

8 Materialien und Methoden

Die Chemikalien und Reagenzien wurden – soweit nicht anders erwähnt – von den Firmen Fluka und Sigma bezogen. Die Gase Argon und Kohlendioxid wurden bei Air Liquide erworben. Die Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Sarstedt, Nunc, Braun, Roth, Agilent, Analytik Jena und Perkin Elmer.

8.1 Geräte

- Analysenwaage: BP 211D (Sartorius)
- Atomabsorptionsspektrometer: Vario 6 (Analytik Jena AG)
- Autoklav: 2540 EL (Systec)
- CO₂-Begasungsbrutschrank: B 5060 EK-CO₂ (Heraeus); SNW 300TVBB (Nalge Nunc International)
- Fluorimetrie: F-4500 (Hitachi); SFM 25 (Kontron)
- Inversmikroskop: Axiovert 135, Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Jena)
- Kapillarelektrophorese: ^{3D}CE (Agilent)
- Mikroplattenreader: Flashscan S12 (Analytik Jena AG) für UV-Vis; Victor² 1420 Multilabel counter (Perkin Elmer) für Fluorimetrie
- pH-Meter: model 410A (Orion Research Inc.)
- Steril-Werkbank: Lamin Air HB2448 (Heraeus)
- Ultraschallstab: Sonoplus GM 70 (Bandelin)
- UV-Spektroskopie: Uvikon 930 (Kontron Instruments)
- Zentrifuge: Megafuge 1.0 R (Heraeus)

8.2 Lösungen und Reagenzien

- Acetatpuffer: 3M Natriumacetat mit Essigsäure auf pH5,5 eingestellt
- Adsorptionspuffer: 0,02M MgCl₂, 0,1M Borat, 0,1M NaCl und 0,1%^{w/v} Triton-X-100 in Wasser gelöst

- Bradford-Reagenz: 250mg Serva Blue G, 250ml Ethanol 96%, 500ml H₃PO₄ 85% und 250 ml H₂O (Dieses Reagenz wurde direkt vor Gebrauch 1:5 mit Wasser verdünnt.)
- DABA-Reagenz: 1 Teil (20%^{w/w} 3,5-Diaminobenzoessäure in Wasser) + 3 Teile (1M NaOH und 10mM Natriumcarbonat in Wasser), eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss vorinkubiert
- DNA-Puffer pH 6,8: 3mM NaCl, 0,2mM KH₂PO₄; 0,8mM Na₂HPO₄*2 H₂O in H₂O bidest gelöst und auf pH 6,8 mit HCl eingestellt
- DNA-Puffer pH 7,3: 3mM NaCl, 0,2mM KH₂PO₄; 0,8mM Na₂HPO₄*2 H₂O in H₂O bidest gelöst und auf pH 7,3 mit HCl eingestellt
- Dulbecco's Puffer: 8,0g/l NaCl; 0,2g/l KCl; 0,1g/l CaCl₂; 0,1g/l MgCl₂*6H₂O; 0,2g/l KH₂PO₄; 1,15g/l Na₂HPO₄*2 H₂O Wasser gelöst und auf pH 7,2-7,4 eingestellt
- Glutardialdehydlösung 1%: 25%ige Glutardialdehyd-Lösung in Wasser wurde mit PBS auf einen Gehalt von 1% verdünnt.
- Kristallviolettlösung 0,02%: 200 mg Kristallviolett wurden in 1 Liter Wasser gelöst
- PBS (Phosphate buffered saline): 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 0,2g KH₂PO₄, 1,44g Na₂HPO₄*2H₂O mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- RSB-Puffer: 10mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 1,5mM MgCl₂ (*6H₂O) auf pH 7,4 eingestellt
- SDSonot-Verdaupuffer: 0,5%^{w/w} Natriumdodecylsulfonat in 10mM Tris, 1mM EDTA auf pH 7,8 eingestellt
- TET-Puffer: 0,5%^{w/v} Triton X-100, 0,5%^{w/v} EDTA-Dinatriumsalz, 10mM TRIS-Base in Wasser gelöst und mit HCl auf pH8 eingestellt
- Tris-Puffer: 10mM Tris, 1mM EDTA und 100mM NaCl in Wasser auf pH 7,8 eingestellt
- Trypsinlösung: 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS gelöst

8.3 Methoden

8.3.1 Atomabsorptionsspektroskopische Untersuchungen

8.3.1.1 Platinbestimmung

Temperaturprogramm siehe Tab. 3.1

Untergrundkorrektur	verwendete Wellenlänge [nm]	Spaltbreite [nm]	Injektionsvolumen [μl]
Deuteriumlampe	265,9	0,5	20

Tab. 8.1 Methodenparameter zur Platinbestimmung mittels AAS

Es wurden von jeder Probe mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Vor jeder Messreihe wurden Kalibriergeraden im Bereich 0-0,2mg/l mittels K_2PtCl_4 -Standard-Lösung erstellt. Hierbei wurden Lösungen verwendet, die eine ähnliche Matrix wie die Proben enthielten. Zur Vermeidung von „*memory*“-Effekten wurde der Injektor zwischen den einzelnen Injektionen 5mal mit Spüllösung (Wasser/Methanol 50:50 v/v mit 1% HNO_3 (65%) versetzt) gespült.

8.3.1.2 Kupferbestimmung

Programmschritt	Heizrate [$^{\circ}C/s$]	Temperatur [$^{\circ}C$]	Zeit [s]
Trocknen	10	90	5
Trocknen	7	105	30
Trocknen	15	120	10
Pyrolyse	400	700	15
Pyrolyse	400	1100	15
Nullabgleich	0	1100	5
Atomisieren	1500	2000	4
Ausheizen	1000	2200	4

Der Gasfluss ist maximal gestellt mit Ausnahme des Nullabgleichs und der Atomisierung.

Tab. 8.2 AAS-Temperaturprogramm für die Kupferbestimmung aus Zellmatrix

Untergrundkorrektur	verwendete Wellenlänge [nm]	Spaltbreite [nm]	Injektionsvolumen [μl]
Deuteriumlampe	324,8	0,8	20

Tab. 8.3 Methodenparameter zur Kupferbestimmung mittels AAS

Es wurden von jeder Probe mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Proben wurden ähnlich der Platinbestimmung stabilisiert (siehe Kap. 3.1). Vor jeder Messreihe wurden Kalibriergeraden über die Signalhöhe im Bereich 0-0,8μg/l mittels CuSO₄-Standard-Lösung erstellt. Hierbei wurden Lösungen verwendet, die eine ähnliche Matrix wie die Proben enthielten. Bei zellhaltigen Proben wurde bei der Matrix der Proteingehalt bestimmt, um den Kupfergehalt der Matrix berechnen zu können. Zur Vermeidung von „memory“-Effekten wurde der Injektor zwischen den einzelnen Injektionen zweimal mit Spüllösung (Wasser/Methanol 50:50^{v/v} mit 1% HNO₃ (65%) versetzt) gespült.

