

Analytik intrazellulärer Reaktionsprodukte antitumoraler Platinkomplexe

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen

der Technischen Universität Dortmund

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

M. Sc. Robert Zabel

aus

Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Albert Sickmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Dortmund 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cisplatin	1
1.1.1 Wirkmechanismus.....	2
1.1.2 Resistenzen	5
1.1.3 Analytik von Cisplatin	7
1.2 Kapillarelektrophorese	10
1.2.1 Theoretische Grundlagen.....	10
1.2.1.1 Elektrophorese.....	10
1.2.1.2 Elektroosmose	12
1.2.1.3 Trennprinzip und effektive Mobilität	14
1.2.2 Instrumenteller Aufbau	16
1.2.3 Kapillaren	18
1.2.4 Probenaufgabe.....	19
1.3 Massenspektrometrie	21
1.3.1 Ionenquelle	21
1.3.1.1 Elektrospray-Ionisation.....	21
1.3.1.2 dielektrisch behinderte Elektrospray-Ionisation	25
1.3.2 Analysator	26
1.3.3 Detektor	28
1.3.4 Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie	29
1.4 EC/ESI-MS (ROXY)	31
2. Zielsetzung	33
3. Material und Methoden	34

3.1 Materialien.....	34
3.1.1 Chemikalien	34
3.1.2 Geräte	36
3.1.3 Software	36
3.1.4 Puffer und Reagenzien	37
3.2 Methoden	38
3.2.1 Grundsätzliche Arbeitsweise	38
3.2.2 Synthese und Aufreinigung des CFDA-Pt-Cl ₂	39
3.2.3 Deacetylierung des CFDA-Pt-Cl ₂	39
3.2.4 Herstellung der CF-Pt-Komplexe	39
3.2.5 Zellkultur, -lyse und Proteinbestimmung	40
3.2.6 Probenvorbereitung.....	41
3.2.7 Kapillarelektrophoretische Arbeiten.....	42
3.2.7.1 Kapillarelektrophorese	42
3.2.7.2 Kapillaren.....	42
3.2.7.3 Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierten Fluoreszenz Detektion	43
3.2.7.4 Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion	45
3.2.8 CE-DB-ESI-MS	47
3.2.9 EC-MS (ROXY)	49
4. Ergebnisse und Diskussion.....	50
4.1 CFDA-Pt-Cl₂	50
4.2 Methodenentwicklung und -optimierung CE-LIF	52
4.2.1 Reaktionsverhalten von CFDA-Pt-Cl ₂ gegenüber Pufferbestandteilen.....	53
4.2.2 Hintergrundelektrolyt	58

4.2.2.1 pH-Wert	58
4.2.2.2 Puffersubstanz	59
4.2.2.3 Optimierung der Phosphatkonzentration im BGE (CE-LIF).....	60
4.2.2.4 Zusatz von organischen Lösungsmitteln im BGE (CE-LIF).....	62
4.2.3 EOF-Marker	63
4.2.4 Empfindlichkeit CE-LIF	65
4.3 Methodenentwicklung und -optimierung CE-MS.....	66
4.3.1 Hintergrundelektrolyt	67
4.3.2 Optimierung der MS-Parameter	68
4.3.3 Kopplung Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer	69
4.3.3.1 Sheath Liquid.....	70
4.3.3.2 CE-MS-Kopplung mittels dielektrisch behindertem Elektrospray	72
4.3.4 Empfindlichkeit CE-MS	75
4.4 Synthese und Reinheit des CFDA-Platins.....	77
4.5 Reaktionsverhalten von CFDA-Pt-Cl₂ mit organischen Liganden.....	81
4.5.1 CFDA-Pt-Cl ₂	83
4.5.2 CFDA-Oxaliplatin	87
4.6 Probenvorbereitung	92
4.6.1 Zellkultur	92
4.6.2 Zelllyse	94
4.6.3 Probenstabilität	97
4.6.4 Proteinfällung	104
4.6.5 Prüfung auf Kontaminationen während der Zelllyse	106
4.6.6 Optimierter Arbeitsablauf	108

4.7 Zellkulturversuche mit CFDA-Pt-Cl₂	111
4.7.1 CF-Pt-Cl ₂ im Cytosol	111
4.7.2 Vergleich beider Zelllinien	115
4.7.3 Efflux von CF-Pt-Komplexen	118
4.7.4 Zeitlicher Verlauf der Verteilung von CF-Pt-Komplexen im Cytosol	121
4.7.5 Zusammenfassung der Zellkulturversuche mit CFDA-Pt-Cl ₂	123
4.8 Einfluss von Cisplatin auf das Redoxverhalten schwefelhaltiger Liganden	129
5. Zusammenfassung	136
6. Summary	137
7. Literaturverzeichnis	138
8. Danksagung	155
9. Anhang	156
9.1 Lebenslauf	156
9.2 Publikationen	158
9.3 Tagungsbeiträge	158

Abkürzungsverzeichnis

A2780	Humane Ovarialkarzinom-Zelllinie
A2780cis	Cisplatin-resistente humane Ovarialkarzinom-Zelllinie
ACN	Acetonitril
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
BGE	Hintergrundelektrolyt (engl. <i>background electrolyte</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
CE	Kapillarelektrophorese (engl. <i>capillary electrophoresis</i>)
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (engl. <i>capillary zone electrophoresis</i>)
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenz Detektion
CE-MS	Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion
CF	Carboxyfluorescein
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
CFMA	Carboxyfluoresceinmonoacetat
DB-ESI	dielektrisch behinderte Elektrosprayionisation
DAD	Dioden-Array-Detektor
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC-MS	Elektrochemie mit massenspektrometrischer Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrosprayionisation
FDA	engl. <i>US Food and Drug Administration</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPA	Isopropylalkohol
ITP	Isotachophorese
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz (engl. <i>laser-induced fluorescence</i>)
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NACE	nicht-wässrige Kapillarelektrophorese (engl. <i>non-aqueous capillary electrophoresis</i>)
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid-Ester
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (eng. <i>phosphate buffered saline</i>)
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (eng. <i>tris buffered saline</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

Cisplatin ist seit mehr als 30 Jahren ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen. Die in dieser Zeit erfolgte Forschungsarbeit führte, insbesondere durch Erkenntnisse über die zellulären Mechanismen von Cisplatin, zur stetigen Verbesserung der Therapiemöglichkeiten. Darüber hinaus sind aber auch heute noch einige Fragen, z.B. über den zellulären Verbleib von Cisplatin oder über die Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Cisplatin, nur unzureichend beantwortet. Die folgenden Seiten geben im Kapitel 1.1 einen kurzen Überblick über den heutigen Stand der Kenntnis bezüglich des Cisplatins einschließlich der angewandten analytischen Methoden. In Kapitel 1.2 und 1.3 folgt eine einleitende Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Techniken und Methoden.

1.1 Cisplatin

Ausgangspunkt für die Entdeckung des zytotoxischen Effektes von Cisplatin bildet eine Entdeckung Barnett Rosenbergs in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Er untersuchte den Einfluss des elektrischen Feldes auf das Verhalten von *Escherichia coli*-Bakterien und konnte dabei ein übermäßiges Längenwachstum und Filamentbildung beobachten [1]. Er erkannte, dass dies nicht auf das elektrische Feld, sondern auf Diammintetrachloroplatin(IV) zurückzuführen ist [2]. Dieser Platinkomplex bildete sich als Elektrolyseprodukt während des Versuches aus den verwendeten Platinelektroden und Ammoniumchlorid in der Lösung. In weiteren Untersuchungen wurde schließlich cis-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin) entdeckt und dessen zytostatische Wirkung erkannt. [3]. Abbildung 1.1 zeigt die chemische Struktur von Cisplatin.

Mit der Zulassung von Cisplatin durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) 1978 in den USA [4] wurde Cisplatin zu einem wichtigen Medikament in der Therapie verschiedenster Krebserkrankungen [5]. Insbesondere zeichnet sich Cisplatin bei der

Behandlung des Ovarialkarzinoms und von Hodentumoren aus und findet auch heute, zum Teil in Kombination mit anderen Medikamenten, noch entsprechenden Einsatz [6, 7, 8].

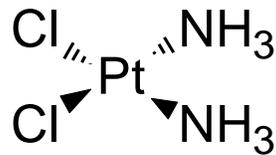


Abbildung 1.1 Strukturformel von Cisplatin

Aus der Entdeckung von Cisplatin folgte die Entwicklung weiterer Platinkomplexe mit zytostatischer Wirkung [9]. Neben Cisplatin zählen Carboplatin und Oxaliplatin zu den wichtigsten Vertretern dieser Klasse. Insbesondere Oxaliplatin weist im Vergleich zu Cisplatin ein verändertes Wirkspektrum und Toxizitätsprofil auf [10].

1.1.1 Wirkmechanismus

Mit der ausschließlich intravenösen Applikation gelangt Cisplatin in den Blutkreislauf und wird im Körper verteilt. Im Blut wird bereits ein großer Teil des Cisplatins an Plasmaproteine (z.B. Albumin) [11] gebunden. Die Aufnahme in die Zellen verläuft zum einen passiv durch Diffusion und zum anderen aktiv durch Transporter [12, 13, 14, 15]. Eine Aufnahme erfolgt auch über Ionenkanal-Rezeptoren [16].

Im Cytoplasma kommt es aufgrund der im Vergleich zur extrazellulären Matrix geringeren Chloridkonzentration zur Hydrolyse des Cisplatins unter Abspaltung der beiden Chloro-Liganden. Es entsteht ein pH-abhängiges Gleichgewicht aus reaktiven Aqua- und Hydroxo-Komplexen (Abbildung 1.2). Dieses Modell wird allgemein als die Bioaktivierung des Cisplatins beschrieben [17, 18, 19]. Insbesondere die positiv geladenen Aqua-Komplexe stellen hochreaktive Elektrophile dar, die mit entsprechenden nukleophilen Strukturen im Cytoplasma reagieren können. Auch auf

Grund der nachgewiesenen Plasmaproteinbindung [11] ist aber davon auszugehen, dass die Hydrolyse von Cisplatin auch außerhalb des Cytoplasmas stattfindet bzw. der Dichloro-Komplex auch direkt, z.B. mit freien Thiolgruppen oder Thioethern, reagieren kann.

