100	0,927	0,941	0,840	0,784
Ansatz 3	0,980	0,835	0,834	0,753	0,624
Mittelwert	1,063	0,948	0,956	0,873	0,753
SD	0,072	0,125	0,129	0,139	0,117

4. Rohdaten zu Abbildung 14:**4a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, inkubiert mit K2 (n=3)**

Unbestrahlt

Konzentration (μM) Kontrolle	10	25	50	100	
Ansatz 1	0,876	0,875	0,876	0,887	0,836
Ansatz 2	0,822	0,879	0,861	0,842	0,859
Ansatz 3	0,829	0,806	0,821	0,724	0,736
Mittelwert	0,842	0,853	0,853	0,817	0,811
SD	0,029	0,041	0,028	0,084	0,066

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM) Kontrolle	10	25	50	100	
Ansatz 1	0,876	0,831	0,869	0,778	0,826
Ansatz 2	0,822	0,806	0,765	0,794	0,776
Ansatz 3	0,829	0,801	0,811	0,765	0,729
Mittelwert	0,842	0,813	0,815	0,779	0,777
SD	0,029	0,016	0,052	0,015	0,049

4b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, inkubiert mit K2 (n=3)

Unbestrahlt

Konzentration (μM) Kontrolle	10	25	50	100	
Ansatz 1	1,108	1,054	0,983	1,106	1,054
Ansatz 2	1,046	0,978	1,036	0,923	0,799
Ansatz 3	0,980	0,935	0,896	0,923	0,876
Mittelwert	1,045	0,989	0,972	0,984	0,910
SD	0,064	0,060	0,071	0,106	0,131

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM) Kontrolle	10	25	50	100	
Ansatz 1	1,108	1,107	1,098	1,060	1,003
Ansatz 2	1,046	0,936	0,950	0,980	0,811
Ansatz 3	0,980	0,796	0,844	0,814	0,756
Mittelwert	1,045	0,946	0,964	0,951	0,857
SD	0,064	0,156	0,127	0,125	0,130

5. Rohdaten zu Abbildung 15:**5a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, inkubiert mit K3 (n=3)**

Unbestrahlt

Konzentration (μM) Kontrolle	5	10	25	50	
Ansatz 1	0,847	0,759	0,711	0,658	0,528
Ansatz 2	0,845	0,834	0,777	0,676	0,554
Ansatz 3	0,833	0,804	0,725	0,658	0,547
Mittelwert	0,841	0,799	0,738	0,664	0,543
SD	0,008	0,038	0,035	0,011	0,013

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM) Kontrolle	5	10	25	50	
Ansatz 1	0,847	0,679	0,531	0,493	0,438
Ansatz 2	0,845	0,679	0,543	0,493	0,438
Ansatz 3	0,833	0,738	0,668	0,631	0,525
Mittelwert	0,841	0,699	0,581	0,539	0,467
SD	0,008	0,034	0,076	0,080	0,050

5b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, inkubiert mit K3 (n=3)

Unbestrahlt

Konzentration (μM) Kontrolle	5	10	25	50	
Ansatz 1	0,922	0,901	0,834	0,808	0,769
Ansatz 2	0,906	0,687	0,627	0,562	0,454
Ansatz 3	1,002	0,893	0,807	0,768	0,598
Mittelwert	0,943	0,827	0,756	0,713	0,607
SD	0,051	0,121	0,112	0,132	0,158

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM) Kontrolle	5	10	25	50	
Ansatz 1	0,922	0,787	0,753	0,671	0,649
Ansatz 2	0,906	0,833	0,781	0,712	0,663
Ansatz 3	1,002	0,730	0,693	0,620	0,529
Mittelwert	0,943	0,783	0,742	0,668	0,614
SD	0,051	0,052	0,045	0,046	0,073

6. Rohdaten zu Abbildung 16:**6a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, inkubiert mit Mn@P1 (n=3)**

Unbestrahlt

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) Kontrolle	37,5	75	112,5	225	
Ansatz 1	0,844	0,986	0,917	0,915	0,704
Ansatz 2	0,805	0,874	0,863	0,849	0,811
Ansatz 3	0,725	0,766	0,764	0,736	0,772
Mittelwert	0,791	0,875	0,848	0,833	0,762
SD	0,061	0,110	0,077	0,091	0,054

