

Teil V

Materialien / Methoden

Kapitel 16

Materialien

Die Chemikalien und Reagenzien wurden - soweit nicht anders erwähnt - von den Firmen Sigma, Fluka, Merck und Aldrich bezogen. Die Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen Braun, Nunc, Merck und Sarstedt.

16.1 Geräte

- Analysenwaage: BP 211D (Sartorius)
- Atomabsorptionsspektrometer: Vario 6 (Analytikjena AG)
- Autoklav: 2540 ELV Dampf-Sterilisator (Tutthauer)
- CO₂-Begasungsbrutschrank: B 5060 EK-CO₂ (Heraeus); SNW 300TVBB (Nalge Nunc International)
- Elementaranalysator: 240 B und C (Perkin-Elmer)
- HPLC: Kontron System 522 mit Diodenarraydetektor (Kontron Instruments)
- Infrarotspektrometer: ATI Mattson Genesis Serie FTIR Spektrometer
- Inversmikroskop: Axiovert 135, Axiovert 25 (Carl Zeiss Jena)
- Kernresonanzspektroskopie: Avance/DPX 400 (Bruker)
- Massenspektrometrie: CH-/A-Varian MAT (70eV)
- Mikroplattenreader: Flashscan S12 (Analytikjena AG)
- pH-Meter: model 410A (Orion Research Inc.)

- Schmelzpunktapparatur Büchi 510
- Sicherheitsbunsenbrenner: Fireboy plus (Integra, Biosciences)
- Steril-Werkbank Lamin Air HB2448 (Heraeus)
- UV-Spektroskopie: Uvikon 930 (Kontron Instruments)
- Zählkammer: Neubauer 0.100 mm, 0.0025 mm² (Carl Zeiss Jena)
- Zentrifuge: Megafuge 1.0 R (Heraeus)

16.2 Lösungen und Reagenzien

soweit nicht bei den einzelnen Versuchsvorschriften beschrieben:

- Bradford-Reagenz: 250 mg Serva Blue G, 250 ml Ethanol (95%), 500 ml H₃PO₄ (86%), 250 ml H₂O. Vor Gebrauch mit Wasser 1:5 verdünnen.
- DNS: 'DNA from salmon testes' (Sigma)
- FCS: fetales Kälberserum (Bio Whittaker, PAN Biotech oder Biochrom)
- Glutardialdehydlösung 1%: 25%ige wässrige Lösung (Merck) mit PBS verdünnt.
- Humanserumalbumin (HSA): Sigma
- Kristallviolettlösung 0.02%: Lösung in Aqua dest.
- PBS (phosphate buffered saline): 8.0g NaCl, 1.0g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0.15g NaH₂PO₄xH₂O, 0.2g KCl, 0.2g KH₂PO₄ mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Trypsinlösung : 0.05% Trypsin (ICN), 0.02% EDTA in PBS.

Kapitel 17

Methoden

17.1 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung von Proteinen wurde nach der Methode von Bradford vorgenommen [141]. Dabei handelt es sich um eine rasch durchzuführende, sensitive Methode zur Quantifizierung von Mikrogramm-Mengen Protein. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht auch darin, dass nur wenige der gebräuchlichen Laborreagentien Interferenzen verursachen. Lediglich etwa Triton X-100 und Natriumdodecylsulfat (SDS) geben falsch positive Ergebnisse. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass der Farbstoff 'Coomassie Brilliant Blue G-250' in zwei verschiedenen Farben (rot und blau) existiert. Bei Bindung eines Proteins an diesen Farbstoff wird ein blau gefärbter Komplex mit sehr hohem Extinktionskoeffizienten gebildet. Dieser kann bei 595nm photometrisch erfasst werden. Die Bindung des Proteins an den Farbstoff erfolgt innerhalb von 2 Minuten, der Komplex bleibt etwa eine Stunde stabil in der Lösung erhalten.

Durchführung

Vorerst wird vorgefertigtes Bradford-Reagenz (siehe Abschnitt 16) fünffach mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wird jeweils ein Aliquot mit einer Probe, Standard bzw. Kontrolle vermischt (die genauen Volumina sind in den jeweiligen Arbeitsvorschriften angegeben). Zur Kalibrierung werden Humanserumalbuminlösungen in destilliertem Wasser verwendet. Nach etwa 20 Minuten wird die Extinktion bei 595nm gemessen. Alle Proben, Standards und Kontrollen werden als Doppeltbestimmung vermessen. Zur Berechnung werden vorerst die Mittelwerte der Doppeltbestimmungen gebildet. Aus diesen und den zugehörigen Konzentrationen der Standardlösungen kann durch lineare Regression die Geradengleichung der Kalibriergerade er-

mittelt werden. Der Korrelationskoeffizient sollte immer größer 0.99 sein. Abbildung 17.1 zeigt beispielhaft die Kalibriergerade von wässrigen HSA-Standardlösungen.

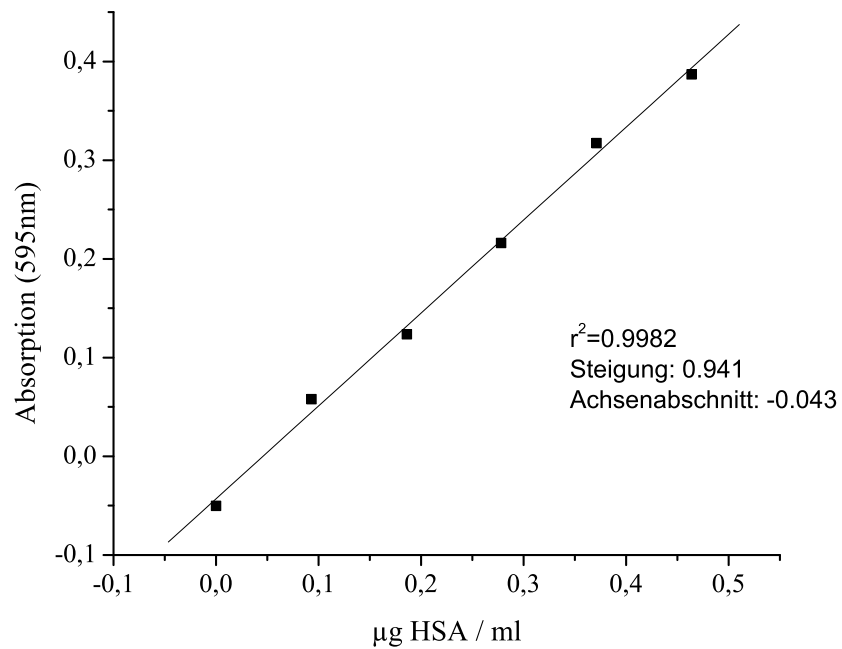


Abbildung 17.1: Kalibriergerade und lineare Regression von wässrigen HSA-Lösungen

17.2 Synthesen

17.2.1 Alkinliganden

2-Acetoxy-propargylbenzoat (Prop-ASS)

2.00g 2-Acetoxybenzoesäure (11.1 mmol) werden in 30ml absolutem Dichlormethan gelöst und 2.52g (12.2 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid, 244mg (2 mmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie 711 μ l (685mg, 12.2 mmol) Propargylalkohol zugegeben. Der Ansatz wird solange gerührt bis keine weitere Umsetzung auf der DC mehr nachgewiesen werden kann (über Nacht). Daraufhin wird der gebildete Dicyclohexylharnstoff mittels Fritte abgetrennt und mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Produkt mittels Säulenchromatographie (mobile Phase: Dichlormethan) an Kieselgel gereinigt.