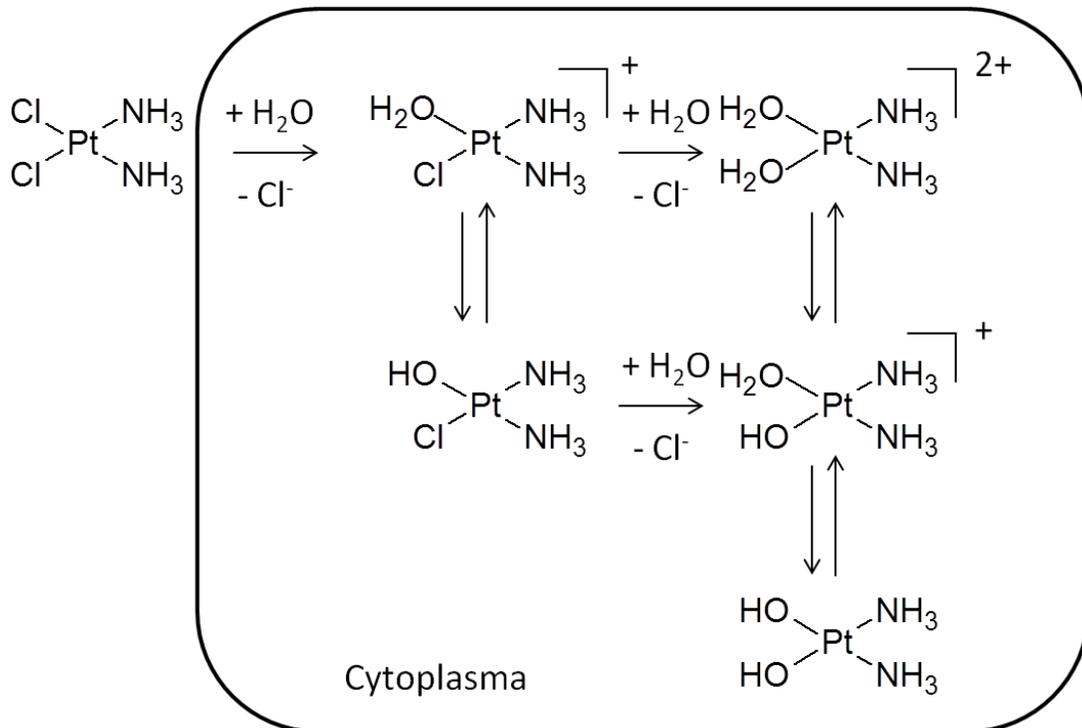


Abbildung 1.2: Intrazelluläre Hydrolyse von Cisplatin

Den eigentlichen pharmakologisch bedeutenden Wirkort stellt der Zellkern da. Nur rund ein Prozent des applizierten Cisplatins bildet dabei Addukte mit den Nukleotiden der Desoxyribonukleinsäure (DNS) [20, 21]. Dies führt zu einer Störung der Helix-Struktur. Kann der Schaden an der DNS nicht repariert werden, führt das zur Einleitung der Apoptose, des programmierten Zelltodes [4, 22, 23].

Bevorzugt findet die Bindung des Platins am Stickstoffatom in Position 7 und 3 des Guanins und Adenins statt [4, 24]. Das Cisplatin kann eine Bindung mit einer Nukleinbase (monofunktional) oder mit zwei Nukleinbasen (bifunktional) eingehen. Bei den bifunktionalen Addukten können beide Nukleinbasen auf einem DNS-Strang (*intrastrand crosslinks*) oder je eine auf den beiden komplementären Strängen

(*interstrand crosslinks*) liegen. Den überwiegenden Teil der DNS-Addukte von Cisplatin machen bifunktionale *intra crosslinks* aus. Nur ca. 5 % der Addukte sind *interstrand crosslinks* oder monofunktionale Addukte [4, 25].

Die Bildung von DNS-Addukten mit dem daraus resultierendem Zelltod ist jedoch nicht nur in Krebszellen zu beobachten, sondern betrifft auch gesunde, nicht veränderte Zellen. Die Intensität der Wirkung hängt unter anderem von der Teilungsrate der Zellen ab. Zellen mit einer hohen Teilungsrate – dazu zählen auch Zellen vieler Krebsarten – sind in einem höheren Ausmaß von der Wirkung des Cisplatin betroffen. Die zum Teil schweren Nebenwirkungen der Chemotherapie mit Cisplatin gehen somit unter anderem auf die fehlende Selektivität für das Tumorgewebe zurück [26, 27]. Ein weiterer Grund ist in der geringen Verteilungs-Selektivität des Cisplatins zu finden.

Untersuchungen zufolge bildet nur rund ein Prozent des applizierten Cisplatins die für die pharmakologische Wirkung relevanten Addukte mit der DNS [20, 21]. Zayeda et al. konnten zeigen, dass nur rund 9 % des intrazellulären Platins im Zellkern nachzuweisen ist. Rund 17 % des Platins finden sich in der Membranfraktion und 4 % in der cytoskelettalen Fraktion. Die überwiegende Mehrheit des intrazellulären Platins (rund 70 %) konnte im Cytosol nachgewiesen werden [28]. Als wichtiger Reaktionspartner des Platins mit niedermolekularen Bestandteilen des Zytoplasmas wurde insbesondere Glutathion beschrieben [29, 30]. Glutathion ist ein Tripeptid, welches aufgebaut ist aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein. Mit einer freien Thiol-Gruppe und einer intrazellulären Konzentration im unteren mM-Bereich spielt es eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung, insbesondere von elektrophilen Spezies [31].

Die gefundenen Ergebnisse bezüglich der Bindung des Cisplatins an Glutathion sind jedoch uneindeutig. So konnten Kasherman et. al bei der Inkubation eines Zellextraktes mit Cisplatin keine Addukte mit Glutathion finden. Rund zwei Drittel der gefundenen Platinaddukte hatten dabei ein Molekulargewicht über 3 kDa. Erst bei der Inkubation der

niedermolekularen Fraktion des Zellextraktes (< 3 kDa) konnten Addukte von Platin und Glutathion nachgewiesen werden [32].

Wahrscheinlich sind somit auch Reaktionen des Cisplatins mit cytosolischen Proteinen [12]. Dies gilt besonders für Proteine in deren Sequenz sich viel Methionin und Cystein findet, z.B. Metallothionine [33, 34]. Hierbei stellen die Thiolgruppe und der Thioether wichtige Bindungsstellen für Platinkomplexe dar [35]. In weiteren Modellversuchen sind auch Reaktionen des Cisplatins mit anderen niedermolekularen Komponenten des Cytoplasma, wie z.B. mit Aminosäuren, kleineren Peptiden oder weiteren Nukleophilen beschrieben [36, 37, 38]. Die geschilderten Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung von systematischen Untersuchungen der Entstehung und Verteilung von Platinspezies im Cytoplasma. Hier finden sich der überwiegende Teil des intrazellulären Platins und eine Vielzahl potentieller Bindungspartner. Um an den postulierten Wirkort im Zellkern zu gelangen, muss das Platin durch das Cytoplasma. Von besonderem Interesse ist auch welche Platinspezies an den Wirkort gelangen. Sind es die aus der Reaktion mit Wasser hervorgegangenen sehr reaktiven Aqua- und Hydroxokomplexe oder der weniger reaktive Dichlorokomplex? Vorstellbar ist aber auch, dass die Reaktion des Platins mit Bindungspartner keine endgültige Inaktivierung darstellt sondern nur einen Übergangszustand, aus dem Platinspezies in einem weiteren Schritt wieder freigesetzt werden [39].

1.1.2 Resistenzen

Neben den unerwünschten Wirkungen beschränken Resistenzen - der Krebszellen gegen Cisplatin - dessen Einsatz. Diese können bereits vor dem Beginn der Behandlung mit Cisplatin vorliegen (intrinsisch) oder während der Behandlung entstehen [40]. Betrachtet man die Ursache für die Bildung von Resistenzen in Bezug auf die Frage, was passiert vor bzw. nach der Platinierung der DNS, lassen sich vereinfacht zwei allgemeine Prinzipien finden: Verringerung der Konzentration reaktiver Platinkomplexe

am Wirkort (vor der Platinierung der DNS) und ein veränderter Umgang der Zelle mit den DNS-Addukten (nach der Platinierung der DNS) [41, 42].

Der veränderte Umgang der Zellen mit den Platinaddukten kann unter anderem auf eine erhöhte Toleranz oder Reparatur der DNS-Addukte und auf Veränderungen der Zellzykluskontrolle zurückgehen [40, 43]. Die Verringerung der Konzentration reaktiver Platinkomplexe am Wirkort geht auf eine Abnahme der intrazellulären Akkumulation von Cisplatin zurück. Diese kann durch eine erniedrigte Aufnahme (Influx) und/oder einer erhöhten Ausschleusung (Efflux) aus den Zellen hervorgerufen werden [44, 45].

Eine weitere Erklärung für eine niedrigere Konzentration reaktiver Platinkomplexe ist eine vermehrte Reaktion mit (nukleophilen) zellulären Bestandteilen und einer damit einhergehenden Inaktivierung. Insbesondere Glutathion (GSH) stellt einen wichtigen Reaktionspartner dar [29]. Höhere intrazelluläre Gehalte von Glutathion in Krebszelllinien konnten auch mit dem Auftreten von Resistenzen assoziiert werden [46]. Darüber hinaus können die Platinkomplexe auch mit anderen nukleophilen Strukturen z.B. in Proteinen reagieren.

Systematische Untersuchungen der Entstehung und Verteilung von Platinspezies im Cytoplasma können wertvolle Hinweise auf mögliche Ursachen für Resistenzen gegenüber Cisplatin geben. Von besonderem Interesse sind hierbei zum einen qualitative Aspekte, d.h. die Frage, ob sich im Cytoplasma sensitiver und resistenter Zellen die gleichen Platinspezies finden oder ob Unterschiede hinsichtlich der Metabolisierung (z.B. bei der Reaktion mit Glutathion) existieren. Darüber hinaus können quantitative Unterschiede auf veränderte Efflux- bzw. Influxmechanismen hinweisen.