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM) Kontrolle	37,5	75	112,5	225	
Ansatz 1	0,844	0,851	0,881	0,820	0,644
Ansatz 2	0,805	0,888	0,866	0,837	0,815
Ansatz 3	0,725	0,749	0,704	0,639	0,672
Mittelwert	0,791	0,829	0,817	0,766	0,710
SD	0,061	0,072	0,098	0,110	0,091

6b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, inkubiert mit Mn@P1 (n=3)

Unbestrahlt

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	1,100	0,991	0,955	0,953	1,035
Ansatz 2	0,929	0,884	0,852	0,746	0,785
Ansatz 3	1,049	0,862	0,854	0,832	0,786
Mittelwert	1,026	0,912	0,887	0,844	0,869
SD	0,088	0,069	0,059	0,104	0,144

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	1,100	1,075	0,938	0,943	0,999
Ansatz 2	0,929	0,817	0,727	0,655	0,698
Ansatz 3	1,049	0,832	0,767	0,744	0,710
Mittelwert	1,026	0,908	0,811	0,781	0,802
SD	0,088	0,145	0,112	0,148	0,170

7. Rohdaten zu Abbildung 17:**7a) MTT-Assay mit Hct116 Zellen, inkubiert mit Mn@P2 (n=3)**

Unbestrahlt

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	0,853	0,609	0,190	0,094	0,096
Ansatz 2	0,857	0,450	0,133	0,104	0,107
Ansatz 3	0,715	0,380	0,131	0,097	0,094
Mittelwert	0,808	0,479	0,151	0,098	0,099
SD	0,081	0,118	0,033	0,005	0,007

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	0,853	0,778	0,508	0,095	0,106
Ansatz 2	0,857	0,547	0,132	0,128	0,107
Ansatz 3	0,715	0,544	0,140	0,100	0,095
Mittelwert	0,808	0,623	0,260	0,108	0,103
SD	0,081	0,134	0,215	0,018	0,006

7b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, inkubiert mit Mn@P2 (n=3)

Unbestrahlt

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	1,100	1,066	0,108	0,113	0,107
Ansatz 2	0,929	0,830	0,106	0,109	0,095
Ansatz 3	1,049	0,852	0,187	0,089	0,082
Mittelwert	1,026	0,916	0,134	0,104	0,095
SD	0,088	0,130	0,046	0,013	0,013

Bestrahlt mit Konrad-Benda N6.L UV Handlampe, 356 nm für 40min

Konzentration (μM)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	1,100	1,044	0,221	0,108	0,095
Ansatz 2	0,929	0,710	0,163	0,157	0,087
Ansatz 3	1,049	0,843	0,580	0,119	0,078
Mittelwert	1,026	0,865	0,321	0,128	0,087
SD	0,088	0,168	0,226	0,025	0,009

8. Rohdaten zu Abbildung 18:**8a) MTT-Assay mit Hct116-Zellen, inkubiert mit P1 bzw. P2 (n=3)**

Hct116 Zellen inkubiert mit P1

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	0,859	0,924	0,822	0,941	0,901
Ansatz 2	0,868	0,952	0,852	0,971	0,894
Ansatz 3	0,897	0,998	0,882	0,938	0,924
Mittelwert	0,875	0,958	0,852	0,950	0,906
SD	0,020	0,038	0,030	0,018	0,015

Hct116 Zellen inkubiert mit P2

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	0,811	0,863	0,762	0,917	0,878
Ansatz 2	0,868	0,891	0,828	0,898	0,870
Ansatz 3	0,873	0,976	0,910	0,949	0,851
Mittelwert	0,851	0,910	0,833	0,921	0,866
SD	0,035	0,059	0,074	0,026	0,014

8b) MTT-Assay mit HepG2 Zellen, inkubiert mit P1 bzw. P2 (n=3)