8.3.2 Kapillarelektrophoretische Systeme

Alle Untersuchungen wurden im Kapillarenzonelektrophorese-Modus (CZE) durchgeführt. Hierbei wurde mit HPCE-Standard-Kapillaren aus „fused silica“ (50μm Durchmesser, 64,5cm Gesamtlänge und 56cm effektive Länge) ohne vorherige Modifikation der Oberfläche gearbeitet. Die Kapillaren wurden am Anfang eines Messtages mit 1M NaOH (5 Minuten) gespült gefolgt von wasser (5 Minuten) und Laufpuffer (10 Minuten). Zwischen den analytischen Läufen wurde die Kapillare 5 Minuten mit Puffer gespült. Am Ende des Tages wurde die Säule 15 Minuten lang mit Wasser gespült und mit Wasser gefüllt bis zum nächsten Analysentag gelagert. Die Injektion erfolgte immer hydrodynamisch über das Anlegen eines Druckes von 50mbar über 4 Sekunden. Es wurde ein Dioden-Array-Detektor (DAD) verwendet, der die Absorption über einen Wellenlängenbereich von 190nm bis 400nm aufzeichnete.

System	Puffer	Spannung [kV]	Temperatur [°C]	
		pos. Polarität	Kapillare	Autosampler
A	0,1M Phosphat pH2,7	25	20	RT
B	0,1M Borat pH9,6	20	20	RT
C	0,02M Phosphat pH2,7	25	20	RT
D	0,02M Phosphat pH6,6	25	20	RT
E	0,02M Citrat pH6,4	25	20	RT
F	0,02M Borat pH6,8	25	20	RT
G	0,02M Acetat pH6,1	25	20	RT
H	0,1M Phosphat pH2,7	25	20	37°C
I	0,02M Borat pH9,6	20	20	RT

Tab. 8.4 Kenndaten der verwendeten kapillarelektrophoretischen Systeme

8.3.3 Zellproteinbestimmung nach Bradford^[299]

Aus einer Stammlösung von 40mg/ml bovinen Serumalbumin (BSA) wurde ein Arbeitsstamm von 1mg/ml durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Sodann wurde eine Kalibriergerade pipettiert, bei der 0-120µg (Das entspricht einem Gehalt in der Probe von 0-1,2mg/ml) in die einzelnen Reagiergefäße pipettiert wurden. Die Reagiergefäße wurden mit Wasser und dem Homogenisationsmedium des Tests auf einen Milliliter aufgefüllt. Der Anlagerungsfarbstoff des Bradfordreagenzes reagierte sehr empfindlich auch auf Puffersubstanzen und Detergentien^[300], so dass die Standards mit exakt dem Gehalt dieser Substanzen in der Probe versetzt wurden.

100µl wurden je zweimal in Halbmikro-Einwegküvetten (Sarstedt) einpipettiert und mit 1ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 20 Minuten war die Farbentwicklung abgeschlossen. Der Farbstoff war dann innerhalb einer Stunde am Photometer bei 595nm zu vermessen.

8.3.4 Proteinbindung

Zu x ml einer HSA-Lösung (40mg/ml) in Dulbecco's Puffer wurden x µl Komplexlösung (3mM) hinzugegeben (in der Regel x=5), so dass eine Konzentration von 3µM Komplex

resultierte. Der Ansatz wurde kurz gevortext und sofort wurden die Wiederfindungsexperimente durchgeführt. Die Wiederfindung wurde als $W_f = \text{ungebundenenes Pt (t=0) / GesamtPt}$ bestimmt. Das geschah als Dreifachmessung. GesamtPt wurde bestimmt, indem 50µl abgenommen und mit 30µl Triton-X-100-Lösung (5%) und 100µl HCl (18%) stabilisiert und mit 320µl H₂O bidest auf 0,5ml aufgefüllt wurden. Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 0-0,2mg/l Pt mit 50µl 40mg/ml HSA-Lösung als Matrixgleich. Das ungebunden vorliegende Platin wurde den folgenden Kapiteln entsprechend bestimmt.

8.3.4.1 Ultrafiltration

Es wurden dem Ansatz 200µl entnommen und in eine Ultrafiltrationseinheit (Microcon YM-30; Millipore) einpipettiert. Eingesetzt in eine Zentrifuge wurden diese 10 min bei 6000U/min entsprechend 6110*g Beschleunigung bei 4°C zentrifugiert. Vom Filtrat wurden 50µl entnommen und mit 30µl Triton-X-100-Lösung (5%) und 100µl HCl (18%) stabilisiert und mit 320µl H₂O bidest auf 0,5ml aufgefüllt. Zur Kalibrierung wurden Lösungen mit 50µl Dulbecco's Puffer als Matrix auf 0,5ml im Bereich von 0-0,2 mg/l Pt hergestellt.

8.3.4.2 Ethanolische Präzipitation

Es wurden 150µl des Ansatzes in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 300µl eiskaltem Ethanol (-20°C) versetzt. Der Ansatz wurde kurz gevortext und dann mindestens zwei Stunden im Tiefkühler bei -20°C gelagert. Danach wurde das ausgefallene Protein pelletiert, indem die Reaktionsgefäße in einer Zentrifuge bei 4000U/min entsprechend 4060*g 10min zentrifugiert wurden. Zur Messung wurden 300µl des Überstandes mit 100µl HCl (18%) stabilisiert und mit 100µl H₂O bidest auf 0,5ml aufgefüllt. Zur Kalibrierung wurden Standardlösungen (0-0,8mg/l) hergestellt und wie die Proben aufgearbeitet.

8.3.4.3 Trichloressigsäure Fällung

Es wurden dem Ansatz jeweils 150µl entnommen und mit 150µl eiskalter TCA-Lösung (20%^{w/w}) versetzt, gründlich gevortext und 10 Minuten auf Eis gelagert. Dann wurde das denaturierte Protein mittels Zentrifuge bei 4000U/min entsprechend 4060*g Beschleunigung bei Raumtemperatur 5 min lang abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 200µl mit 50µl HCl (18%) stabilisiert und mit 250µl Wasser bidest auf 0,5ml verdünnt. Zur Kalibrierung wurden Standards im Konzentrationsbereich von 0-0,8 mg/l Pt hergestellt und wie die Proben behandelt.

8.3.4.4 Größenausschlusschromatographie

Sephadex-50 Material wurde in Wasser vorgequollen, in eine schmale Säule (30mm Durchmesser) überführt und bis zur Analyse unter Wasser gelagert. 300µl des Versuchsansatzes wurden aufgetragen und mit Wasser eluiert. Es wurden 500µl Fraktionen gesammelt und mit 100µl HCl (18%) und mit 30µl Triton (5%) stabilisiert. Es wurde ohne Matrixgleich im Bereich von 0-0,2mg/l Pt kalibriert.

8.3.5 Allgemeine Zellkulturbedingungen

8.3.5.1 MCF-7-Zellen

Diese adhärent wachsende Brustkrebszelllinie wurde in EMEM-Basalmedium mit 10% FCS-Zusatz als Kulturmedium im Brutschrank (37°C 5% CO₂) kultiviert. Im wöchentlichen Abstand wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, mit PBS gespült und das PBS erneut abgesaugt. Nach Zugabe von Trypsin wurde zur vollständigen Benetzung die Flasche mehrmals geschwenkt und das Trypsin wieder abgesaugt. Dann erfolgte der Verdau der extrazellulären Matrix, indem die Flasche zwei Minuten im Brutschrank inkubiert wurde. Mit der Zugabe von 10ml frischen serumhaltigen Medium wurde der Verdau gestoppt und die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und ein Aliquot (in der Regel 1ml) in eine neue Flasche mit 10ml Kulturmedium gegeben.