1.1.3 Analytik von Cisplatin

Um ein genaueres Bild über den intrazellulären Verbleib von Cisplatin zu erlangen, ist es notwendig, Komplexe von Platin mit zellulären Bestandteilen zu charakterisieren und zu quantifizieren. Seit Cisplatin Eingang in die Behandlung diverser Krebserkrankungen gefunden hat, sind eine Vielzahl verschiedener analytischer Methoden entwickelt worden, um Cisplatin und dessen Metabolite in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten und Geweben zu bestimmen oder dessen Reaktionsverhalten zu untersuchen. Wichtige Anforderungen an die Methoden sind vor allem eine hohe Empfindlichkeit, um Platin(komplexe) auch noch in geringen Konzentrationen zu bestimmen, und die Möglichkeit strukturelle Informationen (über die Liganden) zu gewinnen.

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) des Platinisotopes ^{195}Pt bietet eine gute Möglichkeit Information über die Oxidationsstufe des Platin und strukturellen Hinweise auf die Bindungspartner des Platins zu erlangen. Durch das geringe gyromagnetische Verhältnis und die natürliche Häufigkeit des Isotops von nur ca. 34 %, ist diese Methodik jedoch sehr unempfindlich [47, 48, 49]. Durch die NMR-Spektroskopie des Stickstoffisotops ^{15}N , von entsprechend markierten Platinkomplexen, können Informationen über die in trans-Position zum ^{15}N -markierten Amminliganden liegenden Liganden gewonnen werden. Auch diese Methodik ist eher wenig empfindlich. Darüber hinaus müssen die Amminliganden am Platin gebunden bleiben und dürfen nicht während der Reaktion ausgetauscht werden [50, 51, 52].

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bietet wiederum die Möglichkeit einer sehr selektiven und genauen quantitativen Bestimmung von Platin [53]. Verschraagen et. al berichten über Nachweisgrenzen von 60 nM für Cisplatin und 87,5 nM für den Monoaquakomplex von Cisplatin [54]. Der entscheidende Nachteil dieses Verfahrens ist, dass hierbei keine strukturellen Informationen gewonnen werden und somit auch keine Aussagen über die Liganden des Platins getroffen werden können. Eine Identifizierung

bekannter Platinkomplexe ist z.B. über deren Retentionszeiten bei vorangestellter chromatographischer Trennung möglich [52].

Dies gilt auch für eine weitere analytische Methode, die eine sehr sensitive Bestimmung von Platin ermöglicht: Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS). Diese Methode wurde vielfältig für die quantitative Bestimmung der zellulären Aufnahme von Platinkomplexen oder deren Bindung an die DNS oder subzellulärer Kompartimente, mit Nachweisgrenzen von bis zu 0,65 ng/l, genutzt. Eine Unterscheidung der Oxidationsstufe des Platins oder eine Identifizierung der Liganden ist nicht möglich [55, 56, 57].

Werden für die Massenspektrometrie schonendere Ionisierungsmethoden wie z.B. die Elektrosprayionisierung (ESI) genutzt, kann Platin nicht nur sensitiv detektiert werden, sondern es besteht auch die Möglichkeit strukturelle Information über die Liganden zu gewinnen [52, 58]. Von Bedeutung ist hierbei auch das charakteristische Isotopenmuster des Platins. Dieses kann speziell bei der Identifizierung von Platinkomplexen mit niedermolekularen Liganden sehr hilfreich sein [49, 59]. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Massenspektrometrie ist die Möglichkeit der Kopplung mit chromatographischen oder elektrophoretischen Trennverfahren. Dies kann insbesondere die Identifizierung von Platinverbindungen aus komplex zusammengesetzten Proben, wie z.B. Zelllysaten, erleichtern [58].

Die Verbindung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und ESI-MS fand und findet vielfältigen Einsatz bei der Bestimmung von Platinkomplexen und deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten, Geweben oder in Modellversuchen und Untersuchungen der Reaktionskinetik [60, 61, 62]. Bezüglich der Komplexstabilität ist bei der HPLC die notwendige Wechselwirkung mit einer stationären Phase zu beachten, die die Gefahr des Zerfalls vornehmlich instabilerer Komplexverbindungen erhöht.

Eine weiteres wichtiges analytisches Trennverfahren für Platin- und allgemein für Metallkomplexe sind kapillar(zonen)elektrophoretische Methoden. Diese kommen ohne den Zusatz von organischen Lösungsmitteln und stationären Phasen aus und ermöglichen schnelle Trennungen mit einer hohen Trennschärfe. Darüber hinaus können, durch das geringe Injektionsvolumen von einigen nl, auch aus kleinen Probenvolumina viele Analysen durchgeführt werden [63, 64, 65]. Die Kapillar(zonen)elektrophorese fand unter anderem Einsatz bei der Bestimmung von Cisplatin und dessen Metaboliten, Untersuchungen bezüglich der Reaktionskinetiken von Platinkomplexen oder deren Reaktionsverhalten gegenüber Proteinen [66, 67].

Neben den klassischen Detektionsmöglichkeiten der Kapillar(zonen)elektrophorese (UV- bzw. DAD-Detektoren) bietet die massenspektrometrische Detektion auch die Möglichkeit der eindeutigen Identifizierung von unbekanntem Spezies [68, 69]. Die Kombination aus kapillar(zonen)elektrophoretischen Trennmethoden und der Detektion der Laser-induzierten Fluoreszenz erlauben eine sehr empfindliche Bestimmung, mit Nachweisgrenzen von einigen amol [70, 71, 72, 73]. Dies setzt jedoch voraus, dass die Analyten eine fluorophore Gruppe besitzen, was bei den medizinisch genutzten Platinkomplexen nicht der Fall ist, oder durch Derivatisierung erhalten.

Um die hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion nutzen zu können, wurden verschiedene fluoreszierende Analoga für platinhaltige Zytostatika synthetisiert. Als Fluorophore werden unter anderem Derivate des Fluoreszeins (CFDA) oder des Bordipyromethan (BODIPY) verwendet, die im Allgemeinen über ein oder zwei Aminogruppen an das Platin gebunden werden. Genutzt werden diese fluoreszierenden Platinanaloga hauptsächlich um die zelluläre Verteilung von Platin mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Bei ihrer Verwendung ist zu beachten, dass der Fluorophor auch am Platin gebunden bleibt ohne dessen Komplexchemie wesentlich zu verändern. Darüber hinaus sollte auch sichergestellt sein, dass eventuelle Nebenprodukte der Synthese, insbesondere fluoreszierende, vor dem Einsatz entfernt werden [49, 74, 75].

1.2 Kapillarelektrophorese

1.2.1 Theoretische Grundlagen

Der Begriff Kapillarelektrophorese (CE) wird im Allgemeinen als Oberbegriff für alle elektrophoretischen Methoden in Kapillaren verwendet und beinhaltet verschiedene analytische Verfahren, z.B. Kapillarzonenelektrophorese (CZE), Isotachophorese (ITP) oder Isoelektrische Fokussierung (IEF). In dieser Arbeit (wenn nicht anders angegeben) wird im Wesentlichen die CZE verwendet, die eine Kombination von Elektrophorese und Elektroosmose darstellt.

1.2.1.1 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Positiv geladene Teilchen bewegen sich zur Kathode und negativ geladene zur Anode. Die Geschwindigkeit v dieser Bewegung lässt sich ganz allgemein wie folgt beschreiben:

Gleichung 1:
$$v = \mu_{el} \cdot E$$

Das elektrische Feld E ergibt sich aus der Länge der Kapillare und der angelegten Spannung. Die elektrophoretische Mobilität μ_{el} ist eine stoffspezifische Konstante für das Teilchen im gegebenen Medium. Die Geschwindigkeit kann aber auch als das Resultat zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte, die auf die Teilchen einwirken, beschrieben werden. Beschleunigt werden die Ionen durch die elektrische Kraft F_{el} . Diese ist abhängig von der Ladung q der Teilchen und dem elektrischen Feld E (Gleichung 2).

Gleichung 2:
$$F_{el} = q \cdot E$$

Der elektrischen Kraft wirkt die Reibungskraft F_R entgegen. Diese ist abhängig von Radius r und der Geschwindigkeit v der Teilchen und der Viskosität η des Mediums (Gesetz von Stokes)(Gleichung 3).

Gleichung 3:
$$F_R = 6\pi \cdot r \cdot v \cdot \eta$$

Da die Reibungskraft aber mit der Geschwindigkeit zunimmt, wird das Ion nur solange beschleunigt, bis der Betrag beider Kräfte – bei entgegengesetzter Richtung - gleich groß ist und sich eine konstante Geschwindigkeit einstellt. Setzt man Gleichung 2 und 3 gleich, kann durch Umstellen der Gleichung die Geschwindigkeit v der Bewegung ermittelt werden:

Gleichung 4:
$$v = \frac{q \cdot E}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

Aus Gleichung 4 lässt sich erkennen, dass die Geschwindigkeit proportional zur Ladung des Ions und über das elektrische Feld auch proportional zur angelegten Spannung ist. Setzt man nun Gleichung 4 in Gleichung 1 ein, erhält man für die elektrophoretische Mobilität:

Gleichung 5:
$$\mu_{el} = \frac{q}{6\pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{v}{E}$$

Das Vorzeichen der elektrophoretischen Mobilität zeigt die Bewegungsrichtung des Teilchens an. Die elektrophoretische Mobilität ist somit zum einen abhängig von äußeren Faktoren wie dem elektrischen Feld und der Viskosität des Mediums und zum anderen von stoffspezifischen Eigenschaften wie Ladung und dem Radius. Damit lassen sich auch die prinzipiellen Trennmechanismen der Elektrophorese erklären. Unterschiedliche Stoffe migrieren je nach Vorzeichen der Ladung in unterschiedliche Richtungen und aufgrund der spezifischen Verhältnisse von Ladung und Radius mit

verschiedenen Geschwindigkeiten. Je höher die Ladung desto schneller ist die Migration und je größer die Teilchen desto langsamer.

