

3 Methodenoptimierung für die biologische Testung von Platinverbindungen

3.1 Erstellung einer AAS-Methode zur Bestimmung von Platin aus biologischen Matrizes

In der Literatur wird die Elektrothermische Atomabsorptionsspektroskopie (ET-AAS) sehr häufig zur Bestimmung des Plattingehalts in biologischen Proben genutzt. Bei dieser atomabsorptionsspektroskopischen Bestimmungstechnik wird ein Aliquot einer flüssigen Probe in ein Graphitrohr pipettiert. Durch gesteuertes Aufheizen in einem Ofen wird die Probe in einem Inertgasstrom eingedampft. Bei höheren Temperaturen (>200°C) wird versucht, die störende Matrix zu verflüchtigen. Diese kann in biologischen Proben aus kohlenstoffhaltigen Substanzen (Proteine, Lipide) und Salzen wie Natriumchlorid bestehen. Bei diesem als Pyrolyse bezeichneten Vorgang sollte die Temperatur so gewählt werden, dass die Matrix maximal möglich beseitigt, aber der Analyt noch nicht atomisiert wird. Nach der erfolgten Pyrolyse wird die Temperatur schlagartig erhöht, um den Analyten atomisiert zu verflüchtigen. Die resultierende Atomwolke schwächt durch Absorption die Strahlung einer elementspezifischen Hohlkathodenlampe, die mit dem Gehalt des Analyten in der Probe korreliert. Da nicht nur die Analyten das Licht der Hohlkathodenlampe absorbieren, wird in der Regel eine Untergrundkompensation vorgenommen. Hierbei kann ein Kontinuumstrahler wie eine Deuteriumlampe genutzt werden, um die unspezifische Absorption in der Nähe der Analysenlinie zu bestimmen und vom gemessenen Signal zu subtrahieren.^[148]

Neben den optimalen Messbedingungen spielt die Probenvorbereitung eine große Rolle. Feste Proben wie Gewebe müssen erst in eine pipettierbare Lösung überführt werden. Auch wenn Flüssigkeiten vorliegen, kann eine massive Störung z.B. aus einem zu hohen Gehalt an Kohlenstoffverbindungen resultieren. Daher werden die Proben in der Regel unter oxidativen Bedingungen in Druckgefäßen mit Hilfe der Mikrowellentechnik aufgeschlossen bzw. mineralisiert. Eine solche Probenvorbereitung ist häufig sehr aufwändig, so dass sehr große Probenzahlen nur sehr schwer zu realisieren sind.^[58,149-152]

Daneben existieren aber auch Methoden ohne umfangreiche Aufarbeitungen für

biologische Matrices, wovon allerdings nur wenige komplexe Zellmatrix enthalten.^[44,48,49,153-158] Die dort publizierten Messbedingungen lassen sich nur schwer übertragen, da diese häufig stark von Gerätetyp zu Gerätetyp variieren. Daher war es nötig, die Einflussgrößen bei der atomabsorptionsspektroskopischen Bestimmung von Platin in biologischen Matrices zu erkennen und zu optimieren.

3.1.1 Erstellung des Temperaturprogrammes

Da die Pyrolyse- und die Atomisierungstemperatur sowohl vom verwendeten Gerät als auch im Besonderen von der Matrix abhängig sind^[148], sollten als erstes diese Parameter optimiert werden. Als Matrix wurde ein Zellhomogenisat mit 1mg/ml Zellprotein gewählt, dem 0,1mg/l Platin zugesetzt worden war.

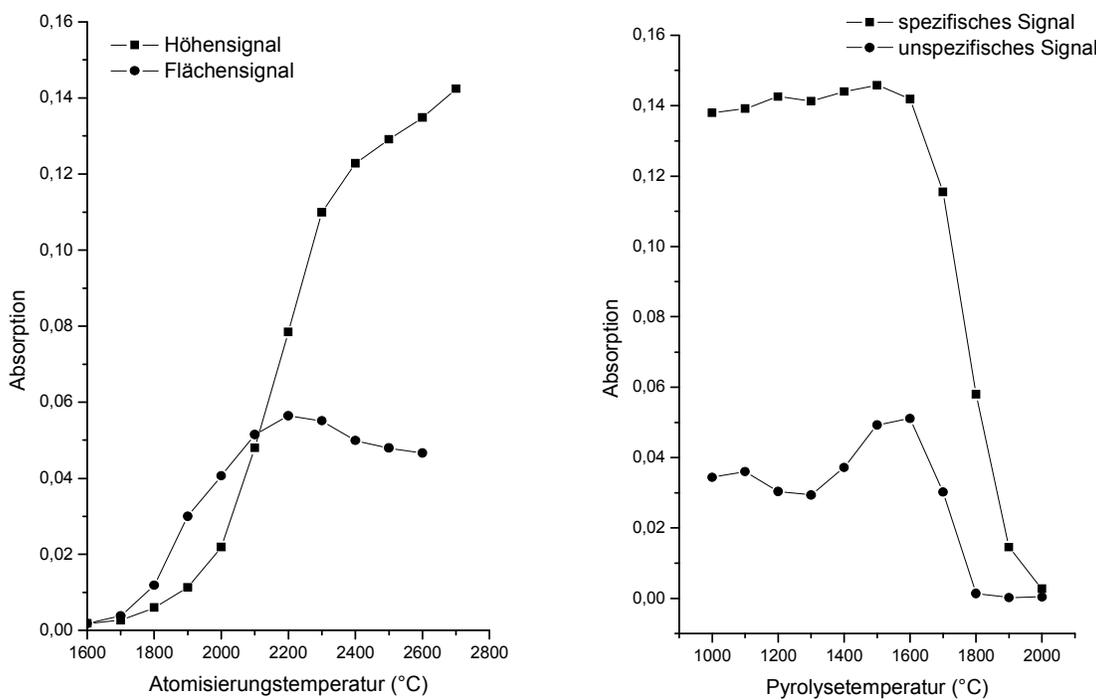


Abb. 3.1 Optimierung der Atomisierungs- (links) und der Pyrolysetemperatur (rechts)

Zur Ermittlung der optimalen Atomisierungstemperatur wurde die Pyrolysetemperatur auf 1400°C festgesetzt und die Atomisierungstemperatur von 1600°C bis 2700°C in

100°C Schritten angehoben. Die Auswertung wurde sowohl über die Signalfläche als auch über die Signalhöhe vorgenommen (siehe Abb. 3.1).

Die Signalflächen durchliefen bei 2200°C bis 2300°C ein Maximum, so dass bei der Quantifizierung über die Fläche diese Atomisierungstemperaturen zu bevorzugen waren. Ein Maximum in der Signalfläche ist typisch. Bei niedrigeren Temperaturen findet keine vollständige Atomisierung statt, während bei höheren Temperaturen die Verweildauer im Rohr aufgrund verstärkter Diffusionsvorgänge verkürzt wird. Für die Signalhöhe dagegen ist die Atomisierungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Je höher die Temperatur ist, desto größer wird die Signalhöhe. So wurde für die Signalhöhe ein rasanter Anstieg bis 2300°C gefunden, der dann abflachte, ohne dass ein Maximum erreicht wurde. Hierbei war bei der Signalhöhe zwischen 2400°C und 2600°C nur noch eine geringe Intensitätssteigerung (5%) zu beobachten. Da die Belastung des Graphitrohres mit zunehmender Atomisierungstemperatur steigt, sinkt die Lebensdauer folglich immer weiter. Deshalb wurde als optimale Atomisierungstemperatur für die Quantifizierung über die Höhe 2400°C festgelegt.

Zur Bestimmung der geeigneten Pyrolysetemperatur wurde diese in 100°C-Schritten von 1000 bis 2000°C erhöht. Die Atomisierungstemperatur wurde währenddessen konstant bei 2400°C belassen. Es wurden das Hintergrundsignal und das um den Hintergrund bereinigte spezifische Analytsignal aufgenommen.

Wie in Abb. 3.1 dargestellt, war das spezifische Analytsignal bis zu einer Pyrolysetemperatur von 1600°C auf einem konstant maximalen Niveau. Problematisch war in diesem Bereich die ebenfalls vorhandene unspezifische Absorption (Untergrund). Diese verlor erst deutlich an Intensität, wenn über 1600°C pyrolysiert wurde. War das spezifische Signal bei 1600°C 3fach höher als das Untergrundsignal, so war es bei 1700°C bzw. bei 1800 4fach bzw. 41fach höher als der Untergrund. Allerdings verlor man bei diesen Temperaturen 18 bzw. 60% der maximalen Signalintensität. Das Maximum des Untergrundsignals bei 1600°C war reproduzierbar und wurde auch bei der Verwendung einer anderen AAS-Methode gefunden.^[153] Die Reproduzierbarkeit, die Ausdruck in der Standardabweichungen findet, war bei den Pyrolysetemperaturen von

1600°C und 1700°C am besten ($\sigma=1\%$). Aufgrund der oben geschilderten Kriterien wurde im Folgenden bei 1700°C pyrolysiert.

Programmschritt	Heizrate [°C/s]	Temperatur [°C]	Haltezeit [s]
Trocknen	10	90	40
Trocknen	7	105	30
Trocknen	15	120	20
Pyrolyse	45	500	30
Pyrolyse	100	1000	10
Pyrolyse	300	1700	10
Nullabgleich	0	1700	6
Atomisieren	1500	2400	4
Ausheizen	1000	2450	5

Der Gasfluss ist auf 2 l/min gestellt, mit Ausnahme des Nullabgleichs und der Atomisierung.

Tab. 3.1 AAS-Temperaturprogramm für die Platinbestimmung aus zellmatrixhaltigen Proben

Es wurden intensive Trocknungsschritte im Programm (siehe Tab. 3.1) eingebaut, um Siedeverzüge bei zu schnellem Aufheizen zu verhindern. Siedeverzüge führen zu hohen Standardabweichungen. Die ersten beiden intensiven Pyrolyseschritte wurden aufgenommen, um Alkalisalze und Phosphate sicher zu entfernen, die eine starke Störung bei der Atomisierung hervorrufen können.^[159]

3.1.2 Einfluss der eingesetzten Mineralsäure auf die Signalintensität

Da bei pH-Werten über 1 eine rasch eintretende Adsorption an Gefäßwänden zu beobachten ist,^[148] ist die Stabilisierung von Platinlösungen durch Säurezusatz unbedingt nötig. Aus der Literatur sind Störungen in Form von Signalreduktionen bei der Verwendung von Salpetersäure (HNO₃) bekannt.^[149,160] Daher wurde ein mit 0,1 mg/l Platin dotiertes Zellhomogenisat (1mg/ml Zellprotein) mit verschiedenen Konzentrationen an Salzsäure (HCl) und HNO₃ stabilisiert. Überraschenderweise trat bei Erhöhung der Konzentration an Säure keine Signalreduktion ein, sondern es wurde eine Steigerung des Messsignals beobachtet (siehe Abb. 3.2). Diese Steigerung mündete in ein

Maximum (0,6-1,2M H⁺ für HNO₃ bzw. 0,9-1,4M H⁺ für HCl), das für HNO₃ geringfügig höher lag. Danach setzte bei der Verwendung beider Säuren eine leichte Signalreduktion ein.