8.3.5.2 MDA-MB-231-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine ebenfalls adhärent wachsende Mammakarzinomzelllinie, die sich morphologisch und u.a. vom Estrogenrezeptorgehalt deutlich von der MCF-7-Zelllinie unterscheidet^[251]. Diese Zellen wurden in McCoy's-Medium mit 5% FCS-Zusatz kultiviert und wurden ebenfalls wöchentlich analog den MCF-7-Zellen passagiert. Da diese Zellen jedoch eine kürzere Generationszeit aufweisen, reichte hier in der Regel der Transfer von 0,2ml zur Weiterkultur.

8.3.5.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden kurz vor der Konfluenz stehende Zellkulturen gewaschen und trypsiniert. Die Zellen wurden mit 5ml Kulturmedium aufgenommen und in einer Tischzentrifuge bei 2000U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Einfriermedium (90% Kulturmedium/ 10% DMSO) suspendiert und in ein steriles Kryoröhrchen überführt. Nach Einwickeln in Zellstoff und Alufolie wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen in 70%igen Isopropanol gelegt und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml Kulturmedium verdünnt. Nach dem Abzentrifugieren bei 2000U/min wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank inkubiert.

8.3.6 Chemosensitivitätstest

Die Zellzahl der beim Passagieren überschüssigen Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dann wurde in 220ml Kulturmedium eine Zellzahl von 7000-7200 Zellen/ml (MCF-7) bzw. 3200-3300 Zellen/ml (MDA-MB-231) eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 16 96-Loch-Platten mit 100µl pro Loch versehen. Eine Platte wurde als Plattenblindwert mit 100µl Kulturmedium pro Loch befüllt. Diese Platten inkubierten dann 3 (MCF-7) bzw. 2 (MDA-MB-231) Tage im Brutschrank. Danach wurden die Platten mit 200µl substanzhaltigen Kulturmedium versetzt, wobei

fünf Platten stellvertretend für fünf Zeitpunkte identisch belegt wurden. Pro Substanz und Konzentration wurden 16 Löcher belegt. Daneben wurden auf jeder Platte 16 Löcher mit dem verwendeten Lösungsmittel als Lösungsmittelvergleich belegt. Von den Substanzen wurden 20µl aus Vorverdünnungen auf 20ml Kulturmedium gegeben und gemischt, so dass der Lösungsmittelgehalt 1% nicht überschritt. Als Lösungsmittel wurde DMF präferiert, aber Wasser, Methanol, Ethanol und DMSO waren ebenfalls sehr gut geeignet. Als Qualitätskontrolle wurde Cisplatin in den Konzentrationen 0,5, 1 und 5µM bei jedem Test miteingesetzt, da das Ansprechverhalten der Zellen darauf bekannt und sehr reproduzierbar ist.

Die Blindwertplatte und eine Platte zur Ermittlung der Zelldichte zum Substanzzugabezeitpunkt wurden sofort gestoppt, indem das Kulturmedium abgesaugt und durch 1%igen Glutardialdehyd in PBS zum Fixieren der Zellen auf der Plattenoberfläche ersetzt wurde. Nachdem die Platten 20min bei Raumtemperatur standen, wurde das Glutardialdehyd von den Platten abgeschlagen und die Platten unter PBS im Kühlschrank bis zum Färben gelagert. Auf gleiche Weise wurden zu den fünf gewünschten Zeitpunkten die mit Substanzen inkubierenden Platten gestoppt.

Zum Färben der Zellmasse wurde im Minutentakt das PBS ausgeschlagen und durch 100µl einer 0,02%^{w/v} Kristallviolettlösung ersetzt. Nach 30 Minuten wurde diese ebenfalls ausgeschlagen und die Platten zweimal mit Wasser gewaschen. Dann wurden die Platten 15 Minuten mit Wasser befüllt gelagert und gründlich ausgeschlagen. Zum Extrahieren des gebundenen Farbstoffs wurden 180µl Ethanol 70% pro Loch einpipettiert und die Platten 4 Stunden geschüttelt.

Die Extinktion der Farblösungen wurden bei 590nm in einen Mikroplatten-Spektrophotometer ermittelt.

Zur Auswertung wurde die optische Dichte der substanzbehandelten Zellen (OD_{Probe}) zu der Kontrollgruppe ($OD_{\text{Kontrolle}}$) auf der jeweiligen Platte in Beziehung gesetzt, wobei diese Werte um die optische Dichte der Zellen zum Substanzzugabezeitpunkt (OD_{Anfang}) korrigiert wurden. So erhielt man die T/C_{kor} -Werte wie folgt:

$$T/C_{\text{kor}} = (\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{Anfang}}) / (\text{OD}_{\text{Kontrolle}} - \text{OD}_{\text{Anfang}}) * 100 [\%]$$

Sank die optische Dichte der Proben unter derjenigen des Anfangswertes, so wurden die T-Werte folgendermaßen bestimmt:

$$T = (\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{Anfang}}) / \text{OD}_{\text{Anfang}} * 100 [\%]$$

Um beurteilen zu können, wie stark die Platte unspezifisch gefärbt wurde, wurde mittels der optischen Dichte der Blindwertplatte bestimmt, welcher T-Wert ungefähr der vollständigen Reduktion der Anfangszellmasse entsprach.

8.3.7 Zellaufnahmebestimmung

Bei dem routinemäßigen Passagieren wurden pro Doppel-Dreifachbestimmung elf 6-Loch-Platten ($15 \cdot 10^4$ (MCF-7) bzw. $5 \cdot 10^4$ (MDA-MB231) Zellen /2ml pro Kavität) ausgesät (8 Platten für die zwei zu testenden Substanzen, eine Platte für die Cisplatinontrolle und zwei Platten für die Matrixkalibration. Der Test wurde mit fünf Tage alten Zellen durchgeführt, die 60-70% konfluent waren.

8.3.7.1 Zellaufnahme von Platinverbindungen

Es wurden pro Substanz 50ml EMEM-Medium ohne FCS-Zusatz in einem Zentrifugenröhrchen mit 50µl Stammlösung der Testsubstanz (in der Regel 5mM) steril versetzt und geschüttelt. Es wurden für zwei Substanzen acht 6-Loch-Platten dem Brutschrank entnommen und das alte Medium abgesaugt. Dann wurden zügig 2ml des substanzhaltigen Mediums in die Kavitäten gegeben und diese in den Brutschrank weiter inkubiert. Aus dem Rest an substanzhaltigem Medium wurde der wahre Gehalt an Platin dreimal bestimmt, indem 50µl Medium mit 150µl Triton-Lösung (1%^{w/v}), 100µl HCl (18%) und 200µl Wasser versetzt wurden. Dazugehörig wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 0-0,2mg/l mit 50µl Medium als Matrixgleich erstellt. Das diente als Kontrollparameter für die Substanzzugabe.

Zu den gewünschten Zeitpunkten (z.B. 1/2/3/4/6/8/20/24h) wurde eine 6-Loch-Platte dem Brutschrank entnommen und das substanzhaltige Medium abgesaugt. Nach Waschen mit

2ml PBS-Puffer pro Kavität und Trypsinieren mit 0,2-0,3ml Trypsin pro Kavität wurde die 6-Loch-Platte für 2min im Brutschrank inkubiert. Sodann wurden die Zellen mit 1 ml Medium+10% FCS vom Boden gelöst und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und bei 2000U/min und 4°C drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Pellet zweimal mit eiskalten unsterilen PBS versetzt, gevortext, zentrifugiert und das PBS erneut abgesaugt. Das so gewaschene Pellet wurde bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Für die Cisplatinkontrolle wurde eine Platte mit 5µM Cisplatin enthaltendes Medium 24 Stunden inkubiert und wie die Proben aufgearbeitet.