$C_{12}H_{10}O_4$ (218.2g/mol) [42]

Ausbeute: 725mg (3.32 mmol, 30%) farblose Kristalle (Schmp.: 71-72°C)

MS (EI): m/z (%) = 218(1) [M⁺], 177 (11), 176 (99) [M-OAc], 120 (100);
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.38 (s 3H CH₃), 2.52 (t J=2.5Hz 1H CH), 4.86 (d J=2.5Hz 2H CH₂), 7.11 (dd J=0.9Hz und 8.0Hz 1H ArH), 7.33 (ddd J=0.9Hz, 7.7Hz und 8.0Hz 1H ArH), 7.59 (ddd J=1.6Hz und 7.7Hz 1H ArH), 8.06 (dd J=1.6Hz und 7.7Hz ArH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 21.0 (CH₃), 52.7 (CH₂), 75.2 (CH), 77.5(C-C), 123.1, 126.8, 127.3, 129.5, 131.0, 150.7 (Ar-C), 164.9 (C=O), 169.2 (C=O)
CHN (ber./gef.): C (66.05/66.01); H (4.61/4.51)

2-Hydroxy-propargylbenzoat

20.0g (125mmol) Natriumsalicylat werden in 50ml Aceton gelöst und 16ml Propargylbromidlösung (80% in Toluol) zugegeben und unter Rückfluß erhitzt. Nach 24 Stunden wird das ausgefallene NaBr abfiltriert, mit Aceton gewaschen, und die vereinigten Filtrate zur Trockne eingeeengt. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie (mobile Phase: Dichlormethan) isoliert.

$C_{10}H_8O_3$ (176.2g/mol) [142]

Ausbeute: 1.78g (10.1 mmol, 8%) farblose Kristalle

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.55 (t J=2.5Hz 1H CH), 4.95 (d J=2.5Hz 2H CH₂), 6.90 (ddd J=0.9 und 8.0Hz 1H ArH), 6.99 (dd J=0.9 und 8.0Hz 1H ArH), 7.48 (ddd J=1.7 und 8.0Hz 1H ArH), 7.89 (dd J=1.7Hz und 8.0Hz ArH), 10.52 (s 1H OH)

2-Acetoxy-N-propargylbenzamid

Eine Lösung von 3.72ml (3.20g, 58mmol) Propargylamin werden in 35-40ml absolutem Dichlormethan im Eisbad gerührt. 5.75g (29.0mmol) Acetylsalicylsäurechlorid werden in 10-15ml absolutem Dichlormethan gelöst und langsam zugetropft. Nach einer halben Stunde wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden zur Trockne eingeeengt und der verbleibende feste Rückstand mit Cyclohexan aufgekocht. Die heisse Lösung wird abdekantiert. Der Vorgang wird mehrere Male wiederholt, die vereinigten Lösungen etwas eingeeengt und im Kühlschrank zur Auskristallisation stehen gelassen. Die Kristalle werden abfiltriert und im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet.

$C_{12}H_{11}NO_3$ (217.2g/mol) [75]

Ausbeute (Rohprodukt): 1.306g (6.0mmol, 21%)

M.S.(EI): m/z (%) = 217(1) [M^+], 175(100) [$M-OAc$], 43 (40); 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 2.29 (t $J=2.6Hz$ 1H CH), 2.35 (s 3H CH_3), 4.23 (dd $J=2.6Hz$ und $5.1Hz$ 2H CH_2), 6.51 (s 1H NH), 7.13 (dd, 1H $J=0.8Hz$ und $8.1Hz$ ArH), 7.33 (ddd $J=0.8Hz$ und $7.7Hz$ 1H ArH), 7.49 (ddd $J=1.6Hz$, $7.7Hz$ und $8.1Hz$ ArH)1H , 7.82 (dd $J=1.6Hz$ und $7.7Hz$ 1H ArH)

N-Propargylphthalimid

2.0 g (10.8mmol) Kaliumphthalimid werden in 30ml Aceton gelöst, 1.29ml Propargylbromidlösung (80% in Toluol) zugesetzt und 56 Stunden unter Rückfluß (ca. $40^\circ C$) erhitzt. Das entstandene KBr wurde abfiltriert und mit Aceton nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden zur Trockne eingeeengt und mit Dichlormethan umkristallisiert.

$C_{11}H_7NO_2$ (185.2 g/mol)[76]

Ausbeute: 1.60g (8.64mmol, 80%)

IR (KBr): cm^{-1} = 1770 (C=O), 1720 (C=O); M.S. (EI): m/z (%)= 185(100) [M^+], 157(23) [$M-CO$]; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ = 2.23 (t $J=2.5Hz$ 1H CH), 4.46 (d $J=2.5Hz$ 2H CH_2), 7.75 (m 2H ArH), 7.89 (m 2H ArH)

1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolylessigsäurepropargylester

0.5g (1.40 mmol) Indomethacin werden in ca. 25ml frisch über Natriumsulfat getrocknetem Aceton gelöst. $195\mu l$ (1.4mmol) Triethylamin und $156\mu l$ Propargylbromidlösung (80% in Toluol, 1.50 mmol) werden zugesetzt und der

Ansatz 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration werden die vereinigten Filtrate zur Trockne eingengt und durch Säulenchromatographie (mobile Phase: Dichlormethan) gereinigt.

$C_{22}H_{18}ClNO_4$ (395.8 g/mol)[77]

Ausbeute: 104mg (0.26mmol, 19%)

M.S. (EI):m/z (%) 395 (36) $[M^+]$, 139 (100); 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 2.39 (s 3H CH_3), 2.47 (t J=2.5Hz 1H CH), 3.72 (s 2H CH_2), 3.84 (s 3H OCH_3), 4.71 (d J=2.5Hz 2H OCH_2), 6.68 (dd 1H J=2.5Hz und 9.0Hz ArH), 6.87 (d 1H J=9.0Hz ArH), 6.96 (d 1H J=2.5Hz ArH), 7.47 (dd 2H J=1.9Hz und 8.4Hz ArH), 7.66 (dd 2H J=1.9Hz und 8.4Hz ArH);

17.2.2 Cobalt-Alkin-Komplexe

Allgemeine Methode

1 mmol des entsprechenden Alkins wird in 10ml abs. Diethylether gelöst und 1.5mmol Dicobaltoctacarbonyl zugegeben. Der dunkel gefärbte Ansatz wird solange bei Raumtemperatur gerührt, bis kein Kohlenmonoxid mehr entweicht bzw. bis durch DC kein Edukt mehr nachzuweisen ist (5-60 Minuten). Nach Zugabe von 1g Kieselgel wird das Lösungsmittel abdestilliert und das tiefgefärbte Produkt durch Säulenchromatographie gewonnen. Das verwendete Laufmittel ist bei den jeweiligen Verbindungen angegeben. Häufig ist es zur vollständigen Umsetzung des Edukts notwendig dem Ansatz noch zusätzliches Dicobaltoctacarbonyl zuzusetzen, da dieses schon nach kurzer Lagerung anfängt sich zu zersetzen und somit seine Aktivität verliert. Die Reinheit aller Komplexe wurde mit Elementaranalyse und HPLC überprüft. Die Abweichung betrug bei der Elementaranalyse maximal 0.4% vom berechneten Wert. Die mit der HPLC bestimmte Reinheit war in allen Fällen mindestens 98% (Auswertung bei 240nm, Bedingungen siehe Abschnitt 17.4).