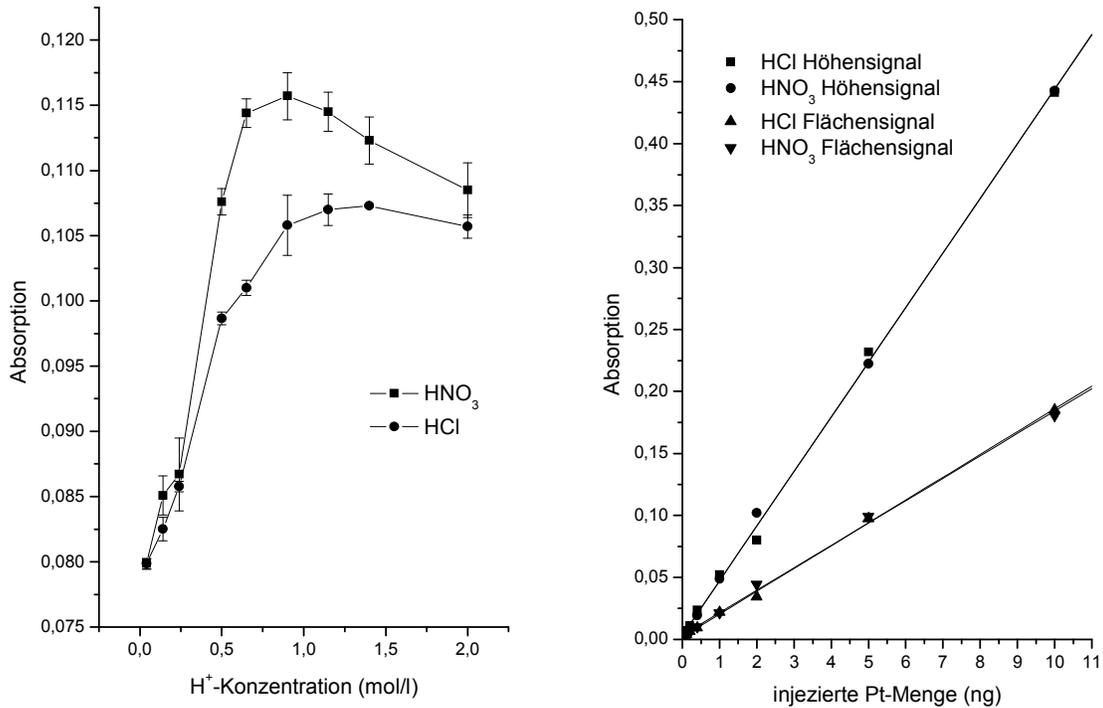


Abb. 3.2 Einfluss der Säurekonzentration und der Art der Mineralsäure auf das Atomisierungssignal (n=3)(links) und die Empfindlichkeit und Linearität der Kalibriergeraden (rechts)

Um den Einfluss der jeweiligen Säure auf die Empfindlichkeit und die Linearität der Messung zu bestimmen, wurde eine Vergleichskalibrierung erstellt. Dazu wurde eine Platinstandardreihe mit Zellhomogenisat als Matrix und mit den jeweiligen Säuren versetzt, so dass eine Säurekonzentration von 1mol/l resultierte. Bis 10 ng Pt, entsprechend einer Konzentration von 0,5mg/l Platin, waren alle Kalibrierfunktionen streng linear ($R^2 > 0,99$) und wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Geradensteigung auf (siehe Abb. 3.2). Da für mit HNO₃ stabilisierte Proben beim längeren Stehen einer Lösung mit Zellhomogenisat eine Trübung beobachtet wurde, aus der sich ein Bodensatz bildete, wurden die weiteren Analysen mit HCl (Konzentration im Messgefäß: 1mol/l) stabilisiert.

Die Empfindlichkeit der Kalibrierung über die Signalfläche war gegenüber der Signalhöhe auch im Optimalbereich der Atomisierungstemperatur maximal die Hälfte. Dieses zeigte auch die Steigung der Regressionsgeraden (siehe Abb. 3.2). Daher wurde im weiteren Verlauf über die Höhe kalibriert, um die Platingehalte in den Proben zu bestimmen.

3.1.3 Einfluss von oberflächenaktiven Substanzen

Protein- und zellmembranhaltige Proben müssen zur Gewährleistung einer homogenen Analysenlösung stabilisiert werden. Aus der Literatur ist dafür der Einsatz des nichtionischen Tensids Triton X-100 bekannt.^[48,49,153-156,158,159,161-165] Die eingesetzten Mengen unterscheiden sich jedoch um mehrere Größenordnungen. Auch ist der Einsatz eines Gemisches namens Antifoam 204 literaturbekannt.^[153,156] Hierbei handelt es um ein Gemisch von nicht silikonhaltigen organischen Schaumverhütern in einer Polyoldispersion.

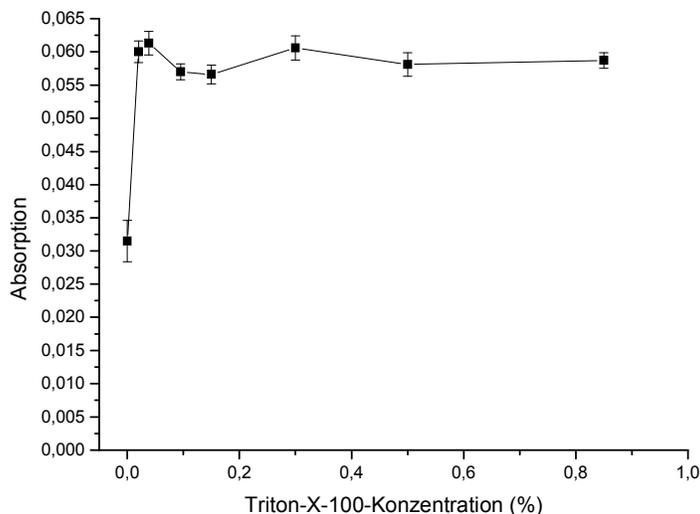


Abb. 3.3 Einfluss der Triton-X-100-Konzentration auf die Signalintensität (n=3)

Um den Einfluss des Tensids auf die Signalintensität zu testen, wurde ein mit 0,05 mg/l Platin dotiertes Zellhomogenisat so mit 5%iger Tritonlösung und Wasser versetzt, dass verschiedene Tensidkonzentrationen erreicht wurden (siehe Abb. 3.3). Der Zusatz von Triton X-100 erhöhte die Signalintensität um bis zu 100%. Die relative

Standardabweichung der einzelnen Lösungen lag ohne Triton X-100 Zusatz bei 10%, während sie beim Tritonzusatz immer unter 3% lag. Die über eine Konzentration von 0,02% hinaus zugegebene Menge Triton hingegen brachte keine weitere Erhöhung der Signalintensität bzw. keine weitere Erniedrigung der Standardabweichung. Die Intensitätssteigerungen und die geringeren Standardabweichungen sind auf Effekte sowohl im Probengeber (besseres, reproduzierbareres Abfließen) als auch im Graphitrohr (Verhinderung von Verspritzungen und daher konstantere und dichtere Atomwolken) zurückzuführen.^[157,159,163]

Beim Einsatz von Antifoam 204 wurden Werte für Intensität und Untergrundabsorption sowie deren relative Standardabweichung erhalten, die mit denen beim Einsatz von Triton-X-100 vergleichbar waren. Auch für eine Kombination von Triton und Antifoam sind ähnliche Werte wie für Triton und Antifoam allein gemessen worden. Allerdings wurde beim Einsatz von Antifoam eine milchige Eintrübung beobachtet, aus der sich bei längerer Wartezeit ein Bodensatz bildete. Daher wurde im Weiteren zur Probenstabilisierung Triton-X-100 bevorzugt.

3.1.4 Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur weiteren Evaluierung der erstellten Methode sollten die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze ermittelt werden. Hierzu wurde ein Zellhomogenisat ohne Platinzusatz als Blindwert injiziert. Als Mittelwert ($n=10$) wurde eine Absorption von 0,0021 erhalten. Die Standardabweichung σ wurde mit 0,0007 bestimmt. Die Nachweisgrenze wurde folglich bei Mittelwert(Blindwert)+ $3*\sigma$ also 0,0042 Absorptionseinheiten erreicht. Die Bestimmungsgrenze lag analog $6*\sigma$ über dem Nullwert d.h. bei 0,0063 Absorptionseinheiten. Bei einer Kalibrierung im unteren Konzentrationsbereich konnte diesen Absorptionseinheiten der jeweilige Konzentrationswert zugeordnet werden. Unter den gewählten Bedingungen lag die Nachweisgrenze bei 0,005mg/l Pt entsprechend einer injizierten Masse von 0,1ng Pt. Die Bestimmungsgrenze lag danach bei 0,007mg/l Pt entsprechend einer Masse von 0,14ng Pt. Diese Werte waren teilweise sogar deutlich besser als Literaturwerte mit vergleichbarer Instrumentation.^[152-155,159]

Da die Nachweis- und Bestimmungsgrenze stark von der Alterung des Graphitrohrs abhängig sind, unterliegen diese Werte starker Variation. Daher wird als wichtiger Parameter der Qualitätskontrolle durch die Software des Spektrometers bei der Erstellung der Kalibriergeraden die charakteristische Konzentration bestimmt. Sie ist definiert als die Konzentration, bei der die Absorption 0,0044 (entsprechend 1% Absorption) gemessen wird. Die charakteristische Konzentration für die Kalibrierung zu diesem Versuch wurde mit 0,0045mg/l Pt bzw. einer Masse von 0,09ng Pt errechnet. Dieser Wert war repräsentativ für die im Laufe der Promotionsarbeit erhaltenden Werte. So wurden je nach Alterung des Graphitrohres Werte für die charakteristische Platinkonzentration im Bereich von 0,0029mg/l und 0,0061mg/l Pt erhalten.