HepG2 Zellen inkubiert mit P1

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	1,019	1,000	0,947	1,025	0,988
Ansatz 2	0,923	1,053	1,016	0,968	0,921
Ansatz 3	0,954	0,998	0,816	0,969	0,943
Mittelwert	0,965	1,017	0,926	0,987	0,951
SD	0,049	0,031	0,102	0,032	0,034

HepG2-Zellen inkubiert mit P2

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrolle	37,5	75	112,5	225
Ansatz 1	1,019	0,955	1,069	0,931	0,921
Ansatz 2	0,923	1,130	1,077	0,970	0,960
Ansatz 3	0,954	0,903	0,929	1,090	1,069
Mittelwert	0,965	0,996	1,025	0,997	0,983
SD	0,049	0,119	0,083	0,083	0,077

9. Rohdaten zu Abbildung 19:

9a) Messung der Lumineszens durch Wallac Victor 1420

Eichreihe 1

3 pmol / ml cGMP	122490	126050	119860
1,5 pmol / ml cGMP	127680	138430	130570
0,75 pmol / ml cGMP	144070	160890	147460
0,375 pmol / ml cGMP	162740	180780	175860
0,1875 pmol / ml cGMP	187500	203560	194590
0,0938 pmol / ml cGMP	207720	223310	204500
0,0469 pmol / ml cGMP	229770	231880	217930
0 pmol / ml cGMP	252780	267580	263950
Nicht-spezifischer Bindungswert	26190	26900	25830

Lumineszens der Proben

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	cGMP-Gehalt (pmol/ml) (errechnet)
	(alle Werte als relative Lichteinheiten)			
Kontrolle	211060	220300	209820	0,0921
SNP 100µM	132360	138120	142720	1,2280
CORM-2 100µM	174090	192820	165220	0,3232
K1 100µM bestrahlt	179210	171450	183110	0,3164
K2 100µM bestrahlt	174850	177450	180190	0,3214
K3 100µM bestrahlt	185590	190220	187030	0,2362
K1 100µM dunkel	219320	227160	200510	0,0838
K2 100µM dunkel	223580	213420	215910	0,0757
K3 100µM dunkel	201270	218250	208100	0,1121
Mn@P1 100µM bestrahlt	201440	230310	205580	0,0982
Mn@P2 100µM bestrahlt	215980	219340	205850	0,0917
Mn@P1 100µM dunkel*	317350	324870	298560	0,0813
Mn@P2 100µM dunkel*	323680	322420	308940	0,0362

* = relative Lichteinheiten bezogen auf Eichreihe 2, da Werte zusammen mit 10. Und 11. ermittelt.

9b) Proteingehaltbestimmung nach Lowry für Ansätze der cGMP-Bestimmung

Ansatz 1

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle	0,1130	0,1150	0,1120	0,1133	0,0015	3,3780
SNP 100µM	0,1040	0,1070	0,1060	0,1057	0,0015	3,7650
CORM-2 100µM	0,1060	0,1070	0,1070	0,1067	0,0006	3,2130
K1 100µM bestrahlt	0,1040	0,1070	0,1060	0,1057	0,0015	3,1300
K2 100µM bestrahlt	0,1060	0,1050	0,1080	0,1063	0,0015	3,1850
K3 100µM bestrahlt	0,1030	0,1060	0,1020	0,1037	0,0021	2,9640
K1 100µM dunkel	0,1070	0,1040	0,1080	0,1063	0,0021	3,1850
K2 100µM dunkel	0,1130	0,1130	0,1130	0,1130	0,0000	3,7380
K3 100µM dunkel	0,1050	0,1070	0,1040	0,1053	0,0015	3,1020
Mn@P1 100µM bestrahlt	0,1050	0,1150	0,1100	0,1100	0,0050	3,4890
Mn@P2 100µM bestrahlt	0,1040	0,1090	0,1090	0,1073	0,0029	3,2680
Mn@P1 100µM dunkel	0,1150	0,1150	0,1200	0,1167	0,0029	4,0410
Mn@P2 100µM dunkel	0,1180	0,1210	0,1190	0,1193	0,0015	4,2620