Zur Analyse wurde das Zellpellet mit 300µl 1%iger Triton-X-100-Lösung versetzt und mittels Sonotrode bis zur klaren Lösung homogenisiert. Für die Proteinbestimmung (siehe Kap. 8.3.3) wurden 25µl Homogenisat mit 225µl Wasser verdünnt und zur Analyse eingesetzt. Für die Platinbestimmung wurden 200µl Homogenisat mit 50µl Wasser und 50µl HCl (18%) zur Stabilisierung versetzt. Die Kalibrierung wurde mit den Zellpellets im Bereich zwischen 0 und 0,2mg/l erstellt, indem die 50 µl Wasser durch Standardlösung ersetzt wurden.

Zur Auswertung wurde über den Proteingehalt der Proben der Zellvolumenkonzentration bestimmt. Dieses ist möglich, da der Proteingehalt in den Zellen (MCF-7 8,85 µl/mg bzw für MDA-MB-231 9,24µl/mg) bekannt ist.^[179] Bezieht man dann den erhaltenen Platingehalt auf die Zellvolumenkonzentration erhält man den intrazellulären Platingehalt. Setzt man diesen in Beziehung zum Gehalt im Medium, so erhält man den Anreicherungsgrad (AG).

8.3.7.2 Untersuchungen zur Hemmbarkeit der Zellaufnahme von Platinverbindungen

8.3.7.2.1 Zusammenhang mit der Kupferhomöostase

Zu einem Medium mit konstanten Gehalt an Platinverbindung (Cisplatin (80 μ M)/ **m-4F-Pt-DAH-DMSO** (20 μ M)) wurden verschiedene Kupfersulfatmengen (0-200 μ M) hinzugefügt. Die MCF-7 Zellen wurden wie für die Zellaufnahmebestimmungen herangezogen und zwei Stunden lang mit dem Platinkomplex mit steigenden Kupferkonzentrationen unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen analog der Zellaufnahmebestimmung geerntet und auf Platin- und Proteingehalt hin analysiert. Zur Auswertung wurde der zelluläre Platiningehalt gegen den Kupfergehalt des Mediums aufgetragen.

Zum anderen wurde ein konstanter Kupfersulfatgehalt (200 μ M) eingestellt und der Gehalt an Platinverbindung(Cisplatin (0-80 μ M)/ **m4F-Pt-DAH-DMSO** (0-60 μ M)) variiert. Hierbei wurde wie oben verfahren. Zur Auswertung wurde der zelluläre Kupfergehalt bestimmt und gegen die Platinkonzentration im Außenmedium aufgetragen.

8.3.7.2.2 Hemmung der organischen Kationentransporter

Hierzu wurden die MCF-7 Zellen mit 15 μ M **m-4F-Pt-DAH-DMSO** und jeweils mit und ohne 500 μ M Hemmstoff (Ouabain, Glykocholat und Cimitidin) bzw. Konkurrenzsubstrat (Tetraethylammoniumchlorid) 2h lang inkubiert. Hierbei wurde die Zellaufnahme mit und ohne Hemmstoff bzw. Konkurrenzsubstrat verglichen.

8.3.7.2.3 Hemmung der Endozytose

Hierzu wurden die MCF-7 Zellen mit 15 μ M **m-4F-Pt-DAH-DMSO** und jeweils mit und ohne Hemmstoff (Chlorpromazin 10 μ g/ml / Amilorid 1mmol/l / N-Ethyl-N-isopropyl-Amilorid 100 μ mol/l / Methyl- β -cyclodextrin 10mmol/l / Nystatin 25 μ g/l / Genistein 400 μ mol/l / Cytochalasin D 10 μ mol/l / Wortmannin 500nmol/l) nach 15minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Hemmstoff 2h lang inkubiert. Hierbei wurde die

Zellaufnahme mit und ohne Hemmstoffe verglichen. Die Initialbindung wurde bestimmt, indem die Zellen mit substanzhaltigem Medium versetzt wurden, das direkt nach Zugabe wieder abgesaugt wurde.

8.3.7.3 Zellaufnahme von dansylmarkierten Verbindungen

Für alle Substanzen deren Löslichkeit deutlich unter 5 μ M lag, wurde eine gesättigte Lösung erstellt, indem Medium mit Substanz versetzt wurde und mit Ultraschall behandelt wurde. Nach Lagerung über Nacht bei 4°C wurde nicht gelöste Substanz abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dieses Medium wurde dann nach Absaugen des alten Mediums zu den Zellen gegeben. Ein Teil des Mediums wurde aufbewahrt, um den Gehalt an gelöster Substanz zu bestimmen.

Die Inkubation und Zellernte wurden wie für die Platinverbindungen durchgeführt. Auch eine Cisplatinkontrolle (siehe Kap. 8.3.7.1) wurde angefertigt.

Zur Analyse wurde das Zellpellet in 300 μ l TET-Puffer an der Sonotrode homogenisiert. 25 μ l des Homogenisats wurden mit 225 μ l Wasser versetzt und zur Proteinbestimmung eingesetzt. Für die Fluoreszenzmessung wurden 200 μ l Homogenisat abgenommen und mit 100 μ l TET-Puffer und 100 μ l Ethanol versetzt.

Standards wurden in Ethanol verdünnt und 100 μ l dieser Verdünnungen wurden zu 200 μ l Zellhomogenisat aus unbehandelten Zellen und 100 μ l TET-Puffer gegeben, so dass eine Kalibrierreihe von 0-500nM Substanz resultierte.

350 μ l der Proben und der Standards wurden in 96-Loch-Schwarzplatten pipetteiert und in einem Fluoreszenzplattenreader mit 360nm als Anregungs- und 500nm als Emissionswellenlänge und 1 Sekunde als Messzeit pro Loch vermessen.

Die Bestimmung der Ausgangskonzentration im Inkubationsmedium wurde analog durchgeführt. Lediglich das Zellysate wurde durch Basalmedium ersetzt.

Die Auswertung erfolgte analog der Zellaufnahmebestimmung der Platinverbindungen (siehe Kap. 8.3.7.1).