Hexacarbonyl(prop-2-inol)dicobalt (Co-Prop)

$C_9H_4Co_2O_7$ (342.0g/mol) [42]

75 μ l Propargylalkohol (80% in Toluol, 0.72mmol), 790mg (2.31mmol) Dicobaltoctacarbonyl, ca. 1 Stunde

SC: Ether/Petrolether 1/1

Ausbeute: 212mg (0.62 mmol, 86%) rote Kristalle, Schmp.: 45°C

IR (KBr): cm^{-1} = 3271 (OH), 2097 (CO), 2065 (CO), 2047 (CO), 2021 (CO), 2008 (CO) ; M.S.(EI): m/z (%) = 342(1) $[M^+]$, 314(35)[M-CO], 286(28)

[M-2CO], 258(31) [M-3CO], 230(35) [M-4CO], 202(70)[M-5CO], 174(72) [M-6CO], 28(100) [CO] ; $^1\text{H-NMR}:\delta= 1.84$ (s 1H OH), 4.80 (s 2H CH₂), 6.06 (s 1H CH)

CHN (ber./gef.): C (31.61/31.41); H (1.28/1.28)

Hexacarbonyl(diphenylacetylen)dicobalt (Co-Diph)

C₂₀H₁₀Co₂O₆ (464.2g/mol) [42]

263mg (1.46mmol) Diphenylacetylen, 842mg (2.22mmol) Dicobaltoctacarbonyl

SC: Ether/Petrolether 1/6

Ausbeute: 590mg (1.27 mmol, 87%) dunkelrote Kristalle, Schmp.: 103°C

IR (KBr): cm⁻¹ = 3444, 2088 (CO), 2048 (CO), 2025 (CO), 2017 (CO), 1994 (CO); M.S.(EI): m/z (%) = 464(1) [M⁺], 436(5) [M-CO], 408(3) [M-2CO], 380(4) [M-3CO], 352(10) [M-4CO], 324(22) [M-5CO], 296(12) [M-6CO], 28(100) [CO]; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃): $\delta= 7.26-7.58$ br (ArH 10H)

CHN (ber./gef.): C (51.75/51.93); H (2.17/2.23)

(2-Acetoxy-propargylbenzoat)hexacarbonyldicobalt (Co-ASS)

C₁₈H₁₀Co₂O₁₀(504.1g/mol) [41, 42]

149mg (0.68mmol) 2-Acetoxy-propargylbenzoat, 417mg (1.22mmol) Dicobaltoctacarbonyl, ca. 2 Stunden

SC: Ether/Petrolether 1/2

Ausbeute: 174mg (0.35 mmol, 51%) rote Kristalle, Schmp.: 60°C

IR (KBr): cm⁻¹ = 2096 (CO), 2061 (CO), 2042 (CO), 2007 (CO), 1759 (C=O), 1725 (CO); M.S.(EI): m/z (%) = 448(1) [M-2CO], 420(1) [M-3CO], 392(1) [M-4CO], 364(1) [M-5CO], 336(1) [M-6CO], 28(100) [CO]; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃): $\delta= 2.34$ (s 3H CH₃), 5.47 (s 2H CH₂), 6.11 (s 1H CH), 6.89-7.47 (2H 2x ArH), 7.59 (s 1H ArH), 8.09 (s 1H ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃): $\delta= 21.00$ (CH₃), 65.50 (CH₂), 72.20 (CH), 88.31 (C-C), 122.39, 123.97, 126.01, 131.54, 134.25 und 151.33 (ArC), 163.64 und 169.72 (COOR), 199.09 (Co-CO)

CHN: (ber/gef): C(42.88/42.67); H(2.00/1.90)

Hexacarbonyl(2-hydroxy-propargylbenzoat)dicobalt (Co-SAL)

C₁₆H₈Co₂O₉ (462.1g/mol) [42]

548mg (3.1mmol) 2-Hydroxy-propargylbenzoat (3.1mmol), 1.8g (5.26mmol) Dicobaltoctacarbonyl, 1-2 Stunden

SC: Ether/Petrolether 1/1

Ausbeute: 660mg (1,4mmol, 46%) rote Kristalle

IR (KBr):cm⁻¹ = 2097 (CO), 2063 (CO), 2025 (CO), 2007 (CO); M.S.(EI):

m/z (%) = 434(11) [M-CO], 406(38) [M-2CO], 378(17) [M-3CO], 350(6) [M-4CO], 322(22) [M-5CO], 294(100) [M-6CO]; ¹H-NMR(CDCl₃): δ= 5.56 (s 2H CH₂), 6.16 (s 1H CH), 6.95-7.92 (4H ArH), 10.68 (s 1H OH)
CHN (ber./gef.): C (41.59/41.24); H (1.74/1.88)

(2-Acetoxy-N-propargylbenzamid)hexacarbonyldicobalt (Co-ASSAM)

C₁₈H₁₁Co₂NO₉ (503.2 g/mol)
100mg (0.46mmol) 2-Acetoxy-N-propargylbenzamid, 260mg (0.76 mmol) Dicobaltoctacarbonyl, ca. 1 Stunde
SC: Ether / Petrolether 1/1
Ausbeute: 14mg (0.03mmol, 7 %), rote Kristalle, Schmp.: 94°C
IR (KBr):cm⁻¹ = 3433, 2025 (CO), 2054 (CO) , 2094 (CO), 1627 (C=O), 1606 (C=O), 1573; M.S.(EI): m/z(%) = 447(12) [M-2CO], 419(97) [M-3CO], 391(57) [M-4CO], 363 (18) [M-5CO], 335 (100) [M-6CO]; ¹H-NMR(CDCl₃):δ= 2.35 (s 3H CH₃), 4.78 (s 2H CH₂), 6.10 (s 1H CH), 6.60 (s 1H NH), 7.14 (s 1H ArH), 7.2-7.3 (s 1H ArH), 7.48 (s 1H ArH) 7.75 (s 1H ArH)
CHN: (ber/gef): C (42.97/42.82); H (2.20/2.47); N (2.78/2.60)

Hexacarbonyl(propargylphthalimid)dicobalt (Co-Phthal)

C₁₇H₇Co₂NO₈ (471.1g/mol)
0.5g (2.7mmol) Propargylphthalimid, 1.03g (3.8mmol) Dicobaltoctacarbonyl, ca. 1.5 Std.
SC: Ether/Petrolether 1/1
Ausbeute: 1.097g (2.3mmol, 85%) rotbraune Kristalle, Schmp.: 105°C
IR (KBr): cm⁻¹ = 2095 (CO), 2054 (CO), 2036 (CO), 2016 (CO); M.S.(EI): m/z (%) = 443(12) [M-CO], 415(48) [M-2 CO], 387(50) [M-3 CO], 359(29) [M-4 CO], 331(67) [M-5CO], 303(90) [M-6CO], 28(100) [CO]; ¹H-NMR (CDCl₃):δ= 5.04 (2H, CH₂); 6.08 (1H CH); 7.74 (2H, ArH); 7.88 (2H, ArH); ¹³C-NMR (CDCl₃):δ= 40.1 (CH₂); 72.1 (CH);ca. 89 (schlecht aufgelöst, C-C) 123.5; 131.8; 134.3 (ArC); 167.8 (Amid-C); 199 (CO)
CHN: (ber/gef): C (43.34/43.54); H (1.50/1.74); N (2.97/3.02)

Hexacarbonyl[(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolyl-essigsäurepropargylester]dicobalt(Co-Indo)

C₂₈H₁₈ClCo₂NO₁₀ (681.8 g/mol)
104mg (4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolylessigsäurepropargylester (0.26mmol), 152mg (0.44mmol) Dicobaltoctacarbonyl, ca. 3 Std.
SC: Ether / Petrolether 1/1
Ausbeute: 62mg (0.09 mmol, 35%) rotes zähflüssiges Öl

IR (KBr): cm^{-1} = 3432, 2349, 2096 (CO), 2057 (CO), 2024 (CO); M.S.(EI): m/z (%) = 682 (<1%) [M^+], 645 (<1%) [$M-\text{Cl}$], 598 (<1%) [$M-3\text{CO}$], 570 (<1%) [$M-4\text{CO}$], 541 (<1%) [$M-p\text{-Chlorbenzoyl}$], 513 (1%), 468 (1%), 440 (7%) [468-CO], 412 (8%) [468-2CO], 356 (7%) [Indomethacin], 28 (100) [CO]; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.38 (s 1H CH_3); 3.48 (s 2H CH_2); 3.83 (s 3H OCH_3); 5.33 (s 2H OCH_2); 5.92 (s 1H CH); 6.67-7.66 (m 7H ArH)
CHN (ber./gef.): C (49.33/49.23) H (2.66/3.04) N(2.05/1.72)

17.3 AAS-Methode

- Gerät: Vario 6 Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer
- Analytik Jena AG
- Detektion: 240.7nm
- Spaltbreite: 0.2nm
- Untergrundkorrektur: Deuteriumlampe
- Injektion: 15 μ l