1.2.1.2 Elektroosmose

Ein weiterer für die Kapillarelektrophorese wichtiger Prozess ist die Elektroosmose. Ausgangspunkt für die Beschreibung der Elektroosmose ist die Grenzfläche zwischen der Kapillaroberfläche und der in der Kapillare enthaltenen Flüssigkeit. Bei der Verwendung von Kieselglaskapillaren befinden sich an der Oberfläche der Kapillare Silanolgruppen (pK_s : 3,5 – 8,2 [76]), die in protischen Medien mit steigendem pH-Wert deprotoniert werden und damit an der Oberfläche der Kapillare einen Überschuss negativer Ladungen erzeugen. Durch elektrostatische Anziehung lagern sich Solvens-Moleküle und (solvatisierte) Kationen aus dem Medium an der Oberfläche an. Dies führt zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht. Diese ist aus einer starren direkt an der Kapillarwand sitzenden Schicht (Helmholtz-Schicht) gefolgt von einer diffusen Schicht (Gouy-Chapman-Schicht) aufgebaut.

Die Helmholtz-Schicht lässt sich wiederum unterteilen in eine innere und eine äußere Helmholtz-Schicht. Die innere Helmholtz-Schicht reicht bis zum Mittelpunkt der ersten Lage adsorbierter Moleküle, dies können Solvens-Moleküle aber auch (teilweise) desolvatisierte Teilchen aus der Lösung sein. Die folgende äußere Helmholtz-Schicht erstreckt sich bis zum Mittelpunkt der ersten Lage solvatisierter Kationen. In der sich anschließenden Gouy-Chapman-Schicht besteht ebenfalls ein Überschuss an (solvatisierten) Kationen, wobei deren Ordnung, durch die mit der Entfernung abnehmenden elektrostatischen Anziehung durch die Kapillaroberfläche, lockerer ist und die Diffusion eine größere Rolle spielt. Die Konzentration der (solvatisierten) Kationen nimmt in der diffusen Schicht zur Kapillarmitte hin ab. Durch die Ladungsverschiebung in der Doppelschicht kommt es zur Ausbildung eines Potentials

zwischen der Kapillaroberfläche und dem Medium. In der starren Schicht nimmt dieses Potential linear, in der diffusen exponentiell zur Kapillarmitte hin ab.

Wird nun an den beiden Enden der Kapillare eine Spannung angelegt, beginnen die im Überschuss vorliegenden (solvatisierten) Kationen der diffusen Schicht in Richtung der Kathode zu wandern. Über deren Hydrathüllen wird diese Bewegung auf die gesamte Flüssigkeitssäule übertragen. Den daraus resultierenden Fluss bezeichnet man als elektroosmotischen Fluss (EOF). Dieser bewegt sich mit einem stempelartigen Profil und der Geschwindigkeit v_{EOF} durch die Kapillare in Richtung der Kathode. Diese Bewegung hat wiederum Einfluss auf die Ausbildung der elektrischen Doppelschicht und es entsteht eine Scherebene zwischen der sich bewegenden Flüssigkeitssäule und der Kapillarwand. Das Potential an dieser Ebene wird als Zeta-Potential bezeichnet und ist abhängig vom Potential an der Kapillaroberfläche und damit über den Deprotonierungsgrad der Silanolgruppen vom pH-Wert des Mediums. Auch die Ionenstärke des Elektrolyts hat einen Einfluss auf das Zeta-Potential. Die Geschwindigkeit des EOFs kann mit der Smoluchowski-Gleichung beschrieben werden:

Gleichung 6:
$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta}$$

Einfluss auf die Stärke des EOFs hat neben dem Zeta-Potential (ζ), der Dielektrizitätskonstante ε und der Viskosität η des Mediums vor allem das elektrische Feld E , das sich aus der Länge der Kapillare und der angelegten Spannung ergibt. Je höher die angelegte Spannung desto größer der EOF.

1.2.1.3 Trennprinzip und effektive Mobilität

Wie bereits beschrieben, geht die Trennung von Substanzen mittels Kapillarelektrophorese auf unterschiedliche Verhältnisse zwischen der Größe (Masse) und der Ladung der Analyten und der Stärke des EOFs zurück. Die Gesamtgeschwindigkeit v_{ges} mit der die Analyten durch die Kapillare wandern, ist die Summe aus der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit v_{el} und der Geschwindigkeit des EOF v_{EOF} :

Gleichung 7:
$$v_{\text{ges.}} = v_{\text{el}} + v_{\text{EOF}}$$

Ist der EOF stark genug ($|v_{\text{EOF}}| > |v_{\text{el}}|$), wandern auch die Anionen in Richtung der Kathode. Die neutralen Teilchen werden mit dem EOF durch die Kapillare bewegt. Im elektrischen Feld migrieren dementsprechend kleine oder mehrfach geladene Kationen am schnellsten gefolgt von größeren einfach geladenen Kationen. Als nächstes folgen die neutralen Substanzen mit dem EOF. Anschließend die größere einfach geladene Anionen gefolgt von kleinen oder mehrfach geladenen Anionen, die am langsamsten migrieren. Durch Probenaufgabe auf der Anodenseite und Detektion auf der Kathodenseite können positive und negativ geladene Ionen in einer Analyse getrennt und detektiert werden. Insbesondere das stempelartige Strömungsprofil des EOF führt zur Ausbildung sehr schmaler Peaks. Die Anzahl an Substanzen, die mit einem System in einer bestimmten Zeit getrennt werden können, definiert deren Trennleistung. Schmale Peaks führen zu einer hohen Trennleistung. Die Gesamtmobilität einer Substanz als Summe aus effektiver elektrophoretischer Mobilität μ_{eff} und elektroosmotischer Mobilität μ_{EOF} ergibt sich aus der Geschwindigkeit und dem elektrischen Feld und ist experimentell zugänglich:

Gleichung 8:
$$\mu_{\text{ges}} = \mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}} = \frac{v}{E}$$

Die Geschwindigkeit v der Substanz ergibt sich aus der Strecke vom Kapillareingang bis zum Detektionsfenster (effektive Länge der Kapillare l) und der Migrationszeit t :

Gleichung 9:
$$v = \frac{l}{t}$$

Das elektrische Feld kann aus der Gesamtlänge der Kapillare L und der angelegten Spannung U ermittelt werden:

Gleichung 10:
$$E = \frac{U}{L}$$

Durch Einsetzen von Gleichung 9 und 10 in 8 erhält man die Gesamtmigration μ_{ges} :

Gleichung 11:
$$\mu_{\text{ges}} = \frac{l \cdot L}{t \cdot U}$$

Aus den im Kapitel 1.2.1.2 (Elektroosmose) beschriebenen Verhältnissen an der Oberfläche der Kapillare wird deutlich, dass durch die Adsorption von Teilchen aus Puffern oder Proben (Proteine, Lipide oder andere Biomoleküle) an der Kapillaroberfläche die Ausbildung der elektrischen Doppelschicht verändert wird. Dadurch verändert sich auch das Zetapotential und damit die Stärke des EOF und nach Gleichung 7 auch die Geschwindigkeit der Migration. Das macht den Vergleich verschiedener Messungen über die Migrationszeit und die Gesamtmobilität schwierig.

Sinnvoll ist dagegen ein Vergleich über die effektive elektrophoretische Mobilität. Diese ist eine für das Elektrolytssystem analyt-spezifische Konstante und lässt sich aus Gleichung 8 berechnen. Die Mobilität des EOF kann analog zu Gleichung 11 berechnet werden. Hierfür ist es nötig die Geschwindigkeit des EOF zu kennen. Diese kann aus der Migrationszeit einer neutralen Substanz ohne elektrophoretische Mobilität, die nur passiv mit dem EOF durch die Kapillare bewegt wird, ermittelt werden. Diese Substanz muss bei jeder Analyse verwendet werden und ermöglicht es, Schwankungen des EOF

auszugleichen (EOF-Marker). Aus Gleichung 8 und 11 ergibt sich für effektive elektrophoretische Mobilität eines Analyten:

Gleichung 12:
$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{ges}} - \mu_{\text{EOF}} = \frac{l \cdot L}{t_{\text{An}} \cdot U} - \frac{l \cdot L}{t_{\text{EOF}} \cdot U} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

mit t_{An} = Migrationszeit des Analyten und t_{EOF} = Migrationszeit des EOF-Markers

1.2.2 Instrumenteller Aufbau

Der grundlegende Aufbau einer Kapillarelektrophorese ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt. Das zentrale Element ist die Kapillare, in der die Trennung stattfindet. Diese ist bei den meisten kommerziellen Geräten in eine Kunststoffkartusche eingebaut. Das vereinfacht den Wechsel von Kapillaren und erhöht den Schutz vor mechanischen Einwirkungen. Mit kommerziellen Geräten ist es möglich die Temperatur der Kapillare über eine Flüssig- oder Luftkühlung zu kontrollieren und die durch den Stromfluss in der Kapillare entstehende Wärme abzuführen. Während der Trennung sind die Kapillare und das Ein- und Auslassgefäß mit einem Elektrolyten gefüllt. Dieser wird als Hintergrundelektrolyt (englisch: *background electrolyte*, BGE) bezeichnet. Die Kapillarenden und die Platinelektroden tauchen in das Ein- bzw. Auslassgefäß. Die beiden Platinelektroden sind über eine Hochspannungsquelle miteinander verbunden. Als Hintergrundelektrolyt werden häufig Puffer verwendet. Diese ermöglichen einen einheitlichen (De-)Protonierungsgrad der Kapillaroberfläche und somit einen konstanten EOF und bestimmen über den pH-Wert auch den Ladungszustand der Analyten und damit deren Verhalten im elektrischen Feld. Dieser beschriebene Aufbau entspricht grundsätzlich dem einer elektrolytischen Zelle. Als Resultat entsteht beim Anlegen einer Spannung in wässrigen BGE an der Kathode Wasserstoff und Hydroxidionen bzw. an der Anode Sauerstoff und Hydroniumionen. Dies ist ein weiterer Grund für die Verwendung von Puffern als BGE. Der pH-Wert bleibt konstant und somit auch die Trennungsbedingungen.