3.2 Proteinbindung an das humane Serumalbumin (HSA)

Die meisten platinhaltigen Zytostatika sind relativ lipophil und durch schwefelhaltige Nukleophile schnell inaktivierbar. Da die Applikation dieser Verbindungen in der Regel intravenös erfolgt, ist für das Verhalten der Verbindungen gegenüber den Proteinen des Blutes essentiell. Außerdem rührt eine Reihe von Nebenwirkungen auf unerwünschte Wechselwirkungen mit Proteinen her.^[15,21]

Serumalbumine stellen die größte Proteinfraction des Blutplasmas. Ihre biologische Funktion besteht im Transport von lipophilen Stoffen, insbesondere von Fettsäuren. Die Bindungsstellen werden aber auch von lipophilen Arzneistoffen wie Propranolol und Verapamil genutzt.^[166-168]

Die irreversible Bindung von Cisplatin am humanen Serumalbumin wurde schon eingehend untersucht. Die Bindung erfolgte bevorzugt an der freien Thiolgruppe des Cys34^[169,170], aber auch eine starke Involvierung der Thioethergruppen der 6 Methioninreste (Met87, 123, 298, 329, 446 und 548) wird gefunden.^[21]

3.2.1 Angewandte Methoden

Es wurden 40mg/ml humanes Serumalbumin (HSA) in Dulbeccos Puffer gelöst. Das entspricht der Konzentration in humanem Blutplasma und diente somit als vereinfachtes

Modell für die Proteinbindung im menschlichen Blutplasma. Hierzu wurden die gelösten Platinkomplexe (Cisplatin, Carboplatin und **m-4F-PtCl₂**) gegeben und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquote entnommen und mit unterschiedlichen Methoden die Proteinbindung der Platinkomplexe bestimmt. Die folgenden vier Methoden werden in der Literatur zur Bestimmung der freien bzw. der gebundenen Platinverbindung eingesetzt. Zur Bestimmung der Proteinbindungen von Cisplatin und Carboplatin werden mit diesen Methoden ähnliche Ergebnisse erhalten.^[171]

3.2.1.1 Ultrafiltration zur Abtrennung des Proteins

Bei der Ultrafiltration wird die Probe durch äußeren Zwang (Zentrifugalkraft/ Pumpe) gegen eine Membran bewegt. Diese Membran zeichnet sich durch eine eingeschränkte Durchlässigkeit für Makromoleküle aus, die ab einer bestimmten Molekulargewichtsobergrenze den Filter nicht mehr passieren können und damit zurückgehalten werden. In dieser Arbeit wurden Zentrifugalfilter mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze von 30kD verwendet. Somit ist die Porengröße deutlich größer als die Platinkomplexe. HSA besitzt ein Molekulargewicht von 60kD. Damit war die Molekulargewichtsobergrenze auch ausreichend kleiner als die Molekularmasse des Serumalbumins. Es musste ein ausreichender Sicherheitsfaktor eingehalten werden, da die Angabe der zurückgehaltenen Molekülgröße von perfekt globulären Molekülen ausgeht.^[172,173]

3.2.1.2 Präzipitation des Proteins mit Trichloressigsäure (TCA)

Trichloressigsäure ist ein sehr stark denaturierendes Proteinfällungsreagenz. Einem Aliquot Probe wurde dasselbe Volumen eiskalter Trichloressigsäure (20%^{w/w}) hinzugefügt und nach kurzer Zeit wurde das denaturierte Protein abzentrifugiert und der Platingehalt im Überstand bestimmt.^[171,174]

3.2.1.3 Präzipitation des Proteins mit Ethanol

Die Proteinfällung mit Ethanol ist eine in der Plasmaproteingewinnung schon lange angewendete und noch heute sehr gebräuchliche Methode. Sie zeichnet sich vor allem

dadurch aus, dass die erhaltenen Proteinfractionen kaum denaturiert sind und deshalb nach Entfernung des Ethanol gut wieder in Lösung gebracht werden können.^[175,176]

Bei dieser Methode wurden einem Volumenteil Probe zwei Volumenteile kalter absoluter Ethanol hinzugefügt. Nach Lagerung über Nacht bei -20°C wurde das Präzipitat abzentrifugiert und der Platingehalt im Überstand bestimmt.

3.2.1.4 Trennung von gebundener und ungebundener Platinspezies mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der Größenausschlusschromatographie findet die Trennung an einem porösen Träger statt, der idealerweise keine Wechselwirkungen mit den Analyten eingeht. Die Trennung findet hierbei über die Molekülgröße statt. Teilchen, die größer als die größten Poren sind, durchlaufen nur das kleine Volumen außerhalb der Partikel. Sie werden also nur mit diesem Volumen eluiert. Sehr kleine Teilchen hingegen können in jede Pore des Materials gelangen und müssen das gesamte Volumen durchqueren. Daher eluieren sie erst mit dem Gesamtvolumen der Säule. Zwischen diesen beiden Extremen erfolgt eine Trennung nach der Molekülgröße. Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine Denaturierung der Proteine erfolgt. Eine weitere Bindung der Platinverbindungen nach der Inkubationszeit an das Protein ist ebenfalls durch die schnelle Trennung nach dem Auftragen auf die Säule ausgeschlossen. Ferner ist bei komplexeren Proben auch eine Trennung verschieden großer Proteine möglich, um genauere Bindungsprofile zu erstellen. Für die hier beschriebenen Versuche wurde ein Sephadexmaterial gewählt, das Moleküle bis zu einer Größe von 50kD auftrennt. Hierbei wird das Serumalbumin mit einer Größe von 60kD nicht retentiert, während die Platinkomplexe so klein sind, dass sie das gesamte Säulenvolumen durchlaufen müssen (siehe Abb. 3.4). Somit sollte zwischen den beiden Analyten eine maximal mögliche Trennung erfolgen^[177].

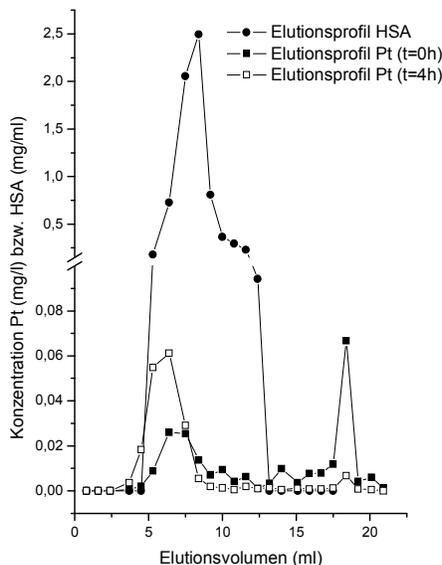


Abb. 3.4 Elutionsprofile des HSA und des Platins im Laufe einer Proteinbindung von **m-4F-Pt-Cl₂** zum Startzeitpunkt nach 4 Stunden Inkubation

Bei der Durchführung wurde ein Aliquot der Probe auf die Säule gegeben und mit Wasser eluiert. In den gesammelten Fraktionen wurden der Platin- und der Proteingehalt bestimmt.

3.2.2 Vergleich der erhaltenen Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Proteinbindung

3.2.2.1 Bestimmung der Wiederfindung der Platinverbindungen aus der HSA-Lösung

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob mit den oben vorgestellten Trennmethoden ähnliche Ergebnisse für die Proteinbindung von **m-4F-Pt-Cl₂** erhalten werden, wie dies bei Cisplatin und Carboplatin berichtet wird. Für alle drei Platinverbindungen wurde die Wiederfindung mit diesen Methoden direkt nach der Substanzzugabe bestimmt. Hierzu wurde zum Startzeitpunkt der Inkubation die Konzentration des ungebundenen Platins bestimmt und zu der Gesamtplatin-Konzentration in Beziehung gesetzt (siehe Tab. 3.2).

getestete Substanz	Wiederfindung Ultrafiltration [%]	Wiederfindung TCA-Präzipitation [%]	Wiederfindung Ethanol-Präzipitation [%]	Wiederfindung SEC [%]
Cisplatin	81	84	81	73
Carboplatin	80	77	86	93
m-4F-Pt-Cl₂	48	27	74	55

Tab. 3.2 Wiederfindungen verschiedener Platinkomplexe bei Verwendung verschiedener Methoden

Für die beiden Standardverbindungen Cisplatin und Carboplatin wurden für die Wiederfindungen zwischen den einzelnen Methoden kaum Unterschiede gefunden. Sowohl die absoluten Wiederfindungen als auch die Vergleichbarkeit der Methoden stimmten größtenteils mit den schon publizierten Ergebnissen überein.^[157,171,174] Für die Verbindung **m-4F-Pt-Cl₂** wurde bisher nur die Wiederfindung per Ultrafiltration publiziert.^[157] Da diese Verbindung im Vergleich zu Cisplatin einen deutlich lipophileren Neutralliganden aufweist, wird die deutlich verringerte Wiederfindung auf lipophile Interaktionen mit dem Protein zurückgeführt. Das lässt sich jedoch durch Hitzedenaturierung und Dialyse nicht zeigen.^[157] Bei der Ethanol-fällung hingegen resultiert eine deutlich lipophilere äußere Phase um das Albumin, so dass locker lipophil gebundene Verbindungen desorbiert werden können. Dieser Effekt konnte bei dieser Verbindung gut beobachtet werden, so dass bei der Ethanol-fällung ähnliche Wiederfindungen wie für das Cisplatin gefunden wurden. Bei der Anwendung der TCA-Fällung hingegen wurde eine niedrigere Wiederfindung erhalten. Da bei der drastischen Denaturierung durch TCA auch lipophilere Innenbereiche des Proteins nach außen präsentiert werden, kann an ihnen vermehrt Analyt adsorbiert werden. Die mit der SEC bestimmte Wiederfindung für **m-4F-Pt-Cl₂** entsprach den Werten, die mit der Ultrafiltration erhalten wurden.

3.2.2.2 Restproteingehalte in den Messlösungen

Da keine Trennmethode das Protein restlos abzutrennen vermag, verbleibt eine kleine Menge Protein (Restprotein) in der Analysenlösung. Das an dem Restprotein gebundene

Platin wird bei der nachfolgenden AAS-Messung genauso wie das ungebundene Platin erfasst. Daher muss die vorgeschaltete Proteinabtrennung möglichst effizient sein. Deswegen wird im Folgenden der Restproteingehalt nach Durchführung der Trennoperationen bestimmt.

Hierzu wurden die Ultrafiltrate, die Präzipitationsüberstände und die späten SEC-Fractionen mit der Methode nach Bradford (siehe Kap. 8.3.4) auf den Proteingehalt getestet. Kalibriert wurde mit einer HSA-Lösung im Bereich von 0,1-1mg/ml.

	Ultrafiltration	TCA-Präzipitation	Ethanol-Präzipitation	SEC
Restprotein- gehalt [%]	0,014±0,007	0,0011±0,0004	0,36±0,07	0,69±0,17

Tab. 3.3 Restproteingehalt nach Durchführung der Trennung von Protein und freier Platinverbindung (n=6-30)

Die Effizienz der Proteinabtrennung zeigte deutliche Unterschiede (siehe Tab. 3.3): Während die Ultrafiltrate und die Überstände der TCA-Präzipitation kaum nachweisbare Mengen Protein aufwiesen, wurden in den Überständen der Ethanol-Fällung und den SEC-Fractionen recht hohe Proteingehalte gefunden. Da bei zeitlichen Inkubationen das am Restprotein gebundene Platin zu späteren Zeitpunkten (>4h) einen großen Anteil am gemessenen Gesamtplatin ausmachte, war die Proteinmenge in den SEC-Fractionen kaum akzeptabel.