Schritt	Temp.(°C)	Rate (°C/Sek.)	Zeit (Sek.)	Argon (l/Min.)	Funktion
1	80	10	20	2	Injektion
2	100	10	30	2	Trocknen
3	120	15	10	2	
4	150	50	30	2	
5	500	400	35	2	
6	700	200	10	2	
7	1100	200	20	2	Pyrolyse
8	1100	0	5	0	Nullabgleich
9	2100	1500	6	0	Atomisierung
10	2400	400	4	2	Ausheizen

Tabelle 17.1: Ofenprogramm für Cobalt-Alkin-Komplexe [139]

17.4 Lipophilie ($\log k_w$ -Wert)

Die Substanzen wurden als 200 μ M Lösungen in Methanol bereitgestellt und isokratisch mit verschiedenen Methanol / Wasser - Gemischen (Methanol 60, 70, 80,90 % V/V) von einer C18-HPLC-Säule eluiert. Es wurden nur Peaks innerhalb von 90 Minuten Laufzeit berücksichtigt. Die mittlere Retentionszeit von 2 Läufen wurde als k-Wert ermittelt ($t_0=2.17$ Minuten). Die logarithmischen k-Werte wurden gegen den Methanolgehalt der mobilen Phase in einem Diagramm aufgetragen (Korrelationskoeffizient > 0.99). Der $\log k_w$ -Wert wurde durch lineare Extrapolation auf 100% Wassergehalt erhalten. Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche findet sich in Abschnitt A.3.

HPLC-Bedingungen:

- Gerät: Kontron System 522 mit Diodenarraydetektor
- stationäre Phase: Nucleosil C18 (25cm, 4mm ID, 5 μ M)
- mobile Phase : Methanol / Wasser
- Injektion: 40 μ l
- Flussrate: 1.0ml/min

17.5 Stabilitätsuntersuchungen

Stabilität in Zellkulturmedium (UV-Vis-Methode)

Die Komplexe wurden als 80mM Stammlösungen in DMF gelöst. 40 μ l der Stammlösungen wurden zu jeweils 8.0ml EMEM (+10% FCS) pipettiert und durch weiteres Verdünnen mit Medium Lösungen im Bereich zwischen 50 und 400 μ M Substanz hergestellt. Jeweils 250 μ l wurden in die Löcher einer UV-96-Lochplatte (Fa. Nunc) überführt und die Platte im Mikroplattenreader vermessen. Die Inkubation wurde bei 37°C/5% CO₂ im Brutschrank fortgesetzt und die Platte stündlich über acht Stunden vermessen. Zur Auswertung wurden jeweils die Absorptionen des Maximums im Bereich von 350nm herangezogen. Die Kalibrierung ($r^2 > 0.997$) erfolgte aus den Daten der ersten Messung (direkt nach der Substanzzugabe) als Dreifachbestimmung. Die Substanzlösungen wurden sechsfach bestimmt und daraus der stabil in Lösung bleibende Anteil in Prozent (bezogen auf die entsprechenden Daten aus der ersten Platte) berechnet.

Stabilität in Phosphatpuffer pH 7.0 (HPLC-Methode)

10 μ l einer 20mM Lösung von Co-ASS in DMF wurden zu 1.0ml Phosphatpuffer pH 7.0 (Fa. Merck, Zusatz von 0.1% Triton) pipettiert, bei 37°C im Wasserbad inkubiert und nach definierten Zeitpunkten durch HPLC analysiert. Die Kalibrierung ($r^2=0.9984$) erfolgte mit methanolischen Lösungen von Co-ASS, die bei -20°C gelagert wurden. Die Stabilität wurde durch Bestimmung der Peakfläche von Co-ASS bei 350nm ermittelt und in Prozent angegeben.

HPLC-Bedingungen:
Flussrate 0.6ml/min
mobile Phase: 80% MeOH
übrige Bedingungen siehe Abschnitt 17.4

Stabilität in Zellkulturmedium (AAS-Methode)

Je 250 μ l 1.0 μ M Co-ASS in EMEM (+FCS) wurden in die Löcher einer 96-Lochplatte verteilt und im Brutschrank bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden 200 μ l mit einer Pipette von der Oberfläche abgezogen, durch Zusatz von je 20 μ l Triton-1% und HNO₃-13% stabilisiert und mittels Graphitrohr-AAS auf den Cobaltgehalt untersucht (siehe Abschnitt 17.3). Die Wiederfindung wurde in Prozent berechnet, wobei die Konzentration von 1.0 μ M als 100% gesetzt wurde.

17.6 Untersuchung der Proteinbindung

17.6.1 Ethanolpräzipitation

440mg Humanserumalbumin (HSA) werden in 11.0ml serumfreiem EMEM in einem 15ml-Gewebekulturröhrchen gelöst. 1.0ml werden sofort danach abgenommen und mit 1.0 μ l DMF versetzt (Blindwert). Zu den restlichen 10ml werden 10 μ l einer 3mM Substanzstammlösung in DMF gegeben und gut durchmischt. Die Lösung wird bei 37°C (Wasserbad) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten werden jeweils 250 μ l der Inkubationslösung mit 500 μ l kaltem (-20°C) Ethanol versetzt, 2 Stunden im Tiefkühlschrank stehen gelassen und zentrifugiert (2000 U/min, 5 Minuten bei 4°C). Von der überstehenden Lösung werden 400 μ l entnommen und durch Zusatz von 40 μ l HNO₃-13% stabilisiert. Die Messung des Cobaltgehaltes (C) erfolgt durch AAS (siehe Abschnitt 17.3). Zur Kalibrierung wird die unbehandelte Inkubationslösung mit Triton 0.1% in Konzentrationen von 0.1 bis 1.0 μ M verdünnt. Diese Standards werden gleichermaßen durch Zusatz von HNO₃ stabilisiert. Die Berechnung erfolgt als Mittelwert (\pm Stabw.) von 3 unabhängigen Experimenten:

$$\text{Proteinbindung (\%)} = (1 - (C*3)/3)*100 = (1-C)*100$$

17.6.2 Größenausschlußchromatographie

115.53mg HSA werden in 5.0ml serumfreiem EMEM gelöst. Davon werden 1.0ml zur Bestimmung der HSA-Wiederfindungsrate entnommen. Zu den restlichen 4.0ml werden 4.0 μ l einer 25mM Lösung von Co-ASS in DMF zugesetzt. Von dieser Lösung werden 100 μ l entnommen und mit destilliertem Wasser auf 1.5ml aufgefüllt (Wiederfindungsrate Co-ASS). Die Lösung wird bei 37°C (Wasserbad) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten werden 100 μ l entnommen und chromatographiert. Zur Chromatographie werden ca. 10-15ml vorgequollenes 'Sephadex G50 fine'- Material verwendet, welches in eine 10ml-Plastik-Pipette gefüllt wurde. Der Ausgang der Pipette wurde mit einem kleinen Wattebausch versehen. Als Elutionsmittel dient destilliertes Wasser. Es werden Fraktionen a 0.5, 1.0 oder 1.5ml in Eppendorf-Reagiergefäßen aufgefangen. Die Elution ist beendet, wenn das im Medium enthaltene Phenolrot sichtbar komplett von der Säule eluiert wurde. Die Bestimmung des Cobalt-Gehaltes erfolgt mit AAS und die des Proteingehaltes mittels Bradford-Methode. Die Proben für die AAS-Messung werden mit je 10% (V/V) Triton-1% und HNO₃-13% stabilisiert. Für die Bradford-Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 17.1) werden jeweils 150 μ l der jeweiligen Probe zu 1.0ml mit destilliertem Wasser verdünnt und 100 μ l davon mit 1.0ml

Bradford-Reagens versetzt. Zur graphischen Darstellung werden die Cobalt- bzw. Proteinabsorptionswerte als Prozentanteil des jeweiligen Absorptionsmaximalwertes gegen die Elutionsmenge aufgetragen. Nach Integration des Messignales über die Elutionsmenge (Software Origin 7.0) kann der protein- gebundene Anteil gemäß untenstehender Formel berechnet werden.

$$\text{Proteinbindung(\%)} = (\text{AUC}_{(\text{Cobalt-gebunden})} / \text{AUC}_{(\text{Cobalt-gesamt})}) * 100$$

Die Wiederfindungsrate wird wie folgt berechnet:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = (\text{Gesamt eluierte Menge} / \text{Menge der nicht chromatographierten Probe}) * 100$$

Sie beträgt für Co-ASS 104% und für HSA 95%

17.7 Untersuchung der DNS-Bindung

Stammlösungen

- DNS-Stammlösung: 12-16mg Lachsspermien-DNS (Sigma) werden in 12ml PBS gelöst. Diese Lösung kann im Tiefkühlschrank über längere Zeit stabil gelagert werden. Bei Bedarf wird der DNS-Gehalt durch Verdünnen mit PBS auf 250 μ g/ml eingestellt.
- Substanz-Stammlösungen: Die Komplexe werden zu 40.6mM in DMF gelöst.