8.3.7.4 Zellaufnahme von nicht markierten Dendrimeren

Für die Bestimmung des Gehalts an nicht markiertem Dendrimer wurden mehr Zellen benötigt, so dass die Inkubation in Zellkulturflaschen stattfand. Dazu wurden fünf Tage vor Versuchsstart beim regelmäßigen Passagieren jeweils 1ml Zellsuspension pro 10ml je Flasche ausgesät. Pro Substanz und für die Cisplatinkontrolle werden jeweils 3 Zellkulturflaschen ausgesät. Eine Flasche wurde als Blindwert substanzfrei inkubiert. Zum Starten der Inkubation wurde das alte Medium abgesaugt und neues substanzhaltiges Basalmedium hinzugefügt. Je nach Toxizität des zu testenden Dendrimers wurden dabei bis zu 100µM im Inkubationsmedium eingestellt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch Trypsinieren wie beim regulären Passagieren geerntet und mit 2000*g pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskalten PBS wurden die resultierenden Zellpellets bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Zur Analyse wurden die Zellen mit einem 1ml Adsorptionspuffer versetzt und an der Sonotrode homogenisiert. Dazu wurden 3ml Adsorptionspuffer gegeben und nochmals an der Sonotrode homogenisiert. Vom Homogenisat wurden 25µl abgenommen, mit 450µl Wasser versetzt und zur Proteinbestimmung eingesetzt. 3,75ml wurden in 1ml Schritten auf eine Festphasenextraktionskartusche (Strata X™, Phenomenex) gegeben, die vorher mit 1ml Methanol, 1ml Wasser, 1ml 0,1M Phosphatpuffer pH 2,7 und 1ml Wasser konditioniert worden war. Der Durchfluss des Zellhomogenisats erfolgt erst mittels Schwerkraft und wurde bei Bedarf durch Anwendung positiven Drucks beschleunigt. Zum Waschen wurde anschließend 1ml 0,01M Boratpuffer auf die Säule aufgetragen und die Säule anschließend mit Stickstoff kurz trocken geblasen. Auf die trockene Kartuschen wurde zur Elution 0,5ml Elutionsgemisch (0,1M Phosphatpuffer pH 2,7 und Methanol in veränderlichen Volumenverhältnis je nach Analyt (siehe Tab. 8.5)) gegeben und langsam eluiert. Das Eluat wurde unter denselben Bedingungen kapillarelektrophoretisch vermessen wie die Verdaukinetiken (siehe System A Kap.8.3.2). Es wurden Kalibriergeraden im Bereich von 0-100µg/ml im jeweiligen Elutionsgemisch angesetzt. Als Blindwert wurde ein Blindwertpellet genauso wie die Proben behandelt.

Untersuchter Analyt	Elutionsgemisch Puffer pH 2,7 :Methanol [%/v]
G₀	100:0
G₀(Met)₃	50:50
G₀(Phe)₃	50:50
G₀(Asp)₃	50:50
G₀(Dap)₃	100:0
G₁	50:50
G₁(Met)₆	10:90
G₁(Phe)₆	10:90
G₁(Asp)₆	50:50
G₂	50:50

Tab. 8.5 Elutionsgemische für die einzelnen Dendrimere

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden 25µl einer 10mg/ml Dendrimerlösung in 4ml Adsorptionspuffer mit/ohne Zellhomogenisat jeweils dreimal der Festphasenaufreinigung unterworfen. Als 100%-Wert wurden 25µl mit 475µl Elutionspuffer versetzt.

Diese Festphaseneluate konnten zur Absicherung des Ergebnisses ohne weitere Aufarbeitungen wie Entsalzungen zum MALDI-MS abgegeben werden.

Die Auswertung erfolgte wieder analog der Zellaufnahmebestimmung der platinieren Verbindungen (siehe Kap. 8.3.7.1).

8.3.7.5 Derivatisierung mit Fluorescamin

238µl SPE-Eluat oder Standard wurden in Elutionspuffer gelöst und mit 12µL 1M NaOH auf pH 8 gebracht. Dazu wurden 50µl Fluorescamin-Lösung (1mg/ml in Acetonitril) gegeben und geschüttelt (Vortex). Die derivatisierten Proben wurden kapillarelektrophoretisch analysiert (siehe System I Kap.8.3.2)

8.3.8 Bestimmung der Kernaufnahme

Bei dem routinemäßigen Passagieren wurden pro Substanz und für die Cisplatinkontrolle jeweils 3 Zellkulturflaschen ausgesät. Der Test begann, wenn die Zellen 5 Tage gewachsen waren und 60-80% Konfluenz erreicht hatten.

Die zu testenden Substanzen wurden in serumfreien Medium zugegeben. Zur Kontrolle der wahren Konzentration wurde ein Aliquot des Zugabemediums für die atomabsorptionsspektroskopische Messung aufbewahrt. Cisplatin wurde ebenfalls in serumfreien Medium in einer Konzentration von 5 μ M zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, wie beim Passagieren trypsiniert, in eiskaltem serumhaltigen Medium aufgenommen und vereinzelt. Nach Abzentrifugieren (2000* g 4°C 5min) wurden die Zellen einmal bzw. für die Cisplatinkontrolle zweimal mit PBS gewaschen. Die Cisplatinkontrolle wurde dann bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Zu dem Zellpellet wurden 4,75ml eiskalter RSB-Puffer gegeben und das Pellet durch Schütteln (Vortex) (mind. 30sec) resuspendiert. Der Ansatz wurde 5min auf Eis stehen gelassen. Danach wurden 0,25ml eiskalte Nonidet-Lösung (10%^w/_w in Wasser) zum Pellet gegeben und die Zellen durch Schütteln (Vortex) (ca. 30sec) lysiert. Der Ansatz wurde weitere 5min auf Eis gelagert. Die Kerne wurden dann vom anhaftenden Zytosol durch Schütteln (Vortex) (ca. 10sec) befreit und durch Zentrifugieren (1000U/min entsprechend 1020* g 4°C 5min) pelletiert. Das Rohkernpellet wurde in 0,5ml 0,25M Saccharose-Lösung resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5ml 0,88M Saccharose-Lösung unterschichtet. Das Zweiphasensystem wurde bei 2500U/min entsprechend 2540* g , 10min und 4°C zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet zur Entfernung der Saccharose in PBS resuspendiert. Nach dem Abzentrifugieren mit 2000U/min für 5min bei Raumtemperatur wurden die Kernpellets bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Zur Analyse wurden die Pellets mit 300 μ l einer Triton-X-100-Lösung (1%^w/_w) versetzt und an der Sonotrode homogenisiert. 25 μ l des Homogenisats wurden mit 225 μ l Wasser

versetzt und zur Proteinbestimmung eingesetzt. 200µl des Homogenisats wurden mit 50µl HCl (18%) stabilisiert und mit 50µl Wasser verdünnt. Kalibriert wurde mit Homogenisat von Kernen aus unbehandelten Zellen. Das Wasser wurde teilweise durch K₂PtCl₄-Standards ersetzt, so dass eine Kalibrierung im Bereich von 0-0,133mg Pt/l resultierte.

Die Zellpellets der Cisplatinkontrolle wurden in 600µl Triton-X-100-Lösung (1%^{w/w}) homogenisiert. 25µl Homogenisat wurden mit 975µl Wasser verdünnt und zur Proteinanalyse nach Bradford (siehe Kap. 8.3.3) eingesetzt. 200µl wurden zur Platinbestimmung mit 50µl HCl und 50µl Wasser verdünnt. Die Kalibrierung erfolgte mit Pellets aus unbehandelten Zellen im Bereich von 0-0,2mg Pt/l.

Der ermittelte Platingehalt wurde direkt auf den erhaltenen Proteingehalt bezogen, so dass die Kernaufnahme in ng Pt/mg Kernprotein erhalten wurde.