3.2.2.3 Kinetik der Abnahme der ungebundenen Platinkomplexe

Die freie Konzentration an Platinverbindung wird nicht nur durch die Spontanbindung bei Substanzzugabe an Serumalbumin reduziert. Über die Zeit erfolgt auch eine irreversible Bindung des Platinkomplexes an Schwefelnukleophile in Proteinen wie HSA und Glutathion. Um verschiedene Platinkomplexe in ihrem Proteinbindungsverhalten vergleichen und beurteilen zu können, reicht es daher nicht aus, nur die Wiederfindungen zu bestimmen. Es musste ebenfalls eine Betrachtung der kinetischen Charakteristika der irreversiblen Bindung erfolgen. Die Inaktivierung durch die Schwefelatome der Cystein- bzw. der Methioninreste des HSA als weiche Nukleophile wird als überwiegend direkte

Reaktion mit Cisplatin beschrieben. Bei einem deutlichen Überschuss an HSA, wie bei dem hier beschriebenen Modell, war daher eine Kinetik pseudo-erster Ordnung zu erwarten.^[178] Kinetiken pseudo-erster Ordnung zeichnen sich wie Kinetiken erster Ordnung, deren bekanntester Vertreter der radioaktive Zerfall darstellt, durch eine exponentielle Abnahme der freien Stoffmenge aus.

Um diese Hypothese zu testen, wurden für alle drei Platinkomplexe Proteinbindungskinetiken aufgenommen.

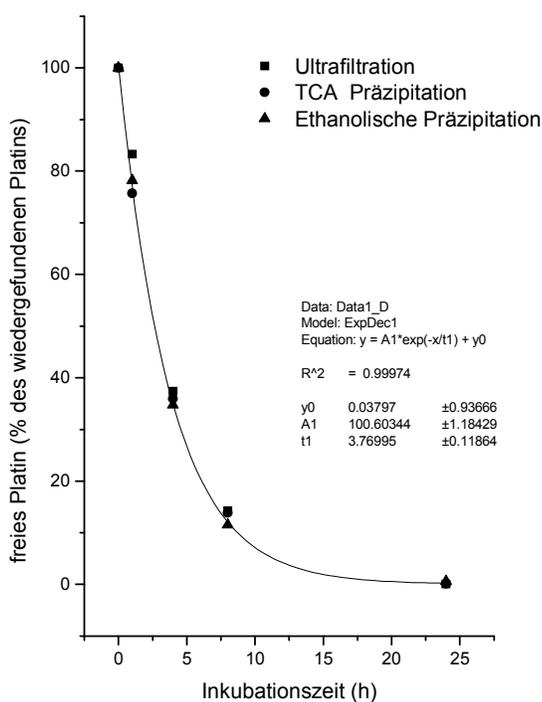


Abb. 3.5 Bindungskinetik von Cisplatin an das HSA mit verschiedenen Methoden bestimmt

Für Cisplatin zeigten die Proteinbindungskinetiken (siehe Abb. 3.5) mit keiner Methode einen signifikanten Unterschied. Die exponentielle Regression der Datenpunkte stellte sich als geeignet zur Beschreibung der Kinetik heraus.

Bei der Bestimmung der Kinetiken für Carboplatin konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den verwendeten Methoden gefunden werden. Die Reaktivität wurde jedoch durch die chelatisierende Dicarbonsäure derart stark gesenkt, dass im gleichen Zeitraum

nur eine geringe Abnahme der freien Platinverbindung zu beobachten war. Erst bei längerer Inkubation war eine signifikante Abnahme zu beobachten (20% nach 24h).

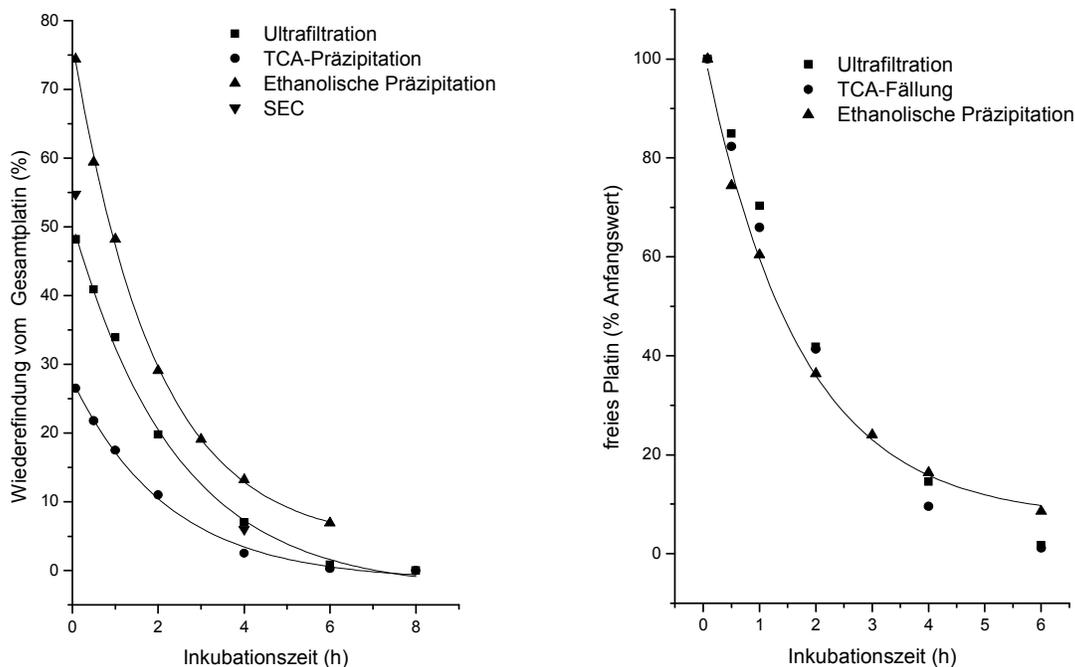


Abb. 3.6 nicht normierte (links) und normierte (rechts) Bindungskinetikvergleiche von **m-4F-Pt-Cl₂** mit HSA (für die Regression von SEC-Daten waren zu wenige Punkte vorhanden)

Für die Verbindung **m-4F-Pt-Cl₂**, die sich vom Cisplatin durch den Neutralliganden unterscheidet, fanden sich, wie bei den Wiederfindungen schon diskutiert, zwischen den Methoden sehr deutlich Unterschiede. Es wurden drei verschiedene Kurven erhalten, die sich aber alle durch exponentielle Regression anpassen ließen (siehe Abb. 3.6 links). Dabei ergaben die Werte aus den SEC- und den Ultrafiltrationsversuchen eine identische Kurve. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden die Kinetiken auf 100% Anfangswiederfindung normiert. Durch diese Operation erhielt man identische Kurvenverläufe (siehe Abb. 3.6 rechts). Obwohl bei der ethanolischen Fällung auch lipophil an das HSA gebundene Anteile als freier Anteil gemessen wurden, zeigte sich kein Unterschied in der Kinetik zu den Methoden der Ultrafiltration und der SEC, die den Verteilungskoeffizienten nicht beeinflussen. Das ist ein Indiz für das reversible Gleichgewicht, in dem das im Überstand der ethanolischen Präzipitation gefundene freie Platin sich

befindet, obwohl Teile lipophil an das HSA gebunden werden (siehe Differenz zwischen den Wiederfindungen der Ultrafiltration und ethanolischer Präzipitation Tab. 3.2).

3.2.3 Zusammenfassung des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Proteinbindung

Es wurden vier verschiedene Methoden zur Bestimmung der Proteinbindung von Platinverbindungen vorgestellt. Während für Cisplatin die Methoden gleichwertige Ergebnisse erbrachten, trat ein deutlicher Unterschied in der Wiederfindung für die Verbindung **m-4F-Pt-Cl₂** auf, die einen lipophilen Neutralliganden trägt (siehe Kap. 3.2.2.1). Hierbei war man mit der Ultrafiltration und der SEC in der Lage, die in der wässrigen Phase gelöste Verbindung zu bestimmen. Aufgrund des deutlichen Unterschiedes in der Durchführungszeit (Ultrafiltration 5min/SEC >>2h) wurde im weiteren Verlauf für diese Bestimmung die Ultrafiltration genutzt. Die ethanolische Präzipitation dagegen erfasste zusätzlich lipophil gebundene Anteile. Bei Verbindungen, die eine nennenswerte hydrophobe Interaktion mit dem HSA aufweisen, stellte der Unterschied zwischen der Wiederfindung von Ultrafiltration bzw. der ethanolischen Präzipitation ein Maß für den Anteil von reversibel lipophil gebundener Verbindung dar.

Zur Bestimmung des kinetischen Verlaufs eigneten sich prinzipiell alle vier Methoden. Mit diesen Methoden wurden für Platinverbindungen sehr ähnliche Kinetiken für die irreversible Bindung gefunden. Zur Entscheidung, welche Methode dafür zu verwenden ist, wurden verschiedene Kriterien herangezogen: Während der Zeitaufwand zur Durchführung der SEC für eine Hochdurchsatzanalytik bei weitem zu hoch war, zeichneten sich die anderen drei Methoden durch vergleichbar kurze Analysenzeiten aus. Die Präzipitationsmethoden haben den Vorteil, dass die Reagenzien preisgünstig sind, während bei der Ultrafiltration größere Materialkosten anfallen. Bei den Präzipitationsmethoden zeigt die ethanolische Präzipitation die deutlich höhere Wiederfindung. Dies bedingt höhere Platingehalte in den Messlösungen, was die atomabsorptionsspektroskopische Bestimmung aussagekräftiger macht.

Im Folgenden wurde also die ethanolische Präzipitation zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die irreversible Proteinbindung genutzt. Hierbei wurde in Kauf genommen, dass bei sehr niedrigen Platingehalten ein großer Fehler durch relativ große Restproteinmengen resultierte. Diese Zeitpunkte fanden daher in der Regel bei der Regression keine Berücksichtigung. Ein zweiter Nachteil, der Berücksichtigung finden musste, ist die relativ hohe Flüchtigkeit von Ethanol, so dass die Proben erst kurz vor der Messung in den Autosampler der AAS gestellt werden konnten.

3.3 Optimierung der Zellaufnahmebestimmung

Der erste Schritt an ihren Wirkort, die DNA, zu gelangen, ist für platinhaltige Zytostatika die Aufnahme in die Zelle. Das kann über passive Diffusion, endozytotische Aufnahme und aktiven Transport geschehen. Um Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Platinverbindungen aufstellen zu können, ist es notwendig, auch ihren Gehalt in den Zielzellen zu kennen. Ferner ist es interessant zu sehen, wie sich der zelluläre Gehalt über die Zeit verhält. So kann man Hinweise über mögliche Aufnahmewege erhalten. Auch ob eine schnelle Adaption der Zellen an die Zytostatikaexposition durch erhöhten Efflux bzw. verringerten Influx erfolgt, kann daran erkannt werden.