Ansatz 2

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle	0,1020	0,1080	0,1070	0,1057	0,0032	3,1300
SNP 100µM	0,1130	0,1180	0,1160	0,1157	0,0025	3,9590
CORM-2 100µM	0,0960	0,1010	0,1010	0,0993	0,0029	2,6050
K1 100µM bestrahlt	0,1240		0,1350	0,1295	0,0078	5,1050
K2 100µM bestrahlt		0,1250	0,1270	0,1260	0,0014	4,8150
K3 100µM bestrahlt	0,1030	0,1110	0,1050	0,1063	0,0042	3,1850
K1 100µM dunkel	0,1280	0,1350	0,1380	0,1337	0,0051	5,4500
K2 100µM dunkel	0,1270	0,1290	0,1280	0,1280	0,0010	4,9810
K3 100µM dunkel	0,1060	0,1120	0,1070	0,1083	0,0032	3,3510
Mn@P1 100µM bestrahlt	0,1060	0,1120	0,1060	0,1080	0,0035	3,3230
Mn@P2 100µM bestrahlt	0,1020		0,1020	0,1020	0,0000	2,8260
Mn@P1 100µM dunkel	0,1150	0,1170	0,1160	0,1160	0,0010	3,9450
Mn@P2 100µM dunkel	0,1160	0,1190	0,1190	0,1180	0,0017	4,1100

Ansatz 3

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle	0,1100	0,1080	0,1090	0,1090	0,0010	3,4060
SNP 100µM	0,1120	0,1130	0,1140	0,1130	0,0010	3,7380
CORM-2 100µM	0,1090	0,1050	0,1070	0,1070	0,0020	3,2400
K1 100µM bestrahlt	0,1020	0,1040	0,1010	0,1023	0,0015	2,8540
K2 100µM bestrahlt	0,1060	0,1090	0,1090	0,1080	0,0017	3,3230
K3 100µM bestrahlt	0,1100	0,1120	0,1170	0,1130	0,0036	3,7380
K1 100µM dunkel	0,1100	0,1140	0,1130	0,1123	0,0021	3,6820
K2 100µM dunkel	0,1020	0,1110	0,1080	0,1070	0,0046	3,2400
K3 100µM dunkel	0,1160	0,1170	0,1110	0,1147	0,0032	3,8760
Mn@P1 100µM bestrahlt	0,1090	0,1190	0,1140	0,1140	0,0050	3,8200
Mn@P2 100µM bestrahlt	0,1210	0,1150	0,1160	0,1173	0,0032	4,0970
Mn@P1 100µM dunkel	0,1050	0,1130	0,1130	0,1103	0,0046	3,4750
Mn@P2 100µM dunkel	0,1200	0,1170	0,1180	0,1183	0,0015	4,1560

9c) Berechnung des cGMP-Gehalts im Verhältnis zur Proteinmenge

	Mittelwert Protein (mg/ml)	SD	Mittelwert cGMP (pmol/ml)	SD	CGMP /Protein (pmol/mg)	SD
Kontrolle	3,3047	0,1519	0,0921	0,0161	0,0279	0,0049
SNP 100µM	3,8207	0,1206	1,2280	0,1971	0,3214	0,0516
CORM-2 100µM	3,0193	0,3591	0,3232	0,0413	0,1070	0,0137
K1 100µM bestrahlt	3,6963	1,2277	0,3164	0,0404	0,0856	0,0109
K2 100µM bestrahlt	3,7743	0,9039	0,3214	0,0411	0,0851	0,0109
K3 100µM bestrahlt	3,2957	0,3987	0,2362	0,0296	0,0717	0,0090
K1 100µM dunkel	4,1057	1,1905	0,0838	0,0164	0,0204	0,0040
K2 100µM dunkel	3,9863	0,8967	0,0757	0,0168	0,0190	0,0042
K3 100µM dunkel	3,4430	0,3951	0,1121	0,0164	0,0326	0,0048
Mn@P1 100µM bestrahlt	3,5440	0,2530	0,0982	0,0161	0,0277	0,0045
Mn@P2 100µM bestrahlt	3,3970	0,6452	0,0917	0,0162	0,0270	0,0048
Mn@P1 100µM dunkel	3,8203	0,3029	0,0813	0,0342	0,0213	0,0090
Mn@P2 100µM dunkel	4,1760	0,0779	0,0362	0,0362	0,0087	0,0087