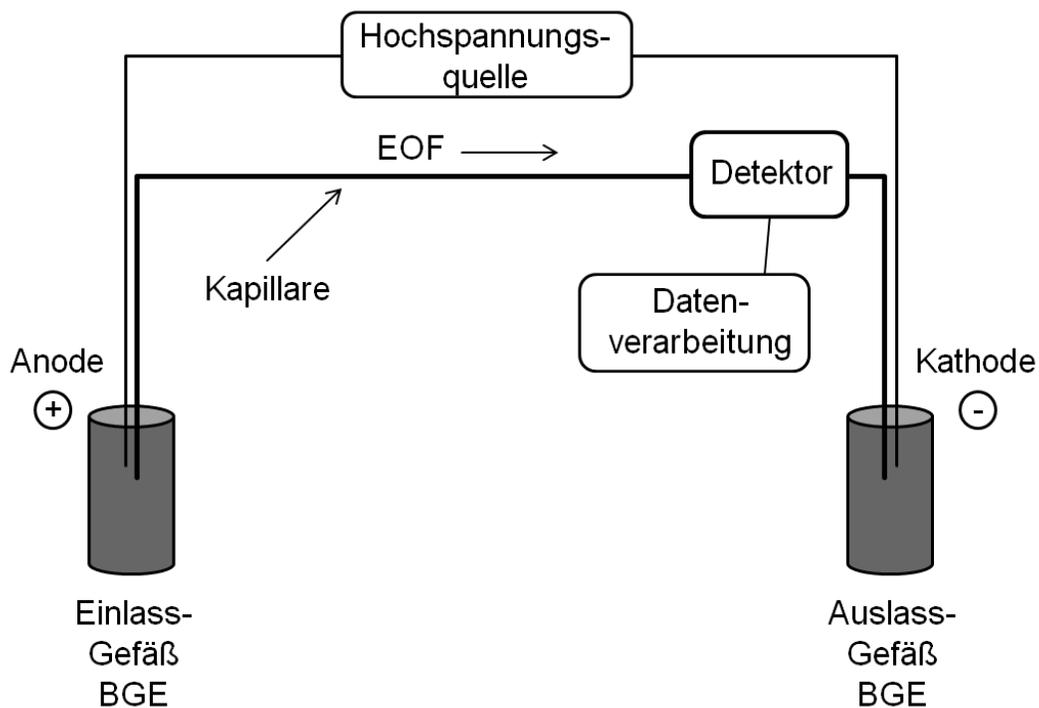


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines kapillarelektrophoretischen Versuchsaufbaus

Aufgrund der Elektrolyse ist es zu empfehlen die Kapillarenden tiefer in den BGE eintauchen zu lassen als die Elektroden um ein Eindringen von Gasbläschen in die Kapillare zu verhindern. Klassische Detektoren für die Kapillarelektrophorese sind UV/Vis-Detektoren. Dioden-Array-Detektoren (DAD) ermöglichen die gleichzeitige Erfassung der Absorption im gesamten UV-Spektrum. Eine besonders empfindliche Detektion ist die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion. Möglich sind aber auch Leitfähigkeits- oder elektrochemische Detektoren. Durch die Kopplung an ein Massenspektrometer können, durch Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z), auch Informationen über die Molekülmasse und strukturelle Eigenschaften des Analyten gewonnen werden.

1.2.3 Kapillaren

Kieselglaskapillaren (engl. *fused silica*) finden eine breite Anwendung im Bereich der kapillarelektrophoretischen Trenntechniken. Sie bieten eine vergleichsweise hohe Wärmeleitfähigkeit und sind durchlässig für UV-Licht im relevanten Wellenlängenbereich. Einen weiteren Vorteil bildet der beschriebene elektroosmotische Fluss. Durch geeignete chemische Veränderung der Oberfläche (Coating) kann der EOF auch in seiner Stärke beeinflusst bis völlig ausgeschaltet werden oder sogar die Fließrichtung umgedreht werden. Die verwendeten Kapillaren haben in der Regel einen Innendurchmesser von 25 – 100 µm bei einem Außendurchmesser von 50 – 360 µm. Zum Schutz vor mechanischen Einflüssen sind die spröden Kieselglaskapillaren mit einer Polyimidschicht ummantelt, die im Bereich des Detektors entfernt werden muss. Dies kann durch Hitze und bzw. oder chemisch erfolgen. Vor der ersten Verwendung sind die Kapillaren gründlich zu spülen um herstellungsbedingte Verunreinigungen zu entfernen.

Vor jeder Verwendung sollten die Kapillaren mit einer alkalischen Lösung (0,1 M Natronlauge) gespült werden. Dies führt zur vollständigen Deprotonierung der Silanolgruppen (Konditionierung). Im Anschluss wird die Kapillare mit Wasser und dem jeweiligen Hintergrundelektrolyten gespült und eine Spannung angelegt (Äquilibrierung). Dieses Vorgehen hilft der Adsorption von Substanzen an der Kapillaroberfläche vorzubeugen und bereitet die Kapillaroberfläche auf den verwendeten pH-Wert vor. Dies soll eine möglichst gleichmäßige Ladungsverteilung über die gesamte Kapillaroberfläche erzielen und einen beständigen und reproduzierbaren EOF erzeugen.

1.2.4 Probenaufgabe

Für die Probenaufgabe finden in der Kapillarelektrophorese zwei grundsätzliche Prinzipien Anwendung: die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion. Die hydrodynamische Injektion geht auf einen Druckunterschied zwischen den beiden Kapillarenden zurück. Dieser Druckunterschied lässt sich hydrostatisch oder durch Anlegen eines Druckes auf der Probenaufgabenseite bzw. durch Verringerung des Druckes auf der entgegengesetzten Seite der Kapillare erzeugen.

Die hydrostatische Injektion geht auf einen Höhenunterschied zwischen beiden Kapillarenden zurück. Auf der Probenaufgabenseite taucht die Kapillare in die Probe ein und wird angehoben. Durch den Druckunterschied wird die Probe in die Kapillare gesaugt. Diese Art der Probenaufgabe spielt in kommerziellen Geräten keine Rolle, zeigt aber die Notwendigkeit auf, dass sich beide Kapillarenden, insbesondere während der Trennung, auf der gleichen Höhe befinden. Ist dies nicht der Fall erzeugt der Druckunterschied einen Fluss mit parabolischem Profil durch die Kapillare, der die Trennschärfe verringert. Dies ist vor allem bei der Nutzung von externen Detektoren (Massenspektrometer) zu beachten.

Die am häufigsten verwendete Methode zur Probenaufgabe ist das Anlegen eines Druckes auf der Probenaufgabenseite, der die Probe in die Kapillare drückt. Das Injektionsvolumen lässt sich nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gleichung 13) berechnen:

Gleichung 13:
$$V_{\text{Inj.}} = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

$V_{\text{Inj.}}$ = Injektionsvolumen

η = Viskosität

Δp = angelegter Druck

L = Gesamtlänge der Kapillare

r = Innenradius der Kapillare

t = Zeit

Setzt man voraus, dass der Innendurchmesser der Kapillare konstant ist und die Viskosität von Probe und Hintergrundelektrolyt gleich sind, ist das Injektionsvolumen abhängig von der Höhe und Dauer des Druckunterschiedes. Daraus ergibt sich auch, dass für eine hohe Reproduzierbarkeit der Injektion der Aufbau der Druckdifferenz möglichst schnell erfolgen sollte und der Druckunterschied konstant bleibt. Um die Reproduzierbarkeit der Injektion zu unterstützen, ist es sinnvoll möglichst kleine Drücke zu wählen und die Injektionszeit zu erhöhen.

Eine weitere angewendete Injektionsmethode ist die elektrokinetische Injektion. Hierbei taucht das eine Kapillarende in die Probe und das andere in den Hintergrundelektrolyten. Durch Anlegen einer Spannung migrieren verschiedene Spezies in Abhängigkeit ihrer Ladung und der elektrophoretischen Mobilität unterschiedlich schnell in die Kapillare. Unter geeigneten Bedingungen können somit selektiv nur Anionen oder Kationen injiziert werden. Zu beachten ist aber auch die Stärke und Richtung des EOF. Das auf diese Weise injizierte Probenvolumen ist dabei kein aliquoter Teil des Probenvolumens. Dies kann zur selektiven Anreicherung von Analyten oder Abreicherung von störenden Stoffen genutzt werden. Nachteilig ist, dass sich die Konzentrationen der Spezies in der Probe von Injektion zu Injektion ändern können. Dies hat dann negative Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit, insbesondere bei quantitativen Analysen.

1.3 Massenspektrometrie

Die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie bietet den Vorteil Analyten durch die Bestimmung ihrer Masse zu identifizieren und ko-migrierende Substanzen getrennt zu detektieren. Die Massenspektrometrie beruht auf der Trennung von Ionen in der Gasphase aufgrund unterschiedlicher Masse-Ladungsverhältnisse. Ein Massenspektrometer ist im Grundsatz aus den folgenden drei Abschnitten aufgebaut:

- I. Ionenquelle: Die Probemoleküle werden ionisiert und in die Gasphase überführt.
- II. Analysator: Auftrennung der Ionen aufgrund unterschiedlicher Masse-Ladungsverhältnisse.
- III. Detektor inklusive Datenverarbeitung: Detektion der Ionen und Umwandlung in Signale für die Datenauswertung.

In den folgenden Unterkapiteln werden die einzelnen für diese Arbeit relevanten Abschnitte vorgestellt.

1.3.1 Ionenquelle

1.3.1.1 Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisierung (ESI) gehört zu den Ionisierungsverfahren, die bei normalem Luftdruck stattfinden. Die in Lösung vorliegenden Ionen und Moleküle werden unter Zuhilfenahme einer angelegten Hochspannung (bis zu 5 kV) versprüht und nach der Überführung in die Gasphase in den Massenanalysator überführt. Im positiven Modus werden durch Anlagerung eines Protons positive Molekülionen und im negativen Modus durch Abspaltung eines Protons negative Molekülionen gebildet. Bei ausreichend großen Molekülen kann es auch zu Mehrfach(de)protonierungen kommen.