In den Vorarbeiten von Koch^[157] und Sommer^[156] werden Zellen mit platin- und kobalthaltigen Metallkomplexen inkubiert, der Metallgehalt atomabsorptionsspektroskopisch bestimmt und auf den Proteingehalt als Maß für den Zellgehalt bezogen. Da die Proteinkonzentration und das Zellvolumen von MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen bekannt ist^[179], kann die zelluläre Konzentration der Metallkomplexe errechnet werden. Diese zelluläre Konzentration wurde im Folgenden zur besseren Vergleichbarkeit mit der Substanzkonzentration im Medium in Relation gesetzt. Diese Relation, hier Anreicherungsgrad (AG) genannt, errechnete sich nach: $AG = \frac{C(\text{intrazellulär})}{C(\text{Medium})}$

In den zuvor zitierten Arbeiten werden Zellkulturflaschen als Testgefäße verwendet. Dies ist für eine Hochdurchsatzmethode ungeeignet, die in gleicher Zeit eine höhere Probenmenge ermöglichen sollte. Daher wurde eine Methode angestrebt, bei der die Inkubation in 6-Loch-Platten erfolgen konnte. Dafür musste neben der Optimierung der

AAS-Methode (siehe Kap. 3.1) auch das Inkubationsmedium und die Zellernte optimiert werden.

3.3.1 Wahl des Mediums zur Zellaufnahme

Es wurden verschiedene Nährmedien zur Substanzzugabe verwendet, um den Effekt auf die Zellaufnahme bei MCF-7-Zellen zu untersuchen. Es wurde [rac-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) **r-4F-Pt-Cl₂** gegenüber dem korrespondierenden meso-konfigurierten Komplex der Vorzug gegeben, da sie bei den Versuchen von Koch^[157] eine große Anreicherung aufweisen. In den jeweiligen Nährmedien (Basalmedium (EMEM ohne Proteinzusätze), EMEM mit 10% fetalen Kalbsserum (FCS) und EMEM mit 40 mg/ml HSA-Zusatz) wurde eine 5 μ M Lösung eingestellt.

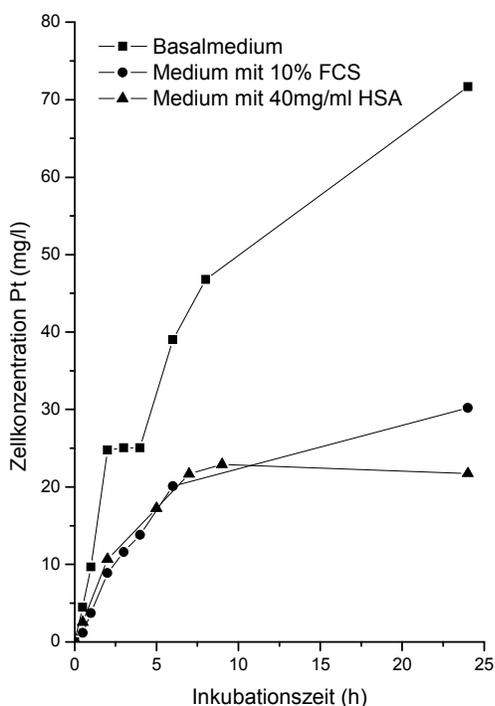


Abb. 3.7 Aufnahmekinetiken von **r-4F-Pt-Cl₂** in verschiedenen Inkubationsmedien

Während die Zellaufnahme aus proteinzusatzfreiem Medium einen langsam abflachenden Verlauf zeigte (siehe Abb. 3.7), trat bei den beiden proteinhaltigen Medien nach anfänglich ähnlicher Aufnahmegeschwindigkeit eine schnelle Abflachung der Zellaufnahmegeschwindigkeit ein. Dieses deutete auf eine Verarmung an frei verfügbarer

Verbindung im Medium hin. Dieses wurde durch die Proteinbindungsversuche bestätigt, bei denen nach 8 Stunden keine freie Verbindung gefunden wurde (siehe Kap. 4.1.1). Da nach 8 Stunden kaum eine Zunahme an zellulären Gehalt zu finden war, kann gefolgert werden, dass an Serumproteine gebundene Platinverbindungen kein Reservoir für die Zellaufnahme darstellen.

Der FCS-Zusatz ist für das Zellwachstum notwendig, da hierbei verschiedene Wachstumsfaktoren zugeführt werden. Trotzdem zeigten die MCF-7 Zellen nach 30 Stunden in FCS freien Medium eine normale Zellmorphologie und sogar Zellwachstum. Daher wurde zur Vermeidung der Konkurrenzreaktion der Proteinbindung in den weiteren Versuchen die Substanzzugabe in Basalmedium d.h. EMEM-Medium ohne Protein-zusätze durchgeführt.

Als positiver Effekt der resultierenden, deutlich höheren Zellaufnahme wurde in der AAS-Analytik eine höhere Empfindlichkeit erreicht, so dass die Inkubationskonzentrationen in einem physiologischen Bereich belassen werden konnten. So wurde häufig in der Literatur bei Cisplatin mit Konzentrationen von deutlich über $50\mu\text{M}$ gearbeitet^[57,58,151], obwohl die therapeutisch relevante Konzentration sich in der Regel im unteren mikromolaren Bereich ($<5\mu\text{M}$) befindet.^[21]

3.3.2 Optimierung der Zellernte nach der Inkubation

Nach der Inkubation mit dem Platinkomplex musste die Inkubation abgestoppt werden, indem die Zellen vom substanzhaltigen Medium befreit werden. Dieses geschah durch Absaugen des alten Mediums und durch anschließendes Waschen der Zellen mit Phosphatbuffer (PBS). Im nächsten Schritt mussten die am Gefäßboden anhaftenden Zellen gelöst und zur Messung aufbereitet werden. Hier standen verschiedene Methoden zur Auswahl:

- *Trypsinieren der Zellen:* Hierbei wurde die die Zellen umgebende Extrazellulärmatrix mittels der Protease Trypsin soweit verdaut, dass diese den durch die Extrazellulärmatrix vermittelten Halt verloren und sich vom Gefäßboden mit PBS abspülen ließen.

- *Mechanisches Lösen der Zellen vom Gefäßboden:* Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden geschabt und z.B. in PBS aufgenommen.
- *Lyse der Zellen direkt im Kulturgefäß:* Dazu wurden die Zellen in einer hypotonischen Tritonlösung inkubiert, bis sie platzten. Um verbliebene Zellfragmente in Lösung zu bringen, wurde dann noch eine Ultraschallbehandlung mittels Sonotrode angeschlossen. Die Tritonlösung diente zum Solubilisieren der Zellmembranen und Zellproteine.

Diese drei Methoden wurden parallel mit MCF-7-Zellen durchgeführt, die sieben Stunden mit der Leitverbindung **m-4F-Pt-Cl₂** inkubiert worden waren. Beim Zellenabschaben und beim direkten Lösen mit Triton wurden gegenüber dem Trypsinieren stark erhöhte Werte gefunden, da bei den ersten beiden Methoden die Extrazellulärmatrix stark mitberücksichtigt wurde. Da diese ein Proteingeflecht darstellt, kann es dort zur Proteinbindung der Platinkomplexe kommen. Diese nicht zellassozierten Platingehalte wurden dann allerdings als intrazellulärer Platingehalt miterfasst. Beim Trypsinieren hingegen wurde die Extrazellulärmatrix verdaut und von den Zellen gewaschen. Somit spielte bei dieser Methode dieser Fehler eine geringere Rolle, so dass man niedrigere Gehalte erhielt. Eine Betrachtung der Standardabweichung erbrachte deutlich niedrigere Standardabweichungen für das Trypsinieren gegenüber den anderen Methoden. Daher wurden zur weiteren Optimierung der Methode die Zellen mittels Trypsinieren geerntet.

Die immer noch hohen Standardabweichungen bei den Zellaufnahmen warfen die Frage auf, inwiefern nicht inaktivierte Reste vom Trypsin die Bezugsgröße Proteingehalt als Maß für die Zellmenge verfälschten. Nach dem Trypsinieren und dem Aufnehmen in PBS wurde das erhaltene Zellpellet homogenisiert und der Proteingehalt nach unterschiedlichen Lagerzeiten bei Raumtemperatur bestimmt (siehe Abb. 3.8). Hierbei wurde eine starke Abnahme des Proteingehalts beobachtet (ca. 8%/h). Daher wurden zwei Wege eingeschlagen, um die Restaktivität des Trypsins zu unterbinden. Zum einen wurden die in PBS abgelösten Zellen noch zweimal mit PBS gespült. Zum anderen wurden die Zellen mit FCS-haltigen Medium abgelöst. Das FCS inaktiviert das Trypsin. Allerdings wird dabei auch Protein eingebracht, so dass auch hier die Zellen zweimal mit

PBS gewaschen werden mussten. Bei beiden Ansätzen war der Proteingehalt über 24 Stunden stabil (siehe Abb. 3.8).

Beim Vergleich der beiden Methoden untereinander wiesen die Pellets nach der Ernte mit FCS-haltigen Medium die vorteilhafteren Eigenschaften auf. Sie hafteten besser an den Gefäßwandungen, so dass beim Absaugen der überstehenden Lösung seltener Verluste von Zellen auftraten. Zum anderen ließen sich die Zellen auch besser wieder resuspendieren, was den Waschvorgang deutlich erleichterte. Dadurch wurde eine höhere Zellausbeute erreicht, was sich an den stark erhöhten Protein- und Platinwerten ablesen ließ. Daher wurden die trypsinisierten Zellen im Folgenden mit FCS-haltigen Medium abgelöst.

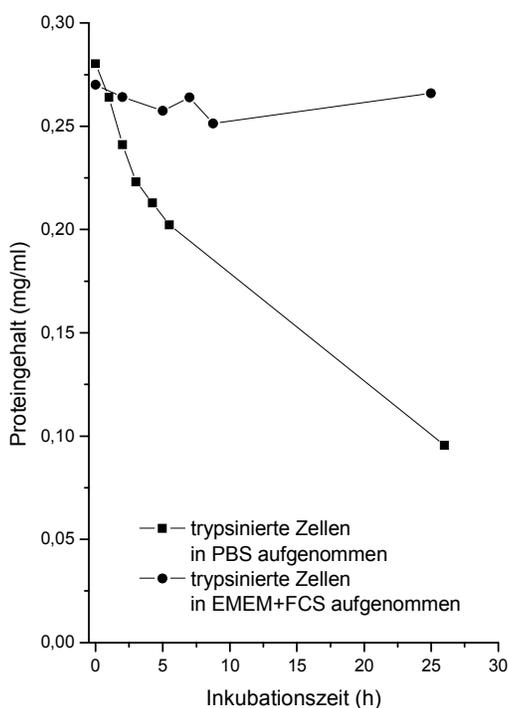


Abb. 3.8 Trypsinaktivität in den Zelllysaten bei unterschiedlichen Aufarbeitungsprotokollen

Um die Präzision der erhaltenen Werte bei verschiedenen Zellgehalten zu bestimmen, wurde eine zeitliche Inkubation mit **m-4F-Pt-Cl₂** (5 μ M) durchgeführt (siehe Tab. 3.4). Hierbei wurde eine zeitabhängige Sechsfachbestimmung durchgeführt, um eine repräsentative Datenmenge zu erhalten.