Durchführung

Je 10 μ l der jeweiligen Substanz-Stammlösung werden mit 90 μ l PBS vorverdünnt. 10 μ l dieser Lösung werden zu 990 μ l DNS-Stammlösung pipettiert (c(DNS)=250 μ g/ml) und nach gründlichem Schütteln 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach werden jeweils 200 μ l der Lösungen (Doppelbestimmung) mit 100 μ l 0.9M Natriumacetat und anschließend 900 μ l kaltem Ethanol versetzt, 2mal leicht geschwenkt und 30 Minuten im Tiefkühlschrank stehen gelassen. Nach Zentrifugation (5000 U/min, 10 Minuten, 4°C) wird das DNS-Pellet in 300 μ l 0.3M Natriumacetat resuspendiert, wiederum mit 900 μ l kaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (wie vorhin). Das Präzipitat wird 2 mal mit kaltem Ethanol gewaschen und bis zur weiteren Behandlung bei -20°C gelagert.

Analytik

Die Pellets werden in 500 μl Aqua bidest. resuspendiert. 150 μl davon werden zur Cobalt-Bestimmung mit 15 μl Triton-1% versetzt. Zur Kalibrierung des AAS-Gerätes wird eine der Substanz-Stammlösungen entsprechend mit DMF und Triton 0.1% verdünnt. Die DNS-Bestimmung erfolgt im Mikroplatten-reader. Dazu werden jeweils 150 μl der resuspendierten Pellets in entsprechenden UV-96-Lochplatten bei 260nm vermessen (Doppeltbestimmung). Zur Kalibrierung werden DNS-Lösungen in Aqua bidest. im Bereich von 20-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet.

Berechnung

Die Berechnung der DNS-Bindung erfolgt als pmol Komplex/ μg DNS. Jeder Wert wird aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (je $n=2$) ermittelt. Durch Einbeziehen des mittleren Molekulargewichtes eines DNS-Nukleotidbruchstückes (307.9 g/mol) kann das Nucleosid/Substanz - Verhältnis berechnet werden.

17.8 Hemmung von Cyclooxygenasen

Die Hemmung der COX-1 vom Rind und human rekombinanter COX-2 wurde mit dem 'COX Inhibitor Screening Assay' (Katalognummer: 560131) der Firma 'Cayman Chemical' (1180 E. Ellsworth Rd., Ann Arbor, MI 48108, USA) bestimmt.

Durchführung

Die Testsubstanzen wurden als Stammlösungen in DMSO frisch hergestellt. COX-1 bzw. COX-2 wurden in 0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA und 2mM Phenol zusammen mit dem COX-Substrat Häm und den Testsubstanzen 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad in 1.5ml-Reagiergefäßen inkubiert und die Enzymreaktion anschließend durch Zusatz von Arachidonsäure gestartet (10µM, 200µM Testsubstanz bzw. Blindwert, 100µM Arachidonsäure, 2.0% (V/V) DMSO, Gesamtvolumen 1.0ml). Die Lösungen wurden gründlich durchmischt und für weitere 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zusatz von 50 µl 1.0M HCl gestoppt, die Reagiergefäße vom Wasserbad entfernt, 100 µl einer gesättigten SnCl₂-Lösung zugesetzt und gründlich durchmischt. Die getrübbten Lösungen wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben wurden 1:2000 und 1:4000 mit Puffer verdünnt und je 50µl dieser verdünnten Proben bzw. von Prostaglandin E₂ Standards wurden mit je 50 µl der Lösung eines Prostaglandin-Acetylcholinesterase-Konjugates und eines Antiserums in einer mitgelieferten ELISA-96-Lochplatte versetzt. Die Platte wurde mit Parafilm abgedichtet und 18 Stunden bei Raumtemperatur in der Dunkelheit stehen gelassen. Danach wurden die Löcher der Platte geleert, fünf mal mit einem Waschpuffer gewaschen und jedem Loch 200µl Ellmanns Reagenz zugesetzt. Nach 60-90 Minuten Inkubation wurde die Platte bei 415nm im Mikroplattenreader vermessen.

Die Versuche wurden jeweils als Doppeltbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte prozentuell in Bezug auf den Blindwert (ungehemmte Reaktion).

17.9 Reaktion mit Thiolen

Allgemein: Co-ASS wird mit einem Überschuß des jeweiligen Thiols bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Wiederfindung von Co-ASS wird mit HPLC bestimmt.

HPLC-Bedingungen:

- Gerät: Kontron System 522 mit Diodenarraydetektor
- stationäre Phase: Nucleosil C18 (25cm, 4mm ID, 5 μ M)
- mobile Phase : Methanol/Wasser = 80/20
- Injektion: 40 μ l
- Flussrate: 0.6 ml/min

Umsetzung mit Ethandithiol

4.42mg (0.01 mmol) Co-ASS werden in 40ml Methanol (HPLC-Qualität) gelöst, 500 μ l (560mg, 5.96mmol) Ethandithiol zugesetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz verfärbt sich schon nach kurzer Zeit dunkler. Eine analog behandelte Blindprobe (500 μ l Ethandithiol in 40ml MeOH) bleibt auch nach langem Rühren eine klare farblose Lösung. Nach 5 Tagen wird der im Ansatz entstandene Niederschlag vorsichtig abgenutscht, mit MeOH gewaschen und im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 4.0mg (43.5 μ mol -S-CH₂-CH₂-S-, <1%)

M.S. (EI, 230°C): m/z (%) = 368(2) [4x -S-CH₂-CH₂-S-], 276(6) [3x -S-CH₂-CH₂-S-], 184(50) [2x -S-CH₂-CH₂-S-], 124(100) [-SS-CH₂-CH₂-S-]; ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3.11 (s), 3.16 (s), 3.20 (s)

Wiederfindung Co-ASS: 75%

Umsetzung mit Cystein

5.15mg (0.01 mmol) Co-ASS werden in 20ml MeOH gelöst und 248.26mg (2.05 mmol) Cystein in 10ml H₂O. 15ml der Co-ASS-Lösung wird mit 5ml Cystein-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Blindwert: 5ml Cystein-Lösung mit 15ml MeOH. Alle Lösungsmittel wurden zuvor mit Argon begast. Nach 5 Tagen wurde der gebildete Niederschlag durch Zentrifugation (1000 U/Min., 20°C, 10 Min.) isoliert und im Trockenschrank bei

85-90°C getrocknet.

Ausbeute: 69.1mg (Blindwert: 8.9mg) = 0.24mmol S₈ (24%, Blindwert wurde abgezogen)

M.S. (EI, 280°C) m/z (%) = 256 (2)[S₈], 224 (3) [S₇], 192 (12)[S₆], 160 (6)[S₅]

Wiederfindung Co-ASS: <1%

Umsetzung mit GSH

4.60mg (0.01 mmol) Co-ASS werden in 15ml Methanol gelöst. 51.09mg (160 μ mol) reduziertes Glutathion (GSH) werden in 5ml H₂O gelöst. Beide Lösungen werden vereinigt, mit Argon begast und bei Raumtemperatur gelagert. (Blindwert: 4.40mg Co-ASS in 15ml Methanol gelöst und 5ml H₂O zugesetzt) Die Bildung von GSSG wird mit der HPLC verfolgt: HPLC-Bedingungen wie oben; mobile Phase: MeOH(+ 0.1% TFA)/H₂O(+ 0.1% TFA) = 7/93; Auswertung bei 215nm; Kalibrierung: GSSG gelöst in MeOH/H₂O.