10. Rohdaten zu Abbildung 20:

10a) Messung der Lumineszens durch Wallac Victor 1420

Eichreihe 2

3 pmol / ml cGMP	200640
1,5 pmol / ml cGMP	231620
0,75 pmol / ml cGMP	248450
0,375 pmol / ml cGMP	273140
0,1875 pmol / ml cGMP	298940
0,0938 pmol / ml cGMP	319210
0,0469 pmol / ml cGMP	330440
0 pmol / ml cGMP	376130
Nicht-spezifischer Bindungswert	26340

Lumineszens der Proben

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	cGMP-Gehalt (pmol/ml) (errechnet)
	(alle Werte als relative Lichteinheiten)			
Kontrolle bestrahlt	308330	342380	307390	0,0838
Kontrolle unbestrahlt	254420	257570	186950	0,0326
SNP 25 μ M	316650	325940	259990	0,2663
SNP 50 μ M	292530	309410	233810	0,8240
SNP 100 μ M	284320	288940	224230	0,8705

10b) Proteingehaltbestimmung nach Lowry für Ansätze der cGMP-Bestimmung

Ansatz 1

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	0,1140	0,1200	0,1250	0,1197	0,0055	4,2901
Kontrolle unbestrahlt	0,1190	0,1260	0,1210	0,1220	0,0036	4,4834
SNP 25 μ M	0,1180	-	0,1190	0,1185	0,0007	4,1934
SNP 50 μ M	0,1060	0,1150	0,1180	0,1130	0,0062	3,7376
SNP 100 μ M	0,1090	0,1070	0,1120	0,1093	0,0025	3,4337

Ansatz 2

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	0,1130	0,1190	0,1130	0,1150	0,0035	3,8619
Kontrolle unbestrahlt	0,1120	0,1200	0,1180	0,1167	0,0042	4,0000
SNP 25 μ M	0,1100	0,1220	0,1120	0,1147	0,0064	3,8343
SNP 50 μ M	0,1050	0,1070	0,1120	0,1080	0,0036	3,2818
SNP 100 μ M	0,1060	0,1030	0,1060	0,1050	0,0017	3,0331

Ansatz 3

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	0,1150	0,1100	0,1120	0,1123	0,0025	3,6409
Kontrolle unbestrahlt	0,1130	0,1200	0,1220	0,1183	0,0047	4,1381
SNP 25 µM	0,1180	0,1170	0,1200	0,1183	0,0015	4,1381
SNP 50 µM	0,1270	0,1280	0,1260	0,1270	0,0010	4,8564
SNP 100 µM	0,1100	0,1140	0,1070	0,1103	0,0035	3,4751

10c) Berechnung des cGMP-Gehalts im Verhältnis zur Proteinmenge

	Mittelwert Protein (mg/ml)	SD	Mittelwert cGMP (pmol/ml)	SD	CGMP /Protein (pmol/mg)	SD
Kontrolle bestrahlt	3,9310	0,3300	0,0838	0,0590	0,0213	0,0150
Kontrolle unbestrahlt	4,2070	0,2488	0,0326	0,0326	0,0078	0,0078
SNP 25 µM	4,0550	0,1934	0,2663	0,0608	0,0657	0,0150
SNP 50 µM	3,8793	0,6801	0,8240	0,1742	0,2124	0,0449
SNP 100 µM	3,3128	0,1994	0,8705	0,1841	0,2628	0,0556