Außer bei dem niedrigsten Platingehalt wurde eine relative Standardabweichung von 10% kaum überschritten. Da das Endergebnis der Zellgehaltsbestimmung aus der Kombination zweier verschiedener Messungen resultierte, flossen im Besonderen die zufälligen Fehler beider Messungen in das Ergebnis ein. Die Messungsgenauigkeit der AAS-Methode liegt bei 1-2%. Der zufällige Fehler der Proteinbestimmung wurde in zwei unabhängigen Versuchen (n=20) mit 4,5 bzw. 5,5% ermittelt. Somit lag der Fehler, der aus der Zellkultur und der Aufarbeitung der Zellen resultierte, deutlich unter 10%.

Inkubationsdauer [h]	Mittelwert Zellgehalt [mg Pt/l]	Rel. Standardabweichung [%]
1	1,8	16,4
2	3,1	5,5
4	7,0	3,9
6	10,1	7,6
8	9,5	11,1
10	11,4	6,4
24	18,8	5,8
30,3	21,6	9,9

Tab. 3.4 Zeitabhängige Zellaufnahme von **m-4F-Pt-Cl₂** in MCF-7-Zellen (n=6)

3.3.3 Standardisierung der Zellaufnahme

Um die erhaltenen Werte beurteilen und mit anderen Versuchen vergleichen zu können, musste der Test noch standardisiert werden. Da sowohl die Kulturdauer als auch die Zelldichte einen großen Einfluss auf das Ansprechverhalten der Zellen haben, wurden nur Zellen zur Testung eingesetzt, die 5 Tage lang gewachsen waren und dabei 50-70% des zur Verfügung stehenden Gefäßbodens bewachsen hatten. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine 6-Loch-Platte mit Cisplatin 24 Stunden lang inkubiert und wie im Hauptversuch aufgearbeitet. Für die Cisplatinkontrolle wurde in der Regel in Übereinstimmung mit der Literatur^[16] eine 2,1-2,5fache Anreicherung gegenüber dem Außenmedium gefunden. Wurde ein Anreicherungsgrad von 2,0 unterschritten, so wurde der Test verworfen.

3.4 Bestimmung des Platingehalts in den Kernen

Nach dem Eintritt der Platinkomplexe in die Zelle müssen diese den Zellkern erreichen, um mit der DNA interagieren zu können. Hier sind einige Hindernisse zu überwinden. Für Stoffe, die endozytotisch aufgenommen werden, stellt sich das Problem, dass sie überhaupt ins Zytoplasma gelangen und nicht direkt exozytotisch wieder aus der Zelle ausgeschieden werden. Für Stoffe, die eine sehr hohe Lipophilie aufweisen, ist eine Bindung an den Außenmembranen und den ausladenden Membransystemen des Endoplasmatischen Reticulums denkbar. Ferner ist die Bindung an Proteine im Zytoplasma ein generelles Problem. Bisher sind nur wenige Untersuchungen zur Lokalisation von schwermetallhaltigen Verbindungen im Zellkern literaturbekannt.^[150,180]

Zur Optimierung der Methode zur Kerngehaltssbestimmung wurde auf zwei Literaturstellen zurückgegriffen, in denen die Zellen mit hypotonischem Puffer aufgequollen und dann mit mechanischer Arbeit zerstört werden.^[181,182] Zur Prozesskontrolle wurde ein kleines Aliquot (ca. 10µl) der Zellsuspension (MCF-7-Zellen) im jeweiligen Aufarbeitungsschritt auf einen Objektträger gebracht und sofort im Mikroskop betrachtet. Bei der Inkubation im hypotonischen Puffer wurde innerhalb von 5 Minuten eine sehr schnelle Schwellung der Zellen beobachtet. Inkubationszeiten über 10 Minuten führten zum Platzen der Zellen auch ohne äußere Einwirkung. Um mechanische Arbeit auf die Zellen auszuüben, standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen das Auf- und Abziehen durch eine Spritzenkanüle und zum anderen das intensive Schütteln mittels Vortex. Beide Methoden zeigten sich als geeignet, um die Zellen zum Platzen zu bringen, das Schütteln jedoch ermöglichte einen deutlich höheren Probendurchsatz.

Dann wurden analog der beiden literaturbekannten Methoden nacheinander zwei Detergentien zugegeben. Als erstes wird ein nichtionisches Tensidgemisch, Nonidet[®], hinzugegeben, dann wird das anionische Tensid Desoxychololat zugefügt. Das soll zur Entfernung der am Kern anhaftenden zytosolischen Komponenten dienen.^[181,182] Während die Einwirkung von Nonidet[®] die Kernmorphologie nicht beeinträchtigte, bewirkte Desoxycholololat eine Verklumpung der Kerne.

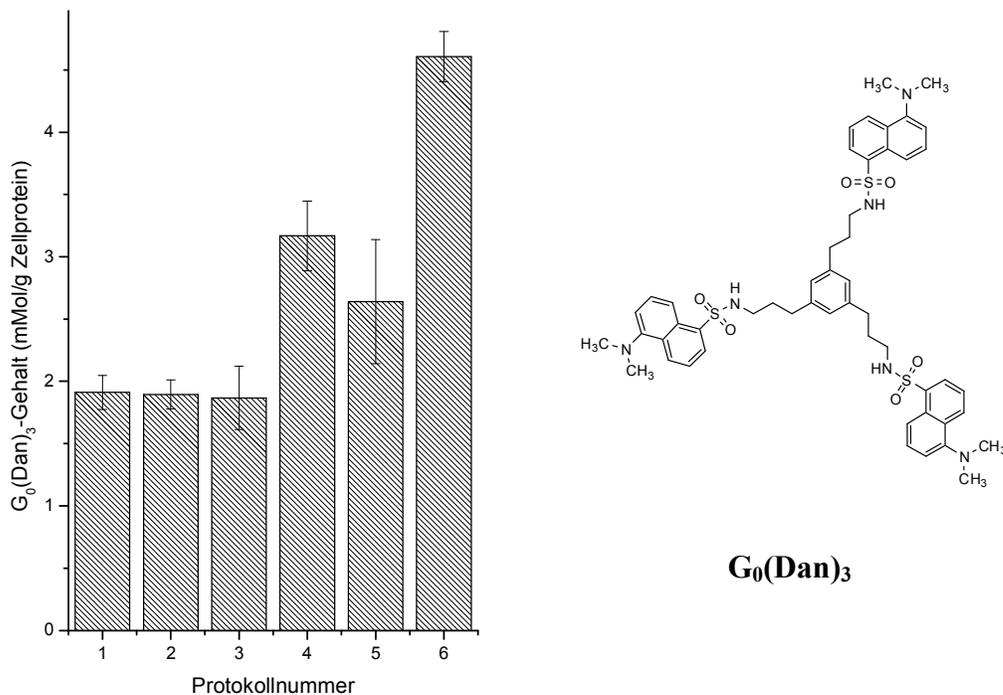


Abb. 3.9 Einfluss verschiedener Kernisolationsprotokolle auf den **G₀(Dan)₃**-Gehalts im Kern: Protokolle 1-3 steigende Einwirkdauer Nonidet[®] (5, 10, 15 min) / Protokolle 4-6 konstanter Nonidet[®]-Gehalt (1% bei 5min Einwirkdauer) bei steigendem Desoxycholat-Gehalt und steigender Inkubationsdauer (0,25% und 5 min, 0,5% und 5 min, 0,5% und 15 min) (n=3)

Um die nötige Einwirkdauer und die Notwendigkeit des Detergenzes Desoxycholat zu bestimmen, wurde ein Stoff gesucht, der entweder sehr stark im Kern eingelagert wird bzw. sich kaum im Kern einlagert. Bei unvollständiger Entfernung der zytosolischen Komponenten würde dann ein erniedrigter bzw. erhöhter Gehalt dieses Stoffes in den Kernen gefunden werden. Hier fiel die Wahl auf **G₀(Dan)₃** (siehe Abb. 3.9), das mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie außerhalb des Zellkerns lokalisiert wurde.^[109,183] Verschiedene Isolierungsprotokolle wurden nach Substanzeinwirkung durchgeführt und der Fluorophorgehalt pro Protein bestimmt. Wie in Abb. 3.9 dargestellt, änderte sich der Fluorophorgehalt bei unterschiedlicher Einwirkdauer von Nonidet[®] nicht. Das Hinzufügen von Desoxycholat hingegen führte zu einem deutlichen Anstieg des Fluorophorgehalts, der mit einer deutlich größeren Standardabweichung behaftet war. Das Zusammenklumpen führte augenscheinlich zu einem Einschluss von fluorophorhaltigem Zytosol. Da der Aufschluss dieser Aggregate unterschiedlich verlief, kam es zu den

großen Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen. Daher wurde auf die Verwendung von Desoxycholat verzichtet und die Einwirkdauer des Nonidet® von 5 Minuten beibehalten.

Zur weiteren Aufreinigung der Kerne nach der Zellyse wird ein Saccharose-Stufengradient in der Literatur vorgeschlagen. Hierbei wird das Rohkernpellet in 0,25M Saccharoselösung aufgenommen und über eine 0,88M Saccharoselösung geschichtet. Beim Zentrifugieren dieses Dichtegradienten sind die Kerne als Einzige in der Lage zu sedimentieren, da sie die Zellkompartimente mit der höchsten Dichte darstellen. Verunreinigungen wie nicht lysierte Zellen und Zelltrümmer werden nicht über die Stufe befördert. Diese Aufreinigung stellte sich als praktikabel und sinnvoll heraus, so dass sie beibehalten wurde. Allerdings mussten die erhaltenen Kerne noch von der Saccharose-Lösung befreit werden, da diese durch die große Menge der Kohlenstoffverbindung Saccharose eine immense Störung für die AAS-Messung darstellt.

3.5 Bestimmung des Bindungsvermögens von Platinverbindungen an DNA

Für die Beurteilung des Bindungsvermögens von Platinkomplexen an die DNA sind viele verschiedene Methoden berichtet worden.^[150,184-188] In dieser Arbeit wurden im Folgenden Untersuchungen zur quantitativen Bindung an isolierter DNA, zur Veränderung des Schmelzpunktes der DNA nach Bindung von Platinwirkstoffen und zur Quantifizierung der DNA-Bindung in Zellen durchgeführt.

3.5.1 Quantitative Bindung von Platinverbindungen an isolierter DNA

Dazu wurde die DNA mit den betreffenden Platinkomplexen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquote entnommen. Die DNA und die daran gebundenen Komplexe wurden mittels ethanolischer Fällung präzipitiert und der ungebunden vorliegende Platinkomplex-Anteil im Überstand wurde atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt. Analog der Proteinbindung sollte die Abnahme an freiem Komplex beobachtet und die erhaltenen Datenpunkte einer Regression unterzogen werden. Anders als schwefelhaltige Nukleophile reagieren die DNA-Basen erst nach Hydrolyse der Komplexe, die einer Kinetik 1. Ordnung folgt (siehe Kapitel 1.2.1).^[178]

Als Modellverbindung wurde Cisplatin verwendet. Da eine starke pH-Wert-Abhängigkeit für die Bindung von Cisplatin an die DNA berichtet wird^[184], wurde die Bindungen bei pH6,8 und bei pH7,3 durchgeführt.