Ausbeute: 3.91mg (6.4 μ mol, 4%) GSSG

Wiederfindung Co-ASS: 17%

17.10 Cytotoxizität (IC₅₀-Wert)

Aussaat der Zellen

Jeweils 100 μ l Zellsuspension (ca. 10000 Zellen/ml bei MCF-7, ca. 5000 Zellen/ml bei MDA-MB-231 und ca. 2850 Zellen/ml bei HT-29) werden in 96-Lochplatten pipettiert und 3 Tage (2 Tage bei HT-29) im Brutschrank anwachsen gelassen.

Herstellung der Substanz-Stammlösungen

Ausgangslösung: Substanz 50mM in DMF

Die Substanzstammlösungen von 0.1 - 50 mM werden laut nachfolgender Tabelle 17.2 hergestellt.

c (mM)	25	10	5	2	0.5	0.1
μ l (mM Stammlösung)	30 (50)	20 (50)	30 (10)	20 (10)	25 (2)	20 (0.5)
+ μ l DMF	30	80	30	80	75	80

Tabelle 17.2: Pipettierschema zur Herstellung der Substanz-Stammlösungen

Substanzzugabe

Jeweils $10\mu\text{l}$ der jeweiligen Stammlösung bzw. DMF (Blindwert) werden zu 10ml des jeweiligen Zellkulturmediums gegeben (bzw. $5\mu\text{l}$ zu 5ml) und gut durchmischt. Je $200\mu\text{l}$ der Lösungen werden in je 6 Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert. Folglich können in einer 96-Lochplatte 2 Substanzen in je 7 Konzentrationen mit Blindwert getestet werden (siehe Tabelle 17.3). Für die Bestimmung der Ausgangszellmenge wird die 't0-Platte' nach oder während der Substanzzugabe schon abgestoppt und mit Phosphatpuffer pH 7.4 im Kühlschrank gelagert (siehe unten).

	1-6	7-12
A	Blindwert	Substanz 1 ($0.1\mu\text{M}$)
B	Substanz 1 ($0.5\mu\text{M}$)	Substanz 1 ($2\mu\text{M}$)
C	Substanz 1 ($5\mu\text{M}$)	Substanz 1 ($10\mu\text{M}$)
D	Substanz 1 ($25\mu\text{M}$)	Substanz 1 ($50\mu\text{M}$)
E	Blindwert	Substanz 2 ($0.1\mu\text{M}$)
F	Substanz 2 ($0.5\mu\text{M}$)	Substanz 2 ($2\mu\text{M}$)
G	Substanz 2 ($5\mu\text{M}$)	Substanz 2 ($10\mu\text{M}$)
H	Substanz 2 ($25\mu\text{M}$)	Substanz 2 ($50\mu\text{M}$)

Tabelle 17.3: Belegung der 96-Lochplatte

Abstoppen / Kristallviolett färbung

Das Abstoppen der Substanzeinwirkung erfolgt bei MDA-MB-231 und HT-29 nach 72 und bei MCF-7 nach 96 Stunden durch Absaugen der Substanz enthaltenden Medien. Anschließend werden $100\mu\text{l}$ Glutardialdehydlösung (12.5ml Phosphatpuffer pH 7.4 + $500\mu\text{l}$ Glutardialdehyd) zur Fixierung der Zellen zugesetzt und nach 20-30 Minuten abgeschüttelt. Es werden $180\mu\text{l}$ der Phosphatpufferlösung zugesetzt und nach wenigen Minuten wieder abgesaugt. Die Färbung erfolgt durch Zusatz von je $100\mu\text{l}$ 0.02% Kristallviolettlösung. Diese wird nach 30 Minuten Einwirkdauer abgeschüttelt, die Platten 2 mal mit Wasser gewaschen und 15 Minuten mit Wasser gefüllt stehen gelassen. Das Wasser wird wiederum durch intensives Abklopfen der Platten auf Papier möglichst vollständig entfernt. Dann werden $180\mu\text{l}$ 70% Ethanol zupipettiert und die Platten 3-4 Stunden bei leichtem Schütteln stehen gelassen. Die Messung der verbliebenen Kristallviolettmenge erfolgt bei 590nm im Mikroplattenreader.

Berechnung der IC₅₀ -Werte

Zuerst werden die Absorptionsmittelwerte aus den jeweils zusammengehörenden Löchern ermittelt. Die Berechnung der T/Ccorr(%) erfolgt nach folgender Gleichung:

$$T/Ccorr(\%) = (S-I)*100/(B-I)$$

S: Absorptionsmittelwert einer Substanz in einer der 7 Konzentrationen

I: Absorptionsmittelwert der Ausgangszellmenge (t0)

B: Absorptionsmittelwert des Blindwertes

Anschließend werden die erhaltenen T/Ccorr(%) gegen den Logarithmus der Substanzkonzentration in einem Diagramm aufgetragen und der sigmoide Kurvenverlauf mit Hilfe der Boltzmann-Funktion berechnet (Software: Origin 7.0). Der IC₅₀ kann dann als diejenige Substanzkonzentration, bei der T/Ccorr(%) den Wert 50 ergibt, aus der Kurve abgelesen (berechnet) werden. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

17.11 Zellaufnahmebestimmung

Anzucht / Substanzzugabe

MCF-7 bzw. MDA-MB-231 Zellen werden in 24-Lochplatten ca. eine Woche bis mindestens 70% Konfluenz angezüchtet. Die Substanzen werden zu 2.0mM in DMF gelöst und anschließend 1:1000 mit dem jeweiligen Kulturmedium verdünnt. Bei der Substanzzugabe wird das alte Medium abgesaugt und durch 500 μ l neues 2.0 μ M Substanz enthaltendes Medium ersetzt. Die 24-Lochplatten werden bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Abstoppen der Zellaufnahme

Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 Stunden wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 0.5ml PBS gewaschen und mit 400 μ l Aqua bidest. 10-15 Minuten stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen in jedem Loch mit einer Sonotrode lysiert. Je 200 μ l der Zellsuspension werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Proteinbestimmung im Tiefkühlschrank (-20°C) gelagert. Die verbleibenden 200 μ l werden mit jeweils 20 μ l Triton-1% und HNO₃-13% versetzt und in ein AAS-Probengefäß überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford

70 μ l der lysierten Zellsuspension werden in Einwegküvetten mit 1.0 ml Bradford-Reagens (1:5) versetzt und nach 20 Minuten Inkubation bei 595nm photometrisch vermessen (siehe Abschnitt 17.1).

Blindwert: Aqua bidest.

Kalibrierung: 1-2mg HSA werden in 1500 μ l Aqua bidest. gelöst und weiter verdünnt. (25,50,75,100,150,200, 300 μ l HSA-Lösung + 975, 950, 925, 900, 850, 800, 700 μ l Aqua bidest.) Jeder Wert wird doppelt bestimmt und die Mittelwerte zur weiteren Berechnung herangezogen.

Cobaltbestimmung mit GF-AAS

Kalibrierung: Die 2.0 μ M Lösung der Substanz im Zellkulturmedium wird 1+1 mit Triton 0.1% verdünnt. Durch weiteres Verdünnen werden Lösungen zwischen 0.1 und 1.0 μ M hergestellt. Je 200 μ l davon werden in ein AAS-Probengefäß überführt und mit je 20 μ l HNO₃-13% und Triton-1% versetzt. Die AAS-Messung erfolgt wie unter Abschnitt 17.3 beschrieben.