Im Massenspektrum können dann mehrere Peaks derselben Substanz mit unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z) zu finden sein. Somit können auch sehr große Moleküle, wie z. B. Proteine, deren Masse-Ladungs-Verhältnis bei einfacher Protonierung außerhalb des Messbereiches einiger Analysatoren liegt, gemessen werden. Mit steigendem Protonierungsgrad sinkt der m/z -Wert der Moleküle und fällt in den Messbereich.

Analog zur Kapillarelektrophorese beruht auch die ESI-Quelle auf einer elektrolytischen Zelle [77]. Das leitende Medium ist bei der Elektrospray-Ionisation jedoch nicht flüssig. An eine leitende Kapillare wird eine Hochspannung angelegt. Unter dem Einfluss des daraus entstehenden elektrischen Feldes bewegen sich die Ionen in Abhängigkeit ihrer elektrophoretischen Mobilität in verschiedenen Richtungen. Im positiven ESI-Modus werden die Kationen in Richtung der Massenspektrometer weisenden Kapillaröffnung bewegt [77]. Darüber hinaus laufen ausgelöst durch die hohe Spannung Oxidationsvorgänge ab und es entstehen Hydroniumionen. Generell wird immer der Lösungsbestandteil bevorzugt oxidiert, der das geringste Redoxpotential aufweist. Dies ist meistens Wasser ($6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{ H}_3\text{O}^+ + 4 \text{ e}^-$). An der Kathode laufen folglich Reduktionprozesse ab. Wird die ESI-Quelle im negativen Modus betrieben, sind die Orte von Reduktion und Oxidation vertauscht. Verlässt die Flüssigkeit am Ende die Kapillare, wird sie durch die Oberflächenspannung des Lösungsmittels zusammengehalten. Ist die angelegte Spannung hoch genug, bildet sich an der Spitze des Emitters aus der Analytenlösung ein als „Taylor cone“ bezeichneter Kegel aus. Die Lösung ist nach außen positiv geladen, da die Anionen in Richtung der Anode migriert sind oder oxidiert wurden [78]. An der Spitze des „Taylor cone“ ist die Ladungsdichte so groß, dass die Abstoßungskräfte der Kationen nicht mehr von der Oberflächenspannung kompensiert werden können. Als Folge spalten sich kleine Tröpfchen ab. Bei der Bildung der Tröpfchen steigt die Oberfläche an und die Ladungen können sich besser verteilen. Die Abstoßungskräfte innerhalb der Tröpfchen werden geringer. Das am Ende der Kapillare entstehende Spray besteht somit aus positiv geladenen Tröpfchen, die sich in Richtung des Eingangs des Massenspektrometers bewegen. Der positive

Ladungsüberschuss sitzt dabei überwiegend auf der Oberfläche der Tröpfchen und wird von der Kathode angezogen [79]. Ungeladenen Moleküle und Neutralsalze finden sich Tropfeninneren [78]. Durch Verdunstung nimmt der Durchmesser der gebildeten Tropfen immer mehr ab. Die Ladungsdichte dabei zu. Ist die elektrostatische Abstoßungskraft gleich der Oberflächenspannung der Tröpfchen, ist das „Rayleigh limit“ erreicht. Nehmen die Abstoßungskräfte weiter zu, bilden sich mehrere kleine Tochtertröpfchen mit ca. 1,0 – 2,3 % der Masse, 10 – 18 % der Ladung und ungefähr einem Zehntel des Radius des Muttertröpfchens [80]. Dieser Prozess wird als „Coulomb Fission“ bezeichnet. In den entstehenden Tochtertröpfchen ist das Masse-Ladungs-Verhältnis größer als im Muttertröpfchen. Da die Gesamtladung aber über eine größere Oberfläche verteilt ist, nimmt die Ladungsdichte jedoch ab. Für den finalen Übergang der Ionen in die Gasphase werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert.

Der erste Mechanismus wird als „charge residue model“ (CRM) bezeichnet. Hier wird davon ausgegangen, dass die oben beschriebene Tröpfchenspaltung solange voranschreitet bis nur noch ein einziges Analytmolekül enthalten ist. Durch die weitere und vollständige Verdampfung des Lösungsmittels wird schließlich die Oberflächenladung des Tröpfchens auf das Molekül übertragen und es kommt zum Übergang des gebildeten Ions in die Gasphase. Das zweite Modell wird „ion evaporation mechanism“ (IEM) genannt. Ausgegangen wird davon, dass solvatisierte Ionen auch direkt von der Tröpfchenoberfläche emittiert werden, sobald eine gewisse Tröpfchengröße unterschritten wird. Erklärt wird dies dadurch, dass sich bereits vor dem Erreichen des „Rayleigh limit“ ausreichend hohe Abstoßungsenergie vorliegt. Der entscheidende Unterschied zwischen diesen beiden Modellen ist die Erklärung, wie die Analytmoleküle von den anderen Molekülen in der Lösung getrennt werden. Das CRM geht davon aus mehreren aufeinanderfolgende Tröpfchenspaltungen ein Molekül und Überschussladung enthaltendes Tröpfchen entsteht. Das IEM hingegen besagt, dass die Trennung durch den Ausstoß einzelner geladener Moleküle aus der Tröpfchenoberfläche erfolgt. Die ist verbunden mit einer Abnahme der Ladungsdichte der Tröpfchenoberfläche. Bei größeren Molekülen, wie z. B. Proteinen geht man davon

aus, dass sie nach dem CRM gebildet werden. Bei kleineren Molekülen gibt es Hinweise, dass sie hauptsächlich nach dem IEM gebildet werden [81, 82].

Die gebildeten Ionen wandern angezogen von der Kathode und dem Vakuum in Richtung des Analysators, wobei auch einige Ionen auf der Kathode neutralisiert werden. Um möglichst viele Analytmoleküle in das Massenspektrometer zu überführen, ist eine gute Positionierung des Sprays notwendig. Das Versprühen der Analytenlösung wird häufig durch die Zufuhr eines „nebulizer gas“ unterstützt. In der Regel wird hierfür Stickstoff verwendet. Das „nebulizer gas“ wird erwärmt und beschleunigt die Verdunstung des Lösungsmittels, was höhere Flussraten ermöglicht. In einigen Ionenquellen wird ein weiterer Gasfluss, das „drying gas“, zur Erhöhung der Lösungsmittelverdunstung genutzt.

Bei der Elektrospray-Ionisierung ist Ionisationseffizienz zum einem von der Flussrate des „nebulizer gas“ und zum anderen in viel größerem Maße von der Flussrate der Analytenlösung abhängig [83]. Die ausgehend von dieser Erkenntnis entwickelte Variante des ESI, das Nanospray, kommt bei Flussraten bis 100 nl/min ohne „nebulizer gas“ aus [77]. Die am Anfang gebildeten Tröpfchen zeichnen sich durch ein hohes Oberfläche-Volumen-Verhältnis aus. Dies führt zu einer höheren Konzentration von Analytmolekülen auf der Oberfläche und durch die höhere Oberfläche zu einer verbesserten Lösungsmittelverdunstung. In der Summe bewirken beide Faktoren eine höhere Ionisierungsausbeute. Durch den kleineren Innendurchmesser der verwendeten Kapillaren resultiert ein geringerer Durchmesser des Sprays und der Verlust von Analyten bei Transfer in den Analysator wird reduziert. Die Verwendung von Nanospray-Ionenquellen ermöglichen eine erhöhte Empfindlichkeit und ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis bei gleicher Analytkonzentration [84].

Die Elektrospray-Ionisierung ist ein der schonendsten Techniken zur Ionisierung von biologischen Molekülen. Hierbei treten im Gegensatz zu harten Ionisierungstechniken, wie z. B. der Elektronenstoßionisierung, nur in einem geringen Ausmaß Molekülfragmentierungen auf. Dies ermöglicht es, mit der Elektrospray-Ionisierung auch

große Moleküle, wie z. B. Proteine, als Ganzes zu ionisieren und die Gasphase zu bringen, um sie massenspektrometrisch zu untersuchen.

1.3.1.2 dielektrisch behinderte Elektrospray-Ionisation

Um ein starkes elektrisches Feld zu erzeugen, ist die Grundlage der Elektrosprayionisation eine Potentialdifferenz zwischen der flüssigkeitsgefüllten Emitter Spitze und dem Massenspektrometer. Die Flüssigkeit steht dabei in einem leitenden Kontakt zu einem Elektronenakzeptor bzw. -donator (Elektrode). Hierbei handelt es sich meist um an der Oberfläche mit Metall (z. B. Platin) überzogene Emitter Spitzen, die vom Analytenfluss durchflossen werden und somit zu einem direkten Kontakt führen. Während der Verwendung kann sich die leitende Oberfläche verändern und abnutzen, sodass der Übergang von Ladungsträger behindert und sogar unterbrochen werden kann. Die daraus resultierende Unbeständigkeit des direkten elektrischen Kontaktes kann zum Zusammenbruch des Sprays führen.

Im Falle des dielektrisch behinderten Elektrosprays (DB-ESI) wird auf diesen direkten elektrischen Kontakt zwischen der Elektrode und dem Elektrolyt verzichtet und durch ein Dielektrikum blockiert. Das notwendige Potential in der Flüssigkeit entsteht durch die Ladungsverschiebung innerhalb des Dielektrikums, für das im einfachsten Falle die Wand der Silica-Kapillare verwendet werden kann (Abbildung 1.5). Das DB-ESI kann als modifizierter Kondensator verstanden werden. Mit Anlegen einer Hochspannung wird ein elektrisches Feld zwischen Kathode und Anode erzeugt. Durch das elektrische Feld kommt es zu einer Polarisierung des Dielektrikums und einmalig zu einem Transport von Ladungen von der Anode zum Elektrolyten. Diese Ladungen bewegen sich in Richtung im Elektrolyten in Richtung der Kathode. Um ausreichend Ladungen zu erzeugen damit sich ein Elektrospray ausbilden kann, muss ein Schwellenwert in der Hochspannung erreicht werden. Entsteht ein Elektrospray, können durch das Spray

Ladungen aus dem Elektrolyten zur Kathode wandern. Diese transportierten Ladungen entsprechen dem Ladungsverlust im Elektrolyten [85].