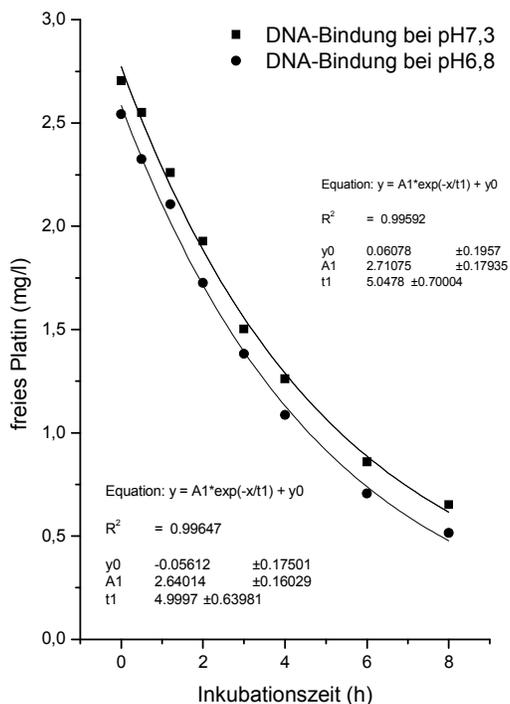


Abb. 3.10 DNA-Bindung von Cisplatin bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Abnahme des Platinegehalts im Überstand ließ sich wie bei den Proteinbindungen gut exponentiell anpassen (siehe Abb. 3.10). Der pH-Wert zeigte im Widerspruch zur zitierten Literatur kaum Auswirkung (2-3%) auf die DNA-Bindung.

Diese Methode sollte angewandt werden, um die Bindung der in Kapitel.4.2 und Kapitel 5.1 beschriebenen Komplexe kinetisch zu untersuchen. Als Vorversuch wurde **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** (siehe Abb. 3.11) mit der DNA inkubiert. Diese Verbindung kann, wie alle Verbindungen in Kapitel 5.1 vorgestellten Verbindungen, neben kovalenten auch elektrostatische Bindungen zur DNA ausbilden. Sie stellt in dieser Reihe den Extremfall dar, da sie acht positive Ladungen aufweist. Abb. 3.11 stellt die erhaltene Kinetik dar. Neben einer hohen Spontanbindung von 75% wurde eine nicht eindeutig anpassbare Kinetik erhalten; d.h. nach einer kurzen Zeit eines schnellen Abfalls der freien

Platinverbindung wurde eine sich verlangsamende Reaktion beobachtet. Hier spielten offensichtlich elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Polyanion DNA eine starke Rolle, die die kovalente Bindung an die DNA überdeckten. Daher wurde diese Methode nicht für die in Kapitel 5.1 vorgestellten Verbindung eingesetzt.

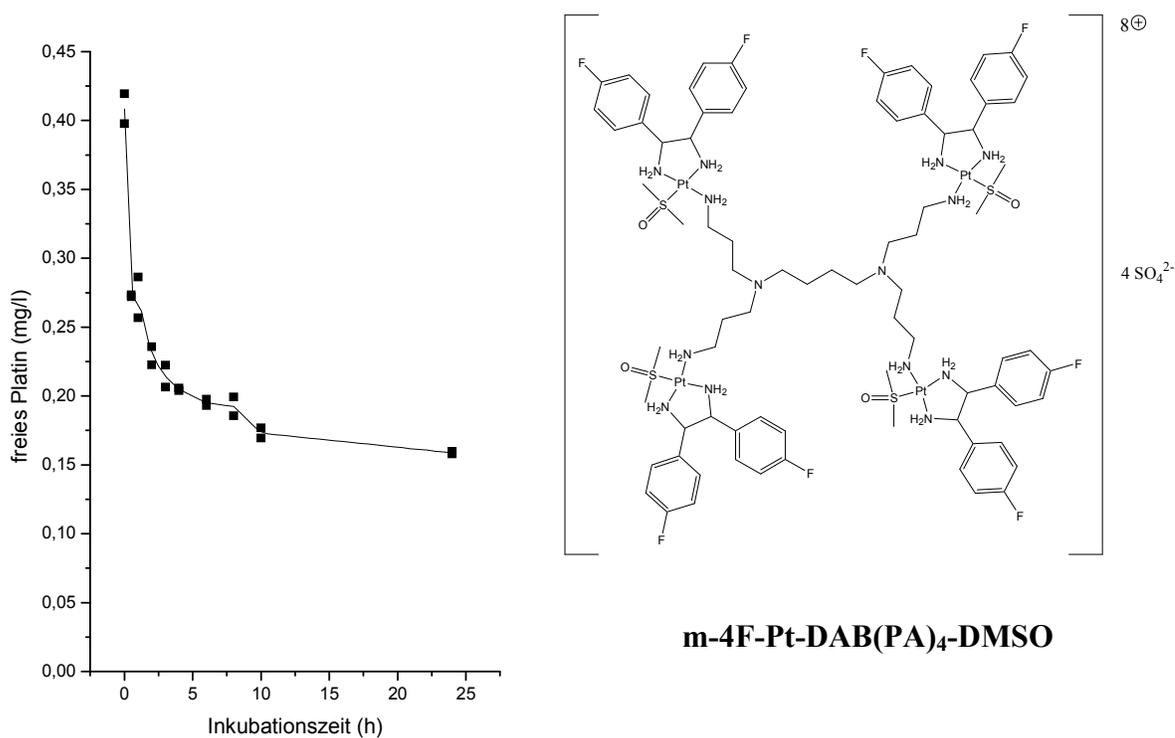


Abb. 3.11 DNA-Bindung von m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO an isolierter DNA

3.5.2 Schmelzpunktänderung der DNA durch Substanzeinwirkung

Unter dem Schmelzpunkt der DNA versteht man den Konformationsübergang der DNA bei steigender Temperatur von einer helikalen Struktur zu einer ungeordneten *random-coil*-Struktur. Diese Veränderung geht mit einer starken Extinktionszunahme bei $\lambda=260\text{nm}$ einher. Dieser Vorgang lässt sich analog einer Schmelzkurve beschreiben, wobei der Wendepunkt bei 50% Extinktionszuwachs als Schmelzpunkt bezeichnet wird.^[189]

Das Einwirken von konventionellen Platinverbindungen auf die DNA führt zur Bindung an die Nukleobasen und damit einhergehend zu einer Veränderung der

Schmelztemperatur. Zwei Effekte sind dafür verantwortlich. Die bifunktionelle Bindung an die DNA führt zu einer Aufwindung der DNA und damit zu einer Schwächung der helikalen Struktur, so dass das Schmelzen schon bei niedrigerer Temperatur einsetzt.^[185] Als gegenläufiger Effekt wird bei der Bindung an die DNA ein permanentes Kation an der Base erzeugt, das mit dem Phosphatrückgrat in Wechselwirkung tritt. Dadurch wird die helikale Struktur gefestigt und das Schmelzen setzt später ein.^[185] Dieser Effekt lässt sich allerdings durch eine Erhöhung der Ionenstärke im Inkubationspuffer aufheben.^[185,190] Für planare Platinkomplexe wäre auch eine Interkalation zwischen die DNA-Basen in der Helix denkbar, die dann zu einer Stabilisierung führt und mit einer Schmelzpunkterhöhung einherginge.^[191,192]

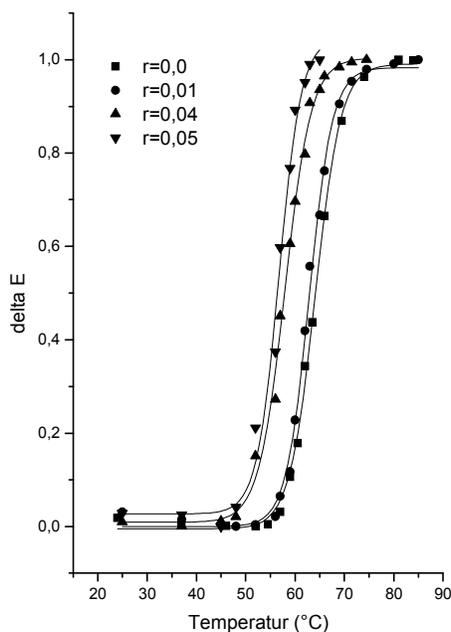


Abb. 3.12 Schmelzkurvenschar für unterschiedliche molare Verhältnisse (r) von **m-4F-Pt-Cl₂** zu den DNA-Basen

Für die Vorversuche wurde die Leitverbindung **m-4F-Pt-Cl₂** genutzt und in verschiedenen Konzentrationen mit der DNA inkubiert. Eine typische Kurvenschar wird in Abb. 3.12 dargestellt.

Trägt man die Schmelzpunktveränderung (ΔT) gegen das Platin/Basenpaar(Pt/Bp)-Verhältnis (r) auf, so erhielt man zunächst eine lineare Erniedrigung des Schmelzpunkts mit steigendem Pt/Bp-Verhältnis (siehe Abb. 3.13). Bei diesen niedrigen Pt/Bp-Verhältnissen banden die meisten Platinatome überwiegend bifunktional und erzeugten so die Schmelzpunkterniedrigung. Ab einer gewissen Sättigung erfolgte die Bindung mehrheitlich monofunktional und der stabilisierende Effekt der permanenten Kationen nach Platinbindung auf die DNA begann sich dominant auszuwirken.^[185,190] So zeigte sich ab ca. $r=0,05$ eine Umkehr der Schmelzpunkterniedrigung. So wurde bei weiterer Steigerung des Pt/Bp-Verhältnisses eine lineare Schmelzpunkterhöhung beobachtet (siehe Abb. 3.13).