Berechnung

Die Berechnung erfolgt als pmol Komplex pro μg Zellprotein als Mittelwert von jeweils 6 Löchern der 24-Lochplatte. Da 1.0 ng Zellprotein 8.85 (MCF-7) bzw. 9.24 (MDA-MB-231) pl Zellvolumen entsprechen kann gemäß unten angeführter Gleichung (exemplarisch für MCF-7) die intrazelluläre Substanzkonzentration geschätzt werden [5]. Nach Division durch die Konzentration im Extrazellulärmedium ($2.0\mu\text{M}$) erhält man den Anreicherungsgrad der Substanz in der Zelle.

$$c_{\text{intraz}} (\mu\text{M}) = (\text{pmol}/\mu\text{g} * 1000) / 8.85$$

17.12 Isolierung und Analytik von Nuclei

verwendete Pufferlösungen und Reagenzien soweit nicht unter Abschnitt 16 beschrieben:

- 'RS-Puffer' (Reticulozyten Standard Puffer)
0.01 M Tris-HCl, 0.01M NaCl, 1.5mM MgCl₂, pH 7.4
- 'Nonidet-Desoxycholat-RS'
RS-Puffer mit jeweils 0.3 % Nonidet-P40 und Natriumdesoxycholat
- 'Saccharose-CaCl₂'
0.25M Saccharose, 3mM CaCl₂

Isolierung der Nuclei

Vorerst werden MCF-7- bzw. MDA-MB-231-Zellen wie in Abschnitt A.1 beschrieben in 75-cm²-Zellkulturflaschen bis mindestens 70% Konfluenz angezüchtet. Das alte Medium wird entfernt, 10ml 2.0μM Substanz enthaltendes Medium werden zugesetzt und die Zellen 24 Stunden im Brutschrank weiter inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt, einmal mit 10ml PBS gewaschen und trypsinisiert (siehe Abschnitt A.1). Die Zellen werden mit ca. 10ml des entsprechenden Mediums ab gespült und in 15ml-Gewebekulturröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1500U/Min. für 5 Minuten werden die Pellets mit etwas (0.5-1.0ml) physiologischer NaCl versetzt und nochmals 5 Minuten bei 1500U/Min. zentrifugiert. Die so von Mediumresten gereinigten Pellets werden in 300μl eiskaltem 'RS-Puffer' resuspendiert, in ein Eppendorf-Reagiergefäß überführt und 10 Minuten in einem Eisbad stehen gelassen. Anschließend werden die vorgequollenen Zellen 5min bei 2000U/Min. zentrifugiert, in 300μl 'Nonidet-Desoxycholat-RS' aufgenommen und mit einer 1ml-Spritze mit 14er-Nadel durch 10-15 maliges Auf- und Abziehen homogenisiert. 50μl des Homogenisates werden zur Bestimmung des Gesamtcobaltgehaltes entnommen und mit 500μl EDTA 10g/l versetzt. Das Homogenisat wird 5 Minuten bei 2500U/Min. zentrifugiert und die so erhaltenen 'Roh-Nuclei' in 150μl 'Saccharose-CaCl₂' resuspendiert. Die Suspension wird mit 150μl Saccharose 0.88M unterschichtet und 10 Minuten bei 2500U/Min. zentrifugiert. Die Kernpellets werden eingefroren oder sofort mit 200μl 10g/l EDTA versetzt.

Cobalt- und Protein-Analytik

Cobalt

Die mit 200 μ l EDTA 10g/l versetzten Kernpellets werden mit einer Sonotrode behandelt und ohne weitere Zusätze mittels GF-AAS auf den Cobalt-Gehalt untersucht (siehe Abschnitt 17.3). Die Lösungen zur Bestimmung des Gesamtcobaltgehaltes werden ebenso ohne weitere Zusätze vermessen. Gegebenfalls müssen diese noch weiter mit EDTA-Lösung verdünnt werden. Die Kalibrierung erfolgt durch Verdünnen der Inkubationslösungen mit EDTA 10g/l ebenfalls ohne weitere Zusätze. (verwendete Kalibrierkonzentrationen: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1.0 μ M). Alle Proben und Kalibrierlösungen werden jeweils doppelt bestimmt.

Kernproteingehalt

Zur Ermittlung der Kernbiomasse wird der Proteingehalt nach der Bradford-Methode (siehe Abschnitt 17.1) bestimmt. Es werden jeweils 290 μ l frisch bereitete Bradford-Lösung je Loch in eine 96-Lochplatte pipettiert und 10 μ l des Kernlysats zugesetzt. (Anmerkung: Vor Zugabe des Kernlysats sollte noch der Nullabgleich am Mikroplattenreader vorgenommen werden.) Nach 20 Minuten Inkubation wird die Absorption bei 595nm mit einem Mikroplattenreader bestimmt. Zur Kalibrierung wird Humanserum-Albumin (HSA) in EDTA 10g/l gelöst und Lösungen zwischen 0.2 und 1.6mg/ml hergestellt. Jede Probe bzw. jeder Standard wird doppelt bestimmt.

Berechnung

Jedes Experiment wird mit je drei Zellkulturflaschen pro Substanz durchgeführt. Die Berechnung erfolgt als Mittelwert von mindestens 2 unabhängigen Experimenten als pmol Substanz pro μ g Kernprotein bzw. als prozentueller Anteil an der gesamten in den Zellen vorgefundenen Cobaltmenge.

17.13 Glutathionreduktaseaktivität

weitere Reagenzien / Lösungen

soweit nicht in Abschnitt 16 beschrieben:

- Puffer pH 7.0 (Fa: Merck)
- 'NADPH-Lösung' (220 μ M) 2.5-3mg NADPH in Puffer pH 7.0 gelöst
- 'GSSG-Lösung' (2.2mM) 16-20mg GSSG in Puffer pH 7.0 gelöst
- 'Reaktionslösung' : NADPH- und GSSG-Lösung 1+1

Durchführung

Je 50 μ l MCF-7 Zellsuspension aus der Zellpassage (ca 1 Mio. Zellen/ml, siehe Abschnitt A.1) werden zu 500 μ l serumhaltigem EMEM in 24-Lochplatten pipettiert und die Zellen bei 37°C / 5% CO₂ bis mindestens 70% Konfluenz anwachsen gelassen. Danach wird das alte Medium abgesaugt, mit 500 μ l PBS gewaschen, und je 500 μ l 8.0 μ M Substanz bzw. DMF (Kontrolle) enthaltendes Medium zugesetzt. Dabei werden je 6 Löcher einer Platte durch den Kontrollwert und 3 verschiedene Substanzen belegt. Nach 6-stündiger Inkubation im Brutschrank wird das Medium entfernt, mit PBS gewaschen, 250 μ l Phosphatpuffer pH 7.0 zugesetzt und die Platte ca. 15 Minuten stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen mittels Sonotrode in den Löchern lysiert. Die Lysate werden nach Überführung in Eppendorf-Cups 10 Minuten bei 4000 U/min bei R.T. zentrifugiert. Je 40 μ l werden für NADPH-Messung entnommen. Der Rest der Lysate wird bis zur Proteinbestimmung im Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert. Die Messung der NADPH-Konzentration muss aus Stabilitätsgründen unmittelbar nach Herstellung der Lysate erfolgen.

Messung des NADPH-Verbrauchs

Der NADPH-Verbrauch wird im UV-Mikroplattenreader bestimmt. Zur Herstellung der Kalibrierlösungen werden 330, 300, 225, 150, 75 bzw. 0 μ l der Reaktionslösung mit 0, 30, 105, 180, 255 und 330 μ l Puffer pH 7.0 in den Löchern 7-12 der B-Zeile einer 96-Lochplatte versetzt (ergibt 330 μ l pro Loch). In die übrigen Löcher werden jeweils 290 μ l Reaktionslösung vorgelegt und mit 40 μ l Zelllysate bzw. Pufferlösung pH 7.0 versetzt. Der Kontrollwert und die jeweiligen Zelllysate der Substanzen (alle Löcher der 24-Lochplatte) werden jeweils als Doppelbestimmung gemessen, die Kalibrierlösungen als Einfachbestimmung. Die nachfolgende Übersicht verdeutlicht die Belegung der

96-Lochplatte. Die erste Messung (340nm) erfolgt direkt nach Fertigstellung der 96-Lochplatte ('Start'). Von dieser Messung werden nur die Löcher B1 bis B12 (Reaktionslösung und Kalibrierlösungen) zur Berechnung verwendet. Danach wird die Platte im Rhythmus von 20 Minuten wiederholt vermessen. Nach 360 Minuten werden die Messungen abgebrochen. Zur Berechnung werden nur Messungen herangezogen, bei denen das in der Reaktionslösung vorhandene NADPH noch ausreichend stabil geblieben ist ('Messung'). Dies kann durch Vergleich der Absorptionswerte aus den Löchern B1 bis B6 erkannt werden. Der Absorptionsmittelwert muss mindestens 85% des Wertes aus der ersten Messung ('Start') betragen.