8.3.9 Bestimmung der DNA-Bindung

8.3.9.1 Bestimmung der Bindung an Lachsspermien-DNA

Ziel war ein Platinverbindung:DNA-Verhältnis von 0,0357. Dazu wurden 2,8 E₂₆₀-Einheiten DNA und 15µM Platinkomplex im Inkubationsansatz eingestellt. Dazu wird eine Lösung mit ca. 1mg DNA/ml in DNA-Puffer pH 6,8 bzw. pH 7,3 bei 260nm am Photospektrometer vermessen. Eine E₂₆₀-Einheit entspricht 150µM DNA. Zur Inkubation wurden 5ml des DNA-Puffers pH 7,3 bzw. 6,8 dergestalt mit dieser Lösung versetzt, dass eine Konzentration von 2,8 E₂₆₀-Einheiten DNA resultierte. Die Inkubation startete mit der Zugabe des Komplexes zum vorgewärmten Ansatz. Im Folgenden wurde der Ansatz bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 15µl des Acetatpuffers und 150µl des Ansatzes in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 300µl eiskaltem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt (Vortex) und dann mindestens 24 Stunden im Tiefkühler bei -20°C gelagert. Danach wurde die ausgefallene DNA pelletiert, indem die Reaktionsgefäße in einer Zentrifuge bei 6000U/min entsprechend 6080*g 5min bei 4°C zentrifugiert werden. Sofort wurden zur Messung 250µl des Überstandes mit 100µl HNO₃ (26%) stabilisiert und mit 150µl Wasser auf

0,5ml aufgefüllt. Zur Kalibrierung wurden K_2PtCl_4 -Standardlösungen (0-1,5mgPt/l) hergestellt und wie die Proben behandelt.

8.3.9.2 Schmelzpunktbestimmung von der DNA nach Substanzeinwirkung

Ziel war eine Inkubationslösung, die 0,7 E_{260} -Einheiten ($\equiv 105\mu M$ Bp) und Platin-komplex:DNA-Verhältnisse von 0-0,15 enthielt. Diese erfuhr beim Schmelzvorgang eine Erhöhung der Extinktion von ca. 0,2 E_{260} -Einheiten, so dass die photometrische Messung im streng linearen Bereich stattfand.

Die Vorinkubation geschah, indem zu einer DNA-Lösung (siehe Kap 8.3.9.1) in DNA-Puffer pH 7,3 soviel DNA-Puffer pH 7,3 zugegeben wurde, dass eine DNA-Konzentration von 0,7 E_{260} -Einheiten (Gesamtvolumen je Ansatz 10ml) resultierte. Zu den Ansätzen wurde der Platinkomplex gegeben, so dass verschiedene Platin-DNA-Verhältnisse (0-0,15) resultierten. Die Ansätze wurden 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert und danach bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Zur Schmelzpunktbestimmung wurden jeweils eine Quarzküvette in eine temperierbare Küvettenhalterung im Messstrahl und im Referenzstrahl einen Spektralphotometers positioniert. In der Küvette im Messstrahl befindet sich die zu schmelzende DNA, während sich im Referenzstrahl eine Pufferlösung ohne DNA befand. Die Küvetten wurden mit einem externen Wasserbad temperiert. Nach Einstellung der neuen Temperatur wurde nach Erlöschen der Heizanzeige einige Minuten gewartet, bis die Extinktion bei 260nm gemessen wurde. Im Anschluss daran wurde mit einem vortemperierten Thermometer die Temperatur in der Referenzküvette gemessen. Ab Raumtemperatur wurde erst in 10°C Schritten und ab 50°C dann in 2°C Schritten die Extinktion der DNA-Lösung bestimmt.

Die Auswertung erfolgte über eine Kurvenanpassung mittels des Computerprogramms Origin 7.0. Als Schmelzpunkt wurde die Temperatur bestimmt, bei der Hälfte des Extinktionsanstieges erreicht wurde.

8.3.9.3 Quantitative Bestimmung des an zelluläre DNA gebundenen Platins

Bei dem routinemäßigen Passagieren wurden pro zu testender Substanz jeweils 3 Flaschen ausgesät. Daneben wurden noch drei Flaschen für die Cisplatinkontrolle und eine Flasche für die Aufarbeitungskontrolle ausgesät. Der Test begann nach fünf Tagen, wenn die Zellen 60-80% konfluent gewachsen waren.

Die zu testenden Substanzen und Cisplatin wurden jeweils in einer Konzentration von 5µM zu den Zellen in serumfreien Medium zugegeben und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Ein Aliquot des Zugabemedium wurde zur Konzentrationskontrolle aufgehoben und anschließend an der AAS vermessen.

Die Cisplatinkontrolle wurde wie bei der Bestimmung der Kernaufnahme durchgeführt (siehe Kap. 8.3.8).

Am Ende der Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, trypsinisiert, in eiskaltem serumhaltigen Medium aufgenommen und vereinzelt. Nach Abzentrifugieren (2000*g 4°C 5min) wurden die Zellen einmal mit kalten PBS gewaschen. Zu dem Zellpellet wurden 4,75ml eiskalter RSB-Puffer gegeben und das Pellet durch Schütteln (Vortex) (mind. 30s) resuspendiert. Der Ansatz wurde 5min auf Eis stehen gelassen. Danach wurden 0,25ml eiskalte Nonidet-Lösung (10%^{w/w} in Wasser) zum Pellet gegeben und die Zellen durch Schütteln (Vortex) (ca. 30sec) lysiert. Der Ansatz wurde weitere 5min auf Eis gelagert. Die Kerne wurden dann vom anhaftenden Zytosol durch Schütteln (Vortex) (ca. 10s) befreit und durch Zentrifugieren (1000U/min entsprechend 1020*g 4°C 5 min) pelletiert.

Das Rohkernpellet wurde in 0,45ml SDSonate-Verdaupuffer suspendiert. Dazu wurden 10µl Proteinase K und 10µl Ribonuklease A (10mg/ml in 0,2M Phosphatpuffer pH 6,4) gegeben. Dieser Ansatz wurde 4h bei 55°C inkubiert und danach in ein Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 0,5ml Phenol (gesättigt mit Tris-Puffer) gegeben und kräftig geschüttelt. Die Phenolphase wurde durch Zentrifugieren (5000*g, 4°C für 10min) abgetrennt. Die überstehende DNA-Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 0,5ml Chloroform-Phenol-Mischung (1:1^{v/v}) gegeben und wieder kräftig

geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase wieder abgenommen und mit 0,5ml Chloroform versetzt. Nach Phasentrennung wurde die überstehende Phase in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufarbeitungskontrolle wurde zur intensiven Entfernung des Phenols noch zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt, wobei die Etherphase jeweils verworfen wurde. Die DNA-Lösungen werden mit 50 μ l Acetatpuffer versetzt und homogenisiert. Dann wurde die Lösung vorsichtig in vier Portionen mit insgesamt 1,1ml eiskalten Ethanol überschichtet und vorsichtig invertiert. An der Phasengrenze fiel die DNA als Faden aus. Die Fällung wurde über Nacht im Tiefkühler altern gelassen.

Die DNA wurde mit 4000*g für 10min bei 4°C pelletiert, mit 80% Ethanol aufgespült und erneut pelletiert. Nach vollständiger Entfernung der Waschlösung wurden 100 μ l Wasser hinzu gegeben und die DNA wieder solvatisiert. Die hochviskose Lösung wurde an der Sonotrode in eine niederviskose Lösung fragmentierter DNA überführt. Hiervon wurden 50 μ l abgenommen, mit 50 μ l AAS-Stabilisierlösung (0,02M HCl, 0,05%^{w/v} Triton-X-100, 0,05%^{w/v} EDTA Dinatriumsalz) versetzt und an der AAS vermessen. Kalibriert wird mit einer Matrix aus fragmentierter Lachssperma-DNA in einem Bereich von 0-0,05mg Pt/l. 25 μ l der restlichen DNA-Lösung wurde mit 975 μ l Wasser verdünnt zur DNA-Bestimmung eingesetzt.