11. Rohdaten zu Abbildung 21:**11a) Messung der Lumineszenz durch Wallac Victor 1420****Eichreihe 2**

3 pmol / ml cGMP	200640
1,5 pmol / ml cGMP	231620
0,75 pmol / ml cGMP	248450
0,375 pmol / ml cGMP	273140
0,1875 pmol / ml cGMP	298940
0,0938 pmol / ml cGMP	319210
0,0469 pmol / ml cGMP	330440
0 pmol / ml cGMP	376130
Nicht-spezifischer Bindungswert	26340

Lumineszenz der Proben

	Ansatz 1 (alle Werte als relative Lichteinheiten)	Ansatz 2	Ansatz 3	cGMP-Gehalt (pmol/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	308330	342380	307390	0,0838
Kontrolle unbestrahlt	254420	257570	186950	0,0326
K1 25 µM bestrahlt	312920	303520	271770	0,1233
K1 25 µM unbestrahlt	311790	286400	254320	0,0719
K1 50 µM bestrahlt	262230	265660	243190	0,2683
K1 50 µM unbestrahlt	318940	318010	288170	0,0445
K1 100 µM bestrahlt	301250	315260	304530	0,3814
K1 100 µM unbestrahlt	264960	281010	283310	0,0706
K3 25 µM bestrahlt	247230	262820	190130	0,1453
K3 25 µM unbestrahlt	327880	329850	275710	0,0151
K3 50 µM bestrahlt	323980	331800	294880	0,2343
K3 50 µM unbestrahlt	316940	346250	271690	0,0318
K3 100 µM bestrahlt	337780	363540	281740	0,4434
K3 100 µM unbestrahlt	328020	338620	316390	0,0569

11b) Proteingehaltbestimmung nach Lowry für Ansätze der cGMP-Bestimmung**Ansatz 1**

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	0,1140	0,1200	0,1250	0,1197	0,0055	4,2901
Kontrolle unbestrahlt	0,1190	0,1260	0,1210	0,1220	0,0036	4,4834
K1 25 µM bestrahlt	0,1150	0,1220	0,1230	0,1200	0,0044	4,3177
K1 25 µM unbestrahlt	0,1160	0,1200	0,1220	0,1193	0,0031	4,2624
K1 50 µM bestrahlt	-	0,1200	0,1200	0,1200	0,0000	4,3177
K1 50 µM unbestrahlt	0,1110	0,1110	0,1080	0,1100	0,0017	3,4890
K1 100 µM bestrahlt	0,1130	-	0,1190	0,1160	0,0042	3,9862
K1 100 µM unbestrahlt	0,1150	0,1160	0,1160	0,1157	0,0006	3,9586
K3 25 µM bestrahlt	0,1160	0,1240	0,1260	0,1220	0,0053	4,4834
K3 25 µM unbestrahlt	0,1120	0,1110	0,1160	0,1130	0,0026	3,7376
K3 50 µM bestrahlt	0,1110	0,1150	0,1170	0,1143	0,0031	3,8481
K3 50 µM unbestrahlt	0,1060	0,1090	0,1070	0,1073	0,0015	3,2680
K3 100 µM bestrahlt	0,1090	0,1150	0,1130	0,1123	0,0031	3,6823
K3 100 µM unbestrahlt	0,1060	0,1120	0,1070	0,1083	0,0032	3,3508

Ansatz 2

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	0,1130	0,1190	0,1130	0,1150	0,0035	3,8619
Kontrolle unbestrahlt	0,1120	0,1200	0,1180	0,1167	0,0042	4,0000
K1 25 µM bestrahlt	0,1150	0,1130	0,1090	0,1123	0,0031	3,7510
K1 25 µM unbestrahlt	0,1040	0,1070	0,1090	0,1067	0,0025	3,1713
K1 50 µM bestrahlt	0,1170	0,1170	0,1100	0,1147	0,0040	3,8343
K1 50 µM unbestrahlt	0,1110	0,1200	0,1170	0,1160	0,0046	3,9448
K1 100 µM bestrahlt	0,1130	0,1200	0,1200	0,1177	0,0040	4,0829
K1 100 µM unbestrahlt	0,1160	0,1150	0,1170	0,1160	0,0010	3,9448
K3 25 µM bestrahlt	0,1080	0,1170	0,1160	0,1137	0,0049	3,7514
K3 25 µM unbestrahlt	0,1080	0,1150	0,1110	0,1113	0,0035	3,5580
K3 50 µM bestrahlt	0,1100	0,1100	0,1130	0,1110	0,0017	3,5304
K3 50 µM unbestrahlt	0,1080	0,1120	0,1090	0,1097	0,0021	3,4199
K3 100 µM bestrahlt	0,1110	0,1120	0,1130	0,1120	0,0010	3,6133
K3 100 µM unbestrahlt	0,1130	0,1190	0,1170	0,1163	0,0031	3,9724