Belegung 96-Loch-Platte

- A1-12: 290 μ l Reaktionslösung + 40 μ l Zellysat Kontrolle (2-fach)
- B1-6: 290 μ l Reaktionslösung + 40 μ l Pufferlösung pH 7.0
- B7-12: Kalibrierung NADPH (1-fach)
- C1-12: 290 μ l Reaktionslösung + Zellysat Substanz 1 (2-fach)
- D1-12: 290 μ l Reaktionslösung + Zellysat Substanz 2 (2-fach)
- E1-12: 290 μ l Reaktionslösung + Zellysat Substanz 3 (2-fach)

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird nach der Bradford-Methode durchgeführt (siehe Abschnitt 17.1). Zur Kalibrierung werden 1.5-2.0mg Humanserumalbumin (HSA) in 1500 μ l destilliertem Wasser gelöst. 0, 12, 24, 36, 48, 60 μ l davon werden mit 100, 88, 76, 64, 52, 40 μ l Puffer pH 7.0 (ergibt jeweils 100 μ l) weiter verdünnt. Je 20 μ l Probe bzw. Kalibrierlösung werden in einer 96-Lochplatte zu 200 μ l Bradford-Lösung pipettiert und mit der Pipette gut durchmischt. Die Messung erfolgt nach 20 Minuten Inkubation bei 595nm. Jede Probe bzw. Standard wird als Doppeltbestimmung gemessen.

Berechnung / Auswertung

Die Berechnung der Enzymaktivität der Zellysate erfolgt unter Verwendung der entsprechenden Mittelwerte als nmol verbrauchtes NADPH pro Minute pro μ g Protein gemäß folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität} = [\mu\text{M NADPH (B1-B6-'Start')} - \mu\text{M NADPH (Zellysat-'Messung')}] / \text{Minuten} / \text{Protein } (\mu\text{g/ml})$$

Die Berechnung der Beeinflussung des NADPH-Verbrauchs erfolgt prozentuell in Bezug auf den Kontrollwert und wird als Mittelwert (\pm Stabw.) der Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten angegeben.

17.14 Apoptoseuntersuchungen

Die Apoptoseuntersuchungen wurden freundlicherweise in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Innsbruck durchgeführt.

'Annexin-V-Fluos Staining Kit'

Zur Bestimmung der Apoptose nach kurzer Substanzeinwirkung wurde der 'Annexin-V-Fluos Staining Kit' (Katalognummer: 1 858 777; Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Nonnenwald 2, 82372 Penzberg, Deutschland) verwendet:

Die MCF-7 bzw. MDA-MB-231 Zellen einer konfluenten 75cm² Zellkulturflasche wurden mit 10 ml 0-50 μ M Substanz enthaltendem Kulturmedium (0.1% V/V DMF) 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Trypsinisieren (siehe Abschnitt A.1) und Zentrifugation (200g, 5 Minuten) isoliert, anschließend in 100 μ l 'Annexin-V-FLUOS Färbelösung' resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Messung erfolgte fluoreszenzspektroskopisch im Durchflußzytometer bei einer Anregungswellenlänge von 488nm und Detektion bei 518nm (Fluorescein) bzw. 617nm (Propidiumiodid).

'ssDNA Apoptosis ELISA Kit'

Zur Untersuchung der Apoptose nach längerer Substanzeinwirkung wurde der 'ssDNA Apoptosis ELISA Kit' (Katalognummer: APT225; Chemicon International Inc., 28820 Single Oak Drive, Temecula CA 92590, USA) verwendet: 5.000-10.000 MCF-7 bzw. MDA-MB-231 Zellen pro Loch wurden für 24 Stunden in 96-Lochplatten anwachsen gelassen und mit 0-10 μ M Substanz enthaltendem Kulturmedium (0.1% V/V DMF) für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Löcher wurden geleert, die Platte bei 37°C für 30 Minuten getrocknet, 50 μ l Formamid zugesetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Platte 10 Minuten bei 75°C erhitzt, 5 Minuten im Kühlschrank abgekühlt und das Formamid entfernt.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 200 μ l 3% fettfreie Trockenmilch zugesetzt, bei 37°C für eine Stunde inkubiert, die Milchlösung wieder entfernt und 100 μ l Antikörpermischung zupipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μ l ABTS-Lösung pro Loch zugesetzt und 15-60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 100 μ l einer Stop-Lösung (HCl) gestoppt und die Absorption bei 405nm im Mikroplattenreader bestimmt.

17.15 Leukämie und Lymphomzellkulturen

Verwendete Zellkulturen

Bei allen verwendeten Zellkulturen handelt es sich um Suspensionszellkulturen, die in RPMI-Medium, welches mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und mit 10% FCS versetzt wurde, bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert werden. Im folgenden sei eine kurze Übersicht über die Art und Herkunft der verschiedenen Kulturen gegeben:

- K-562 (Humane chronische myeloide Leukämie)
Die Zellen wurden 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen CML-Patientin gewonnen.
- SD-1 (Lymphoblastische Leukämie)
Die Zellen wurden aus dem peripheren Blut einer Patientin mit akuter 1 (pre B-ALL) bei der Diagnose gewonnen.
- U-937 (Humanes histiocytisches Lymphom)
gewonnen 1974 aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Patienten.
- LAMA-84 (Humane chronische myeloide Leukämie)
gewonnen aus dem peripheren Blut einer 29-jährigen CML-Patientin, die zuvor (1979-1984) 5 Jahre lang mit Busulfan behandelt wurde.

Cytotoxizität (IC₅₀-Wert)

Die Substanzen wurden als Stammlösungen in DMF angesetzt und mit Medium entsprechend den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Für die höchste Substanzkonzentration betrug der DMF-Volumensanteil 0.1 %. 1x10⁴ Zellen pro Loch wurden in 96-Lochplatten pipettiert und soviel substanzhaltiges Medium zugesetzt, dass die gewünschten Konzentrationen erhalten wurden (0, 0.05, 0.5, 1.0, 5.0 und 25 μ M). Jede Konzentration wurde 6-fach getestet. Die 96-Lochplatten wurden nun 48 bzw. 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C

/ 5% CO₂ inkubiert. Für die jeweils letzten 12-16 Stunden der Inkubation wurden die Zellen mit 2 μ Ci ³[H]-Thymidin versetzt. Anschließend wurden die Zellen in einem halbautomatisierten Gerät geerntet und die ³[H]-Thymidin-Aufnahme in einen Scintillationszähler gemessen. Zur Berechnung wurden jeweils die Mittelwerte der entsprechenden 6 Löcher herangezogen. Der IC₅₀ wurde als diejenige Konzentration berechnet, bei der die Zellbiomasse um 50% reduziert wurde.

Zellaufnahmeexperimente

Die Experimente wurden wie von Di Blasi beschrieben mit leichten Modifikationen durchgeführt [9]. Die Zellen wurden mit 2.0 μ M enthaltendem Medium über 24 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ in 75cm² Zellkulturflaschen inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 U/min, 1 Minute, R.T.) isoliert, 2 mal mit PBS gewaschen und die Pellets bei -20°C bis zur weiteren Behandlung gelagert. Die Zellen wurden in 2-fach destilliertem Wasser resuspendiert und mittels Sonotrode lysiert. Die Lysate wurden mit Graphitrohr-AAS (siehe Abschnitt 17.3) auf ihren Cobalt-Gehalt und nach der Bradford-Methode (siehe Abschnitt 17.1) auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Ergebnisse wurden als pmol Substanz pro μ g Protein als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten berechnet.