Die Aufarbeitungskontrolle wurde in 500 μ l Wasser gelöst. Zur UV-Vis-Spektralphotometrie werden 400 μ l abgenommen und mit 1,6ml H₂O in der Küvette verdünnt. Es wurden die Parameter E_{260}/E_{280} (Sollwert >1,8), E_{260}/E_{230} (>2,2) und die Lage des Minimums bei 230nm (<231nm) überprüft. Der anhand E_{260} (160 μ M DNA =104mg/l entspricht einer Absorption von 1) ermittelte Gehalt wurde mittels Fluorimetrie bestätigt (Verdünnung 25 μ l+225 μ l H₂O).

Zur Prüfung auf RNA-Freiheit wurde eine Acridinorangefärbung von RNA durchgeführt. Dabei wurde 3 μ g/ml Acridinorange in Wasser einem Aliquot der Aufarbeitungskontrolle zugesetzt. In einem Fluorimeter wurde bei 460nm angeregt und die Fluoreszenz bei 650 gemessen.

Zur Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge wurden 25µl der vorbereiteten Lösungen in Reaktionsgefäße pipettiert. Daneben wurde eine Standardreihe ebenfalls einpipettiert, die im Reaktionsgefäß 0-2,5µg fragmentierter Lachssperma-DNA enthielt. Zur Hydrolyse der DNA wurden den Ansätzen 25µl 1M Perchlorsäure zugesetzt und bei 70°C auf einem Wasserbad für 20 Minuten inkubiert. Zu den abgekühlten Ansätzen wurde zur Fluoreszenzreaktion 50µl DABA-Reagenz zugegeben. Nach einer Stunde im Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion mit 1,3ml eiskalter 1M HCl abgestoppt. Von den Ansätzen wurden dreimal 350µl in eine 96-Loch-Schwarzplatte überführt. Die Messung erfolgte in einem Fluoreszenz-Plattenreader mit einem Anregungsfilter durchlässig für die Wellenlänge 405nm und einem Emissionsfilter durchlässig für die Wellenlänge 500nm mit einer Messzeit von 1 Sekunde pro Loch.

Die erhaltenen Messwerte wurden nach Berücksichtigung der Verdünnungen als pg Pt/µg DNA errechnet.

8.3.10 Mikroskopische Untersuchungen

8.3.10.1 Untersuchungen zur Zellmorphologie

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und drei Tage wachsen gelassen. Dann wurde das alte Medium abgesaugt und 2ml neues mit Substanz versetztes Kulturmedium hinzugefügt. Eine Kontrollgruppe pro Platte wurde ebenfalls mit frischem Kulturmedium versetzt, das nur das Lösungsmittel in der derselben Konzentration wie im Hauptversuch enthielt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Platten dem Brutschrank entnommen und die Morphologie der Zellen am Mikroskop mit Digitalkamera dokumentiert, indem mindestens drei repräsentative Zellgruppen aufgenommen wurden. Eine Nachbearbeitung der erhaltenen Fotos konnte mit Standardprogrammen wie Corel Photo-Paint erfolgen.

8.3.10.2 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation

Zur Beschichtung von autoklavierten Deckgläschen wurden diese in 24-Loch-Platten gegeben, so dass sie flach auf dem Boden anlagen. 200µl FCS wurden auf die Deckgläschen pipettiert und durch Schwenken wurde eine vollständige Bedeckung

gewährleistet. Die Platten wurden mindestens zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das FCS abgesaugt und die Deckgläschen kurz mit PBS gespült. Zu den frisch gespülten Deckgläschen werden 0,5ml Medium gegeben. Die Aussaat erfolgte mit $15 \cdot 10^4$ MCF-7 Zellen bzw. MDA-MB-231-Zellen. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank wurde das alte Medium abgesaugt und durch substanzhaltiges Kulturmedium ersetzt. Für die schlecht löslichen Verbindungen wurde das Kulturmedium analog wie für die Zellaufnahme der fluoreszenzmarkierten Verbindungen (Siehe Kap. 8.3.7.3) abgesättigt. Gegenfärbungen wurden wie folgt durchgeführt:

Endosomenfärbung: Substanzhaltiges Kulturmedium wurde 1h vor Inkubationsende mit $20 \mu\text{g/ml}$ Alexa-Fluor-488[®]-markiertem Transferrin (Molecular Probes) versetzt. Das bisherige Inkubationsmedium wurde abgesaugt und durch dieses Medium ersetzt.

Lysosomen- und Golgiapparatfärbung: Eine Stunde vor Inkubationsende wurde das bisherige Inkubationsmedium durch substanzhaltiges Medium mit einem Gehalt von 50nM LysoTracker Red[™] (Molecular Probes) bzw. 100nM BODIPY[®] TR Ceramide (Molecular Probes) ersetzt. Nach einer Stunde Inkubation wurde dieses Medium abgesaugt, durch substanzfreies Kulturmedium ersetzt und nochmals 30min nachinkubiert.

Zum erwünschten Abstopppunkt wurde das Medium abgesaugt und das Deckgläschen mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd-Lösung ($6\% \text{w/w}$ in Wasser) 20 Minuten lang fixiert. Nach Absaugen des Paraformaldehyd wird das Deckgläschen unter PBS gelagert. Um ein Objekt für die Mikroskopie zu erhalten, wurde ein Tropfen Fluoromount (Southern Biotech) auf einen Objektträger gegeben. Auf diesen Tropfen wurde das Deckgläschen mit der zellbehafteten Seite aufgelegt. Nach 1 Tag Lagerung bei Raumtemperatur waren die Objekte durchgehärtet und zur Mikroskopie geeignet.

Die Untersuchungen wurden an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (LSM510, Zeiss) von Herrn Dr. Schäfer durchgeführt.

8.3.11 Untersuchungen zur hydrolytischen Stabilität von Dendrimeren

8.3.11.1 pH-Wert-Stabilität

1mg/ml Dendrimer wurden in mehreren Puffern (0,1M Phosphatpuffer pH 2,7 bzw. pH 6,6 und 0,1M Tris pH 8,1) über 72h inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten mit 0,1M Phosphorsäure auf pH 2,7 gebracht. Der Gehalt an Dendrimer und das eventuelle Auftreten von Abbauprodukten wurde mit Kapillarelektrophorese detektiert (siehe System A Kap. 8.3.2).

8.3.11.2 Stabilität gegenüber Proteasen

1ml einer Dendrimer-Lösung (1mg/ml) wurden mit 1ml Proteasen-Lösung (Aktivität jeweils 20U) versetzt und bei 37°C über 72h inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote entnommen und mit 0,1M Phosphorsäure auf pH 2,7 gebracht. Für die Inkubation wurden die Enzymlösungen folgendermaßen hergestellt:

Papain: Nach Einwaage wurde Papain in einem Aktivierungspuffer (1mM EDTA-Dinatriumsalz und 10mM Cystein-Hydrochlorid in Phosphatpuffer 0,1M pH 6,6 gelöst) bei 37°C 10 Minuten lang inkubiert. Danach erfolgte direkt die Inkubation.

Chymotrypsin: Die Einwaage wurde in Phosphatpuffer (0,1M pH 6,6) gelöst, auf gewünschte Aktivität verdünnt und frisch zum Test eingesetzt.