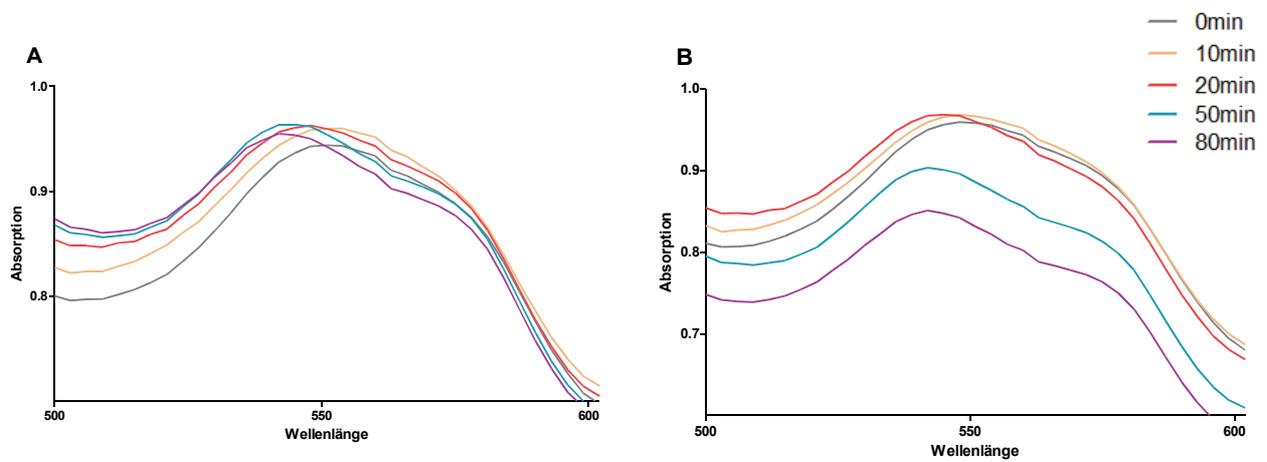
Ansatz 3

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	SD	Protein (mg/ml) (errechnet)
Kontrolle bestrahlt	0,1150	0,1100	0,1120	0,1123	0,0025	3,6409
Kontrolle unbestrahlt	0,1130	0,1200	0,1220	0,1183	0,0047	4,1381
K1 25 µM bestrahlt	0,1060	0,1090	0,1120	0,1090	0,0030	3,3646
K1 25 µM unbestrahlt	0,1000	0,1080	0,1050	0,1043	0,0040	2,9779
K1 50 µM bestrahlt	0,1080	0,1100	0,1080	0,1087	0,0012	3,3370
K1 50 µM unbestrahlt	0,1030	0,1050	0,1070	0,1050	0,0020	3,0331
K1 100 µM bestrahlt	0,1110	0,1140	0,1120	0,1123	0,0015	3,6409
K1 100 µM unbestrahlt	0,1080	0,1060	0,1080	0,1073	0,0012	3,2265
K3 25 µM bestrahlt	0,1200	0,1260	0,1210	0,1223	0,0032	4,4696
K3 25 µM unbestrahlt	0,1140	0,1180	0,1210	0,1177	0,0035	4,0829
K3 50 µM bestrahlt	0,1170	0,1220	0,1210	0,1200	0,0026	4,2762
K3 50 µM unbestrahlt	0,0990	0,1050	0,1010	0,1017	0,0031	2,7569
K3 100 µM bestrahlt	0,1090	0,1190	0,1140	0,1140	0,0050	3,7790
K3 100 µM unbestrahlt	0,1030	0,1120	0,1140	0,1097	0,0059	3,4199