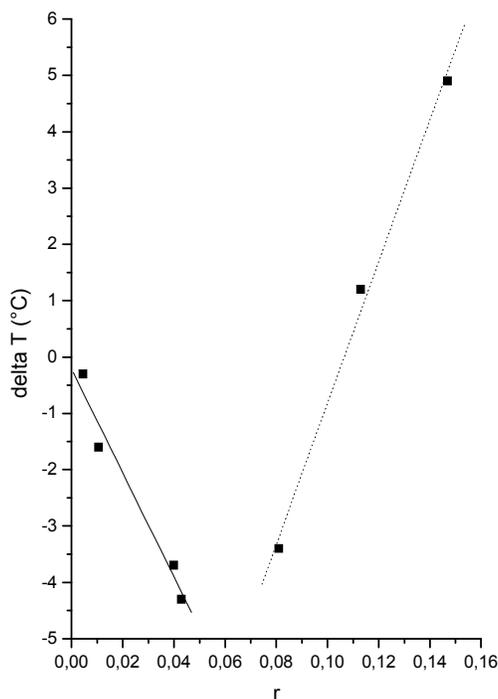


Abb. 3.13 Schmelzpunktveränderung (ΔT) unter steigendem Platin-DNA-Basen-Verhältnis (r) für **m-4F-Pt-Cl₂**

Neben den Unsicherheiten in der Konzentrationswahl und den relativ kleinen und damit relativ stark fehlerbehafteten Schmelzpunktunterschieden wies diese Methode auch einige praktische Probleme auf. So neigten z.B. die Lösungen teilweise zum Ausgasen in der Küvette. Das Hauptargument gegen die Verwendung dieser Methode war der extrem

hohe Zeitaufwand, der eine statistisch gestützte Analyse mit mehreren Substanzen nahezu unmöglich machte. Daher wurde die Schmelzpunktveränderung nach Substanzwirkung nicht für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

3.5.3 Bindung von Platinverbindungen an die zelluläre DNA von MCF-7-Zellen

Um die Fähigkeit einer platinhaltigen Substanz zur Bindung an die DNA im zellulären Kontext zu untersuchen, sollte nach der Inkubation mit der Testsubstanz die DNA aus den Zellen isoliert werden. Dafür standen prinzipiell mehrere Methoden zur Verfügung: Diese Isolierung kann über Chromatographiematerialien („*reversed phase*“/Gelfiltration) in käuflich zu erwerbenden Säulen geschehen. Dieses ist eine gebräuchliche Methode für die Gewinnung nativer DNA. Für die Isolierung von platinierter DNA über solche Säulen existierten keine Applikationen. Die zweite sehr gebräuchliche Methode ist die Gewinnung über die Fällung durch Ethanolzugabe. Um die ebenfalls bei diesen Bedingungen präzipitierenden Proteine und Ribonucleinsäuren zu entfernen, werden diese enzymatisch zuvor verdaut. Anschließend werden die Enzyme und schwer verdauliche Proteine mittels Chloroform-Phenol-Extraktion entfernt. Als Ausgangsarbeitsvorschrift lag eine Beschreibung zur Isolierung von platinierter DNA aus weißen Blutkörperchen vor.^[186,193]

3.5.3.1 Optimierung der Verdauungsbedingungen zur Entfernung von RNA und Proteinen

Die ursprüngliche Arbeitsvorschrift sieht zwei Verdauenschritte mit jeweils darauffolgender Chloroform-Phenol-Extraktion und anschließender Ethanol-fällung vor. Damit zieht sich die Aufarbeitung über mehrere Tage hin. Nach dem ersten Verdau, dem Proteinverdau, fiel eine fluorimetrische Prüfung auf vorhandene RNA mittels Acridinorangefärbung negativ aus. Das warf die Frage auf, inwiefern die zweite Inkubation zum enzymatischen Verdau der RNA noch sinnvoll war. Da irrtümlich statt wie beschrieben Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumdodecylsulfonat verwendet worden war, wurde der Einfluss dieser Detergentien auf den RNA-Verdau geprüft. Dazu wurde eine RNA-Lösung in den beiden Detergenzlösungen mit dem Enzym Ribonuklease A inkubiert. Danach wurde die nicht

verdaute RNA mittels ethanolischer Fällung isoliert und photometrisch quantifiziert (siehe Abb. 3.14).

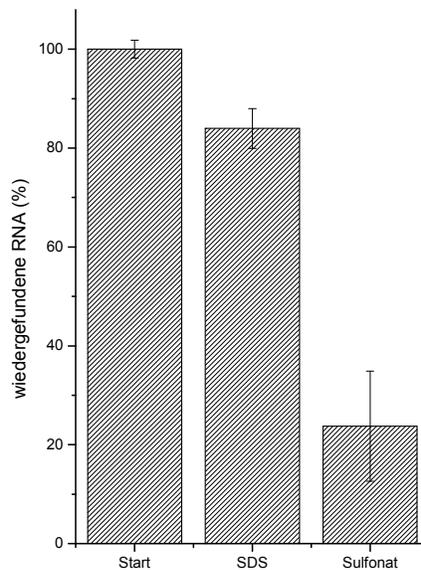


Abb. 3.14 RNA-Abbau durch Ribonuklease A unter Einfluss der Detergentien Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumdodecylsulfonat (Sulfonat) (beide 0,5%) nach 4h Inkubation bei 37°C (n=3)

Im etablierten Detergenz Natriumdodecylsulfat war die Ribonuklease-Aktivität deutlich reduziert, so dass über 80% der eingesetzten RNA-Menge wiedergefunden wurde. Im Gegensatz dazu wurde für das alternative Detergenz Natriumdodecylsulfonat eine deutlich schlechtere Hemmung der Ribonuklease-Aktivität gefunden. So wurden weniger als 25% der Ausgangsmenge an RNA detektiert.

Es müssen daher schon bei dem ersten Inkubationsschritt die zelleigenen Ribonukleasen nicht effektiv inaktiviert gewesen sein, so dass schon hier ein vollständiger RNA-Verdau festgestellt wurde.

3.5.3.2 Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge

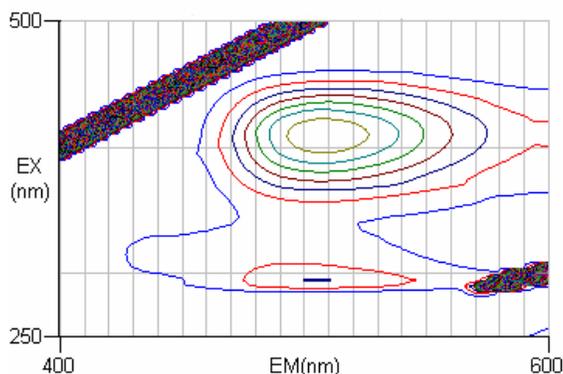


Abb. 3.15 3D-Fluoreszenzcharakterisierung des Reaktionsprodukts von DNA mit 3,5-Diaminobenzoessäure

Nach erfolgtem Verdau wurden die Enzyme und schwer verdauliche Proteine mittels Chloroform-Phenol-Extraktion entfernt. Die aufgereinigte DNA wurde mit Ethanol aus der resultierenden Lösung ausgefällt und wiederholt mit 70%igen Ethanol gewaschen. Hier wurden die in der Literatur beschriebenen Standardarbeitsbedingungen^[186,193] beibehalten. Aus der isolierten DNA sollte nun atomabsorptionsspektroskopisch der Platingehalt bestimmt werden. Dieser sollte auf die Gesamtmenge der extrahierten DNA bezogen werden. In der Ausgangsarbeitsvorschrift wird die DNA-Menge photometrisch bestimmt. Die photometrische Bestimmung der DNA-Menge anhand des Absorptionsmaximums bei 260nm ist sehr gebräuchlich und einfach durchzuführen. Hierfür werden sowohl eine hohe DNA-Menge als auch ein relativ großes Lösungsvolumen gebraucht. Da aber für die Platinbestimmung prinzipiell eine geringe Verdünnung angestrebt werden sollte, wurde diese Methode verworfen. Stattdessen wurde auf eine Derivatisierung der DNA, wie sie schon von einigen Autoren praktiziert worden ist, zurückgegriffen.^[150,194,195] Hierbei wird die DNA mit Perchlorsäure hydrolysiert und die freigesetzte Desoxyribose mit 3,5-Diaminobenzoessäure analog einer Skraup-Reaktion zu einem fluoreszierenden Chinolinderivat umgesetzt. Dieses zeigte bei einer Anregungswellenlänge von 405nm eine Fluoreszenzbande bei 500nm (siehe Abb. 3.15). Um hier die Reagenzmenge der relativ teuren 3,5-Diaminobenzoessäure niedrig und die Messzeit gering zu halten, wurde der Test auf den 96-Loch-Platten-Maßstab übertragen.

3.5.3.3 Reinheitsprüfung der extrahierten DNA

Um die Reinheit der extrahierten DNA zu prüfen, wird im Allgemeinen das Verhältnis aus der Absorption bei der Wellenlänge 260nm (ϵ_{260}) zu derjenigen bei 280nm (ϵ_{280}) gebildet. Beträgt das Verhältnis $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ mindestens 1,8, so wird von einer reinen DNA ausgegangen. Dieses Verhältnis reagiert sehr empfindlich auf die unvollständige Entfernung des Extraktionsmittels Phenol, das bei 270nm ein starkes Absorptionsmaximum hat. Hingegen lässt sich die Verunreinigung durch Proteine darüber nur schwer detektieren, obwohl die allerdings relativ seltenen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280nm ein Absorptionsmaximum haben. So wurde gezeigt, dass eine Verunreinigung mit bis zu 60% Protein das Verhältnis kaum unter 1,8 drückt.^[196] Hingegen zeigen die DNA-Lösungen und die Proteinlösungen im Bereich von 240-220nm ein vollkommen verschiedenes Verhalten (siehe Abb. 3.16). Während die DNA-Lösung ein Absorptionsminimum durchlief, zeigte die Proteinlösung (hier Bovines Serumalbumin (BSA)) in diesem Bereich einen starken Anstieg der Absorption. Daher wird das Verhältnis aus der Absorption bei 260nm mit derjenigen bei 230nm ($\epsilon_{260}/\epsilon_{230}$) zur Beurteilung der Proteinfreiheit vorgeschlagen. Das Verhältnis $\epsilon_{260}/\epsilon_{230}$ beträgt bei Proteinfreiheit mindestens 2,2. Ferner reagiert das Absorptionsminimum an dieser Stelle sehr empfindlich auf Proteinverunreinigungen. Ein erhöhter Proteingehalt verschiebt das Minimum zu längerer Wellenlänge. Für proteinfreie DNA-Lösungen liegt das Minimum unter 231nm.^[196]

Daher wurden neben dem Verhältnis $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ maßgeblich das Verhältnis $\epsilon_{260}/\epsilon_{230}$ und die Lage des Absorptionsminimums zur Beurteilung auf Proteinfreiheit der aufgearbeiteten DNA genutzt. Auch die Auswahl des DNA-Standards, der zum Kalibrieren der DNA-Bestimmung genutzt werden sollte, erfolgte nach diesen Kriterien. Nachdem Kalbsthymus-DNA als nicht proteinfrei erkannt wurde, wurde Lachssperma-DNA verwendet, die sich als kostengünstig und als proteinfrei gezeigt hat.

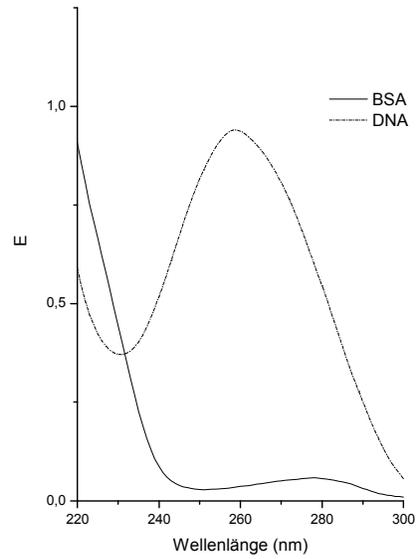


Abb. 3.16 Überlagerung der UV-Spektren von Bovinen Serum Albumin (BSA) (1mg/ml) und von Lachssperma DNA (0,1mg/ml)