Trypsin: Die Einwaage wurde in Tris-Verdaupuffer (0,1M pH 8,1) gelöst und verdünnt.

Pepsin: Die Einwaage wurde in Phosphatpuffer (0,1M pH 2,7) gelöst und verdünnt. Der Verdau konnte direkt im Autosampler (siehe System G siehe Kap. 8.3.2) durchgeführt werden oder Aliquote wurden eingefroren und kurz vor der Analyse wieder aufgetaut (siehe System A Kap. 8.3.2).

8.3.11.3 Inkubation mit Zytosol von MCF-7-Zellen

Gewinnung des Zytosols: Das Medium über konfluenten Zellen wurde abgesaugt. Nach Waschen mit 5ml PBS wurden die Zellen trypsiniert. Die Zellen wurden mit kaltem FCS-haltigem Medium aufgenommen, vereinzelt und in Zentrifugenröhrchen einpepeltiert (1,5 Zellkulturflaschen pro Zentrifugenröhrchen). Die Zellen werden ($2000 \times g$ $4^{\circ}C$ 5min) abzentrifugiert und in eiskalten PBS resuspendiert. Nach wiederholtem Abzentrifugieren wurde das Pellet mit 1ml eiskalten RSB-Puffer versetzt und suspendiert. Die Zellen lagerten dann 10min auf Eis und wurden durch 1min Schütteln (Vortex) lysiert.

Die Kerne wurden abzentrifugiert ($2000 \times g$ $4^{\circ}C$ 5min), der Überstand eingefroren und gefrieretrocknet.

Das Lyophilisat der Gefriertrocknung wurde in Verdau-Puffer (0,2%^{w/v} Triton-X-100, 10mM Cystein-Hydrochlorid, 2mM EDTA Dinatriumsalz, 0,1M Kaliumdihydrogenphosphat mit KOH auf pH 5,5 eingestellt) aufgenommen. Im Folgenden wurde wie bei anderen Proteasen verfahren, außer dass die Enzymaktivität mittels einer Verdaukontrolle ($G_0(\text{Met})_3$) standardisiert wurde.

Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen, auf pH 2,7 gebracht und kapillarelektrophoretisch analysiert (siehe System A Kap. 8.3.2)

8.3.11.4 Aktivitätskontrolle der Enzyme

Die Modellproteine Casein bzw. Bovines Serumalbumin (BSA) wurden eingewogen und im jeweiligen Puffer zu 40mg/ml gelöst. Das BSA wurde kurz vor Einsatz durch eine Zusatz von 10mM Cystein-Hydrochlorid zum jeweiligen Puffer und einstündiger Inkubation bei $60^{\circ}C$ reduziert. 50 μ l dieser Lösung wurden mit 50 μ l einer Enzymlösung versetzt. Hierbei wurden Pepsin, Papain und Chymotrypsin in einer Aktivität von 10U eingesetzt. Bei einem Blindwert wurde statt der Enzymlösung nur Puffer zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei $37^{\circ}C$ wurden 50 μ l abgenommen und mit 950 μ l 0,1M Borat-Puffer pH 9,6 verdünnt und zur kapillarelektrophoretischen Messung eingesetzt (siehe System B Kap. 8.3.2). Casein wurde im jeweiligen Puffer aufgelöst, indem es kurzzeitig

auf 90°C erhitzt wurde. Mit diesem Protein konnte nach demselben Protokoll wie für das BSA die Verdauevaluation für das Trypsin, Papain und Chymotrypsin durchgeführt werden.

Zur Testung auf Aktivitätsverlust unter Dendrimereinwirkung wurde nach eintägiger Inkubation der Enzyme mit den Dendrimern analog der Verdauevaluation von diesen Ansätzen ebenfalls 50µl entnommen und wie oben beschrieben mit den Proteinen inkubiert.

8.3.12 Fluoreszenzcharakterisierung

Alle dansylierten Dendrimere wurden in Ethanol mit einer Konzentration von 0,5µM vermessen (Ausnahme G₁(Dan)₃(DapPtX₂)₂(Dap)₁ mit X=Cl,I in 2µM Lösung analysiert) Bei ausreichender Löslichkeit wurden die Verbindungen ebenfalls in verschiedenen wässrigen Lösungen charakterisiert. Dazu wurden die Verbindungen nach Vorlösen in Ethanol in diese Lösungen eingebracht, so dass der Ethanolgehalt 1% nicht überstieg. Die Fluoreszenzeigenschaften wurden in Wasser, in Zelllysat bzw. in TET-Puffer, in HSA-Lösung (1mg/ml in Wasser) und in Lachssperma-DNA-Lösung (1mg/ml in Wasser) ermittelt. Diese Bestimmungen wurden in einer Quarzküvette an einem Spektrofluorimeter durchgeführt.

8.3.12 Kapillarelektrophoretische Reaktivitätsuntersuchungen zu Platinverbindungen

8.3.12.1 Umsetzung DMSO-Komplexe zu Chlorokomplexe

Die DMSO-Komplexe sowie die korrespondierenden Chlorokomplex-Standards wurden eingewogen und zu 2mg/ml in Wasser gelöst.

Von den DMSO-Komplexen wurde zur Inkubation 75µl entnommen und mit 75µl Dulbecco's Puffer oder EMEM-Basalmedium versetzt. Ein Start- und Blindwert wurde erstellt, indem der Dulbecco's Puffer bzw. das EMEM-Basalmedium durch Wasser ersetzt wurde. Dazu wurden 150µl Laufpuffer (0,02M Phosphatpuffer pH 2,7) gegeben

und Partikelfreiheit mittels Zentrifugation hergestellt. Nach dem Überführen in Probengefäße wurden diese in den auf 37°C temperierten Autosampler der Kapillarelektrophorese gestellt und in regelmäßigen Abständen beprobt. Das Produktspektrum wurde mittels System C (siehe Kap. 8.3.2) aufgetrennt.

8.3.12.2 Untersuchungen zur Umsetzung von Diaquakomplexen

Der Komplex **m-4F-Pt-H₂O-SO₄** wurde eingewogen und in Wasser zu 2,5mg/ml und in DMF zu 12,5mg/ml gelöst. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden 30µl der DMF-Lösung mit 120µl Wasser verdünnt bzw. 150µl des in Wasser gelösten Komplexes mit 150µl Laufpuffer (0,02M Phosphatpuffer pH2,7) versetzt. Nach Zentrifugation zur Sicherstellung der Partikelfreiheit wurde diese Lösung vermessen (siehe System C Kap. 8.3.2).

Für die Stabilität in physiologischer Kochsalzlösung wurde 75µl Kochsalzlösung (0,9% w/v NaCl) mit 75µl Substanzlösung in Wasser beziehungsweise mit 30µl Substanzlösung in DMF und 45µl Wasser versetzt und inkubiert. Kurz vor der Messung wurde dem jeweiligen Ansatz 150µl Laufpuffer (0,02M Phosphatpuffer pH 2,7) zugesetzt und störende Präzipitate abzentrifugiert.

Für die Detektion möglicher neutraler und anionischer Spezies wurden die Systeme D, E und F (siehe Kap. 8.3.2) angewandt. Dazu wurden 30µl der DMF-Lösung mit 270µl des jeweiligen Laufpuffers bzw. 150µl der wässrigen Lösung mit 150µl des jeweiligen Laufpuffers versetzt.