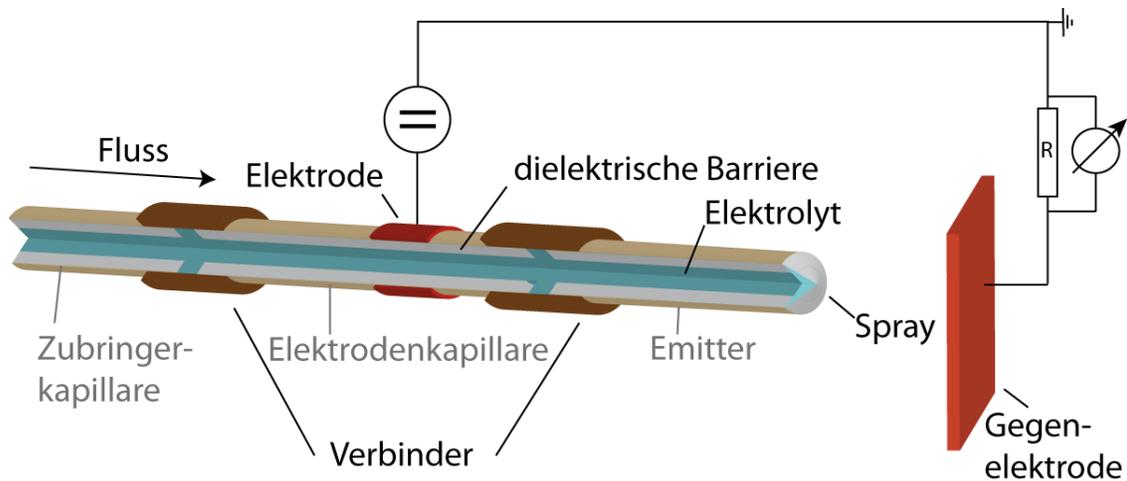


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau eines dielektrisch behinderten Elektrospray [85]

Für die Ionisation im Bereich der Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie wird über eine Anwendung des DB-ESI berichtet [86, 87]. Eine Verwendung des DB-ESI zur Kopplung von CE und MS ist in der Literatur nicht erwähnt.

1.3.2 Analysator

Im Massenanalysator werden die Ionen nach deren Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt und aufgrund verschiedener Flugzeiten, unterschiedlichem Verhalten im magnetischen bzw. elektrischen Feld oder durch die selektive Ejektion aus einem dreidimensionalen Einfangfeld separiert [88].

Ein Quadrupol ist ein Massenfilter, bestehend aus vier parallelen stabähnlichen und hyperbolisch geformten Elektroden, an denen sowohl eine Gleich- wie auch eine Wechselspannung angelegt wird. Gegenüberliegende Elektroden weisen dabei die gleiche Polarität (Gleichspannung) bzw. Phase (Wechselspannung) auf. Nebeneinanderliegende Elektroden haben eine entgegengesetzte Polarität

(Gleichspannung) bzw. eine um 180° verschobene Phase (Wechselspannung). Die aus der Ionenquellen kommenden Ionen interagieren mit den elektrischen Feldern des Quadrupols und bewegen oszillierend durch diesen hindurch. Nur bestimmte Kombinationen aus Gleich- und Wechselspannung erlauben es dabei spezifischen m/z auf stabilen Bahnen durch den Quadrupol zum Detektor zu gelangen ohne durch den Kontakt mit den Elektroden neutralisiert zu werden. Durch die Variation von Gleich- und Wechselspannung können nacheinander verschiedene m/z zum Detektor durchgelassen werden.

Eine Ionenfalle dient dem Einfangen und der massenspektrometrischen Untersuchung von Ionen und arbeitet dabei nach einem ähnlichen Prinzip wie ein Quadrupol. Sie besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die eine Wechselspannung angelegt wird. Die in den Endkappen befindlichen Öffnungen fungieren als Ein- und Auslass der Ionen. Aufgrund des elektrischen Feldes bewegen sich die Ionen auf stabilen Bahnen. Im Gegensatz zum Quadrupol wird die Gleich- bzw. Wechselspannung jedoch so gewählt, dass die Anzahl an Ionen auf stabilen Bahnen möglichst groß ist. Durch die Variation der angelegten Wechselspannung verlassen Ionen mit spezifischen m/z ihre stabilen Bahnen und wandern aus der Ionenfalle in Richtung Detektor. Durch eine kontrollierte Variation der angelegten Spannungen ist es möglich die Ionen mit verschiedenen m/z nacheinander aus der Ionenfalle zu entlassen. Eine Variante der Ionenfalle ist die lineare Ionenfalle. Dabei handelt es sich um einen Quadrupol, an dessen Enden eine zusätzliche Spannung angelegt wird, die verhindert, dass die Ionen den Quadrupol verlassen können. Die lineare Ionenfalle kann als Speicherzelle zur Lagerung und Anreicherung von Ionen genutzt werden. Mit einer Ionenfalle ist eine Untersuchung der Fragmentierung einzelner Ionen möglich. Hierzu werden alle Ionen außer den zu untersuchenden Ionen mit einen spezifischen m/z aus der Ionenfalle entlassen. Z. B. über die Kollision mit einem in die Ionenzelle eingeleiteten Kollisionsgas werden die Ionen fragmentiert und die gebildeten Fragmentionen aus der Ionenfalle entlassen und detektiert. Dies kann theoretisch beliebig häufig wiederholt werden. Allerdings stehen für die Selektion der Vorläuferionen für jeden weiteren

Fragmentierungsschritt immer weniger Ionen zur Verfügung, sodass irgendwann die Sensitivität der Ionenfalle nicht mehr ausreichend ist. Ein weiteres Problem der Ionenfalle ist der „*low mass cut-off*“. Die bei der Fragmentierung eines Vorläuferions gewählte Wechselfspannung soll ausreichend Energie für Fragmentierungsschritt zur Verfügung stellen. Bei einer ausreichend großen Wechselfspannung bewegen sich jedoch Ionen mit einem kleineren m/z als $1/3$ des m/z des Vorläuferions nicht auf stabilen Bahnen und können dadurch nicht detektiert werden [89].

1.3.3 Detektor

Der Ionendetektor arbeitet nach dem Prinzip des Sekundär-Elektronenvervielfachers. Die Ionen treffen dabei auf eine Elektrode (Dynode) mit entgegen gesetzter Polarität. Somit ist es nicht möglich Kationen oder Anionen gleichzeitig zu detektieren, da die Dynode immer nur eine Polarität aufweisen kann. Die Oberfläche der Dynode ist mit einer Metalllegierung beschichtet. Beim Auftreffen energiereicher Ionen auf diese Metalllegierung werden Sekundärelektronen freigesetzt. Die Schaltung mehrerer Dynoden hintereinander ermöglicht mit einem Ion eine Elektronenkaskade auszulösen. Das primäre Signal wird verstärkt. Die Elektronen treffen am Ende des Detektors auf eine Anode, an der der Stromfluss gemessen und in digitale Signale umgewandelt wird. Im Anschluss werden die Intensitäten aller Ionen computergestützt aufgezeichnet. Üblicherweise wird ein bestimmter m/z -Bereich mehrfach komplett gemessen und die jeweiligen Spektren gespeichert. Nach Aufsummierung der Signalintensitäten der einzelnen Scandurchläufe werden die Totalionenstromsummen mit der Messzeit in Bezug gesetzt. Bei Kopplung mit der CE erhält man das Totalionenstromelektropherogramm (TIE). Bei der Verwendung des SIM Modus werden analog die Einzelspektren der ausgewählten Masse-Ladungs-Zahl(en) addiert.

1.3.4 Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie

Die am häufigsten im Zusammenhang mit der Kapillarelektrophorese verwendeten Detektoren sind UV- und Fluoreszenzdetektoren. Die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor bietet zum einen die Möglichkeit auf Chromo- oder Fluorophore in den Analyten zu verzichten. Darüber hinaus können koeluierende Analyten über verschiedene Masse-Ladungsverhältnisse unterschieden werden und über Fragmentierungen können Informationen über die Molekülstrukturen gewonnen werden [90]. Die Elektrospray-Ionisation führt je nach Polarität der ESI-Spannung hauptsächlich zur Entstehung pseudomolekulare Ionen vom Typ $[M-H]^-$ oder $[M-H]^+$, sodass dieses Ionisierungsverfahren sehr gut geeignet ist für die Verwendung mit der Kapillarelektrophorese, bei der derartige geladene Moleküle bereits in Lösung vorliegen.

Die zur Kopplung von Massenspektrometrie und Kapillarelektrophorese verwendeten Interface-Typen haben ihren Ursprung in der HPLC-ESI-MS. Entscheidender Unterschied ist, dass es sich bei der Kopplung von Massenspektrometrie und Kapillarelektrophorese um die Kombination von zwei elektrolytischen Zellen handelt und eine unabhängige Spannungsregelung notwendig wäre. Werden beide Stromkreise nicht entkoppelt, muss auf CE-Seite mit Spannungsvariationen gerechnet werden, in deren Folge sich auch die effektive Trennungsspannung an der Kapillare und somit auch die Feldstärke und der EOF ändern [76]. Darüber hinaus sind die Flussraten von HPLC und CE unterschiedlich und ist bei der CE mit 20 – 200 nl/min geringer als bei der HPLC. Aufgrund des geringen Flusses nutzen viele CE-MS-Interfaces ein zusätzliches „sheath liquid“ um ein stabiles Spray zu erzeugen. Das Mischen des Sheath Liquids mit dem Analytenfluss erfolgt dabei meistens an der Spitze des Emitters. Das sheath liquid erfüllt darüber hinaus noch eine zweite Funktion. Die Trennkapillare besteht aus einem nicht leitenden Material und der Stromkreis im CE-ESI-MS-Interface ist nicht geschlossen. Das sheath liquid stellt eine leitende Verbindung zur Analytenlösung der CE-Kapillare her und schließt somit den Stromkreis [76].