11c) Berechnung des cGMP-Gehalts im Verhältnis zur Proteinmenge

	Mittelwert Protein (mg/ml)	SD	Mittelwert cGMP (pmol/ml)	SD	CGMP /Protein (pmol/mg)	SD
Kontrolle bestrahlt	3,9310	0,3300	0,0838	0,0590	0,0213	0,0150
Kontrolle unbestrahlt	4,2070	0,2488	0,0326	0,0326	0,0078	0,0078
K1 25 µM bestrahlt	3,8113	0,4794	0,1233	0,0386	0,0324	0,0101
K1 25 µM unbestrahlt	3,4703	0,6924	0,0719	0,0343	0,0207	0,0099
K1 50 µM bestrahlt	3,8297	0,4905	0,2683	0,0612	0,0701	0,0160
K1 50 µM unbestrahlt	3,8793	0,8648	0,0445	0,0445	0,0115	0,0115
K1 100 µM bestrahlt	3,9033	0,2323	0,3814	0,0859	0,0977	0,0220
K1 100 µM unbestrahlt	3,7103	0,4186	0,0706	0,0343	0,0190	0,0092
K3 25 µM bestrahlt	4,3970	0,4716	0,1453	0,0395	0,0330	0,0090
K3 25 µM unbestrahlt	3,9828	0,4376	0,0151	0,0151	0,0038	0,0038
K3 50 µM bestrahlt	4,1138	0,5508	0,2343	0,0539	0,0570	0,0131
K3 50 µM unbestrahlt	3,1483	0,3473	0,0318	0,0318	0,0101	0,0101
K3 100 µM bestrahlt	3,9480	0,5178	0,4434	0,0989	0,1123	0,0251
K3 100 µM unbestrahlt	3,5810	0,3404	0,0569	0,0349	0,0159	0,0097

12. Myoglobinassay von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$



Myoglobinassay von $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ und $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ nach Bestrahlung (365 nm).

$\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$ bzw. $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$ (225 μg / ml) wurde in Myoglobinlösung unvollständig gelöst und über die angegebene Dauer bestrahlt.

A: 225 μg / ml $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P1}$

B: 225 μg / ml $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{@P2}$

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wim Wätjen, für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation. Ich danke besonders für die stetige Bereitschaft zur Diskussion der Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen sowie den angenehmen menschlichen Umgang.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Peter Kunz für die Bereitstellung der untersuchten Substanzen und die Hinweise zum Umgang mit diesen.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie sowie dem Institutsleiter Prof. Dr. Gerhard Fritz.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Daniela Ackermann für die Einarbeitung in die Zellkultur, sowie Hilfestellung bei dem Erlernen der Testmethoden und Auswertungen.

Ein besonderer Dank geht ebenfalls an Frau Dr. Susannah Havermann für die Einweisung in den Umgang einiger Geräte und die Möglichkeit zur Durchführung einiger Experimente am Wochenende.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. Yvonne Chovolou für den kritischen Diskurs im Laborseminar danken, sowie den Assistentinnen Ingrid Köhler, Hermine Kannengießer und Kerstin De Mezzo, die besonders zu Fragen im Umgang mit den Zellen mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenso danke ich der Sekretärin Frau Martina Bennat für die Hilfe bei allerlei alltäglichen Arbeiten.

Meiner Familie möchte ich für den Erfahrungsaustausch und die Unterstützung während der Arbeit danken. Insbesondere danke ich meiner Freundin Lisa Beutelspacher sowohl für die Unterstützung und die Geduld, als auch für die Hilfestellung zum richtigen Zitieren.

Ein letzter Dank geht an die Mitglieder des Uerdinger Ruderclubs in Krefeld, welche während meiner Laborarbeit für einen sportlichen Ausgleich sorgten.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 14.11.2014

Marbod Kohns