Zu Beginn dieser Arbeit stand nur ein einziges kommerzielle erhältliches Interface zur Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer zur Verfügung. Es zeichnet sich durch eine hohe Robustheit aus und sichert ein stabiles Spray. Liegt die Quelle des MS auf Potential null, können die Trennungsspannung der CE und die ESI-Spannung voneinander entkoppelt werden. Es besteht weiterhin die Möglichkeit die Trennung (Hintergrundelektrolyt) und die Ionisation im ESI (Sheath-Liquid) unabhängig voneinander zu optimieren. Ein entscheidender Nachteil dieses Systems ist die relativ hohe Flussrate des Sheath-Liquid (4 $\mu\text{l}/\text{min}$) im Vergleich zum Fluss der CE, der einige nl bis mehrere 100 nl/min betragen kann. Dies führt zu einer Verdünnung der Analyten mit den entsprechenden negativen Auswirkungen auf die Nachweisgrenzen. Um diesen Nachteil zu umgehen sind in den vergangenen Jahren zwei neue Arten der CE-MS-Kopplung entwickelt und mittlerweile auch kommerziell erhältlich.

Das jüngste Interface wurde von Dovichi und Mitarbeitern entwickelt [91, 92]. Auch in diesen Fall erfolgt der Stromschluss der CE-Spannung mit Hilfe eines Sheath-Liquids am Kapillarausgang. Das Sheath-Liquid wird jedoch elektroosmotisch gepumpt mit Flussraten von nur einigen nl pro Minute. Das zweite, auf Arbeiten von Moini und Mitarbeiter [93, 94, 95] beruhende Interface nutzt ein stehendes Sheath-Liquid zum Stromschluss. Dieses steht nicht im direkten Kontakt mit der CE-Flüssigkeit, sondern mit dem auf wenige μm Wandstärke geätztem Ende der CE-Kapillare, das dadurch durchlässig für Ionen und Elektronen ist. Diese Art der Kopplung wird dementsprechend auch als „Sheathless“ bezeichnet. Limitierender Faktor beider Systeme ist die Höhe des CE-Stromes und somit der anlegbaren Trennungsspannung bzw. der Leitfähigkeit des Hintergrundelektrolyten. Auch muss bei der Wahl des Hintergrundelektrolyten auch dessen Eigenschaften bezüglich des ESI-Prozesses beachtet werden.

Bislang gibt es keine, in einem Gehäuse kombinierte, CE-MS. Das hat zur Folge, dass die Kapillare aus dem CE-Gerät heraus zum MS-Interface geführt werden muss. Das macht längere Kapillaren notwendig und verlängert die Analysenzeiten. Längere Kapillare führen bei gleicher Trennungsspannung zu einer Abnahme der Feldstärke. Ein

Ausgleich der Feldstärke durch Erhöhung der Trennungsspannung ist nur bedingt möglich, da die meisten CE-Geräte nur Trennungsspannungen bis 30 kV zulassen [96]. Darüber hinaus ist die Kapillare außerhalb des CE-Gerätes nicht thermostatisiert. Dies kann durch Joulesche Erwärmung oder Änderungen der Raumtemperatur zu Schwankungen des EOF oder zu verstärkten Konvektions- und Diffusionseffekten führen [98]. Zu beachten ist auch, dass bei der Kopplung von CE und MS die effektive Kapillarlänge l gleich der Gesamtlänge der Kapillare L ist. Die muss bei der Berechnung der Mobilitäten berücksichtigt werden. Um einen Siphoneffekt zu vermeiden, ist es wichtig, dass beide Enden der CE-Kapillare dieselbe Höhe haben [96].

1.4 EC/ESI-MS (ROXY)

Unter EC-MS versteht man die Kopplung eines elektrochemischen Reaktors mit einem Massenspektrometer. Dies erlaubt es, die Produkte elektrochemischer Reaktion direkt zu detektieren und über deren Masse-zu-Ladungs-Verhältnis zu identifizieren bzw. Informationen über Struktureigenschaften zu gewinnen. Es ermöglicht die selektive Oxidation bzw. Reduktion von Molekülen (auch von Makromolekülen wie z.B. Proteinen) oder auch die elektrochemische Erzeugung labiler Spezies (*in situ*) zur Untersuchung deren Reaktionsverhaltens [99, 100]. In den letzten Jahren erlangte die Verbindung von Elektrochemie und Massenspektrometrie immer häufiger Anwendung bei der Untersuchung der Fremdstoffmetabolisierung. Dabei wird die *in vivo* enzymatisch (z.B. durch Enzyme der Klasse Cytochrome P450) erfolgende Oxidation (Phase I) elektrochemisch simuliert. Durch geeigneten Aufbau und die nachfolgende Zumischung von Glutathion ist auch die Untersuchung der Konjugation von gebildeten Metaboliten mit Glutathion (Phase II) möglich [101, 102]. Schwefelhaltige Moleküle, wie z.B. GSH, haben eine große biochemische Bedeutung. Vor allem durch ihre komplexe Redoxchemie und Reaktionsfreudigkeit spielen sie eine wichtige Rolle in biochemischen Prozessen. Hierzu zählen unter anderem die Deaktivierung freier radikalischer Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS), die Detoxifizierung von Fremdstoffen

(insbesondere Schwermetalle), die (De-)Aktivierung von Enzymen und die Faltung von Proteinen [103, 104, 105, 106, 107]. Darüber hinaus stellen schwefelhaltige Moleküle, z.B. Glutathion, aber auch potentielle und nachgewiesene Ziele für Platinspezies dar. Im Cisplatin befindet sich das Platin in der Oxidationsstufe II und kann zum Platin(IV) oxidiert werden. Von Bedeutung ist auch die Reduktion von Platin(IV)-Prodrugs, wie z.B. Satraplatin, zum tatsächlich zytotoxisch wirksamen Platin(II). Die Reaktionskinetiken beider Oxidationsstufen unterscheiden sich jedoch deutlich [59, 108, 109, 110]. Sowohl die Platin-Spezies als auch die schwefelhaltigen Liganden sind relativ reaktiv. Die Redox-Interaktionen zwischen Platinzentrum und den schwefelhaltigen Liganden sind bisher kaum untersucht, können aber von biologischer Bedeutung sein.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll, mit Hilfe des fluoreszierenden Cisplatinanalogon Carboxyfluoresceindiacetat(aminomethyl)-1,2-ethylendiamindichloroplatin(II) (CFDA-Pt-Cl₂) [75], das Verhalten von Platinkomplexen im niedermolekularen Bereich des Cytosols einer Krebszelllinie untersucht werden. Vom besonderen Interesse sind mögliche Bindungspartner des Platins. Schwerpunkt der Arbeit ist die Entwicklung neuer analytischer Verfahren, die es erlauben niedermolekulare Platinspezies empfindlich und reproduzierbar nachzuweisen und zu identifizieren. Der Vergleich zwischen einer Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinie soll auch Aufschluss über mögliche Unterschiede und Hinweise auf Resistenzmechanismen geben. Die Analytik der intrazellulären Platinkomplexe erfolgt mittels kapillarelektrophoretischer Trennung mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF). Die Kapillarelektrophorese ist auf Grund ihrer hohen Trennleistung sehr gut geeignet, die meist polaren Platin-Spezies zu trennen, und bietet in Hinblick auf labile Komplexe den Vorteil kurzer Analysenzeiten [111]. Die Detektion der Laser-induzierten Fluoreszenz erlaubt eine hohe Empfindlichkeit der analytischen Methoden [112]. Zusätzlich soll die massenspektrometrische Detektion (CE-MS) die Identifizierung entstehender Platinspezies ermöglichen. Die grundsätzlichen Eigenschaften der Bindungsverhältnisse in Platinkomplexen, die abhängig sind von pH-Wert oder Konzentration, machen Kontroll- bzw. Modellversuche hinsichtlich der Stabilität und Reaktivität der Platinspezies notwendig. Dazu zählen auch Untersuchungen des Verhaltens in Puffern und mit potentiellen Liganden. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Integrität und Stabilität der Zellkulturproben. Darüber hinaus soll auch der Einfluss Cisplatin auf das Redoxverhalten potentieller Liganden untersucht werden. Die Kombination aus Elektrochemie und Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit erstmals auf Platin mit schwefelhaltigen Liganden angewendet.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1.1 Übersicht der verwendeten Chemikalien

Substanz	Nr.	Hersteller
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol p.a.	4855.1	Roth, Karlsruhe
2-Propanol ULC/MS	0016264102BS	Biosolve, Valkenswaard, NL
6-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester	21878-100mg	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril ULC/MS	0061204102BS	Biosolve, Valkenswaard, NL
Ameisensäure ULC/MS	06914132	Biosolve, Valkenswaard, NL
Ammoniaklösung 25% p.a.	1.05432.1000	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat p.a.	A36740500	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumformiat LC-MS Ultra	14266-25g	Fluka, Steinheim
Ammoniumhydrogencarbonat p.a.	T871.1	Roth, Karlsruhe
Atto 495	AD495-21	ATTO-TEC, Siegen
Atto 488	AD488-21	ATTO-TEC, Siegen
Atto 633	AD633-21	ATTO-TEC, Siegen
Atto 647	AD647-21	ATTO-TEC, Siegen
BSA	A2058-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cisplatin	479306-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat p.a.	P030.2	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid f. d. Biochem.	D4551-250ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol absolut	32205-1L	Sigma-Aldrich, Steinheim
Koffein p.a.	C0750-5J	Sigma-Aldrich, Steinheim

Substanz	Nr.	Hersteller
Kupfersulfat p.a.	1.02790.1000	Merck, Darmstadt
L-Arginin f. d. Biochem.	143448	Merck, Darmstadt
L-Cystein p.a.	1693.1	Roth, Karlsruhe
L-Cysteinsäure p.a.	30170-10g	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin f. d. Biochem.	3772.1	Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure f. d. Biochem.	3774.1	Roth, Karlsruhe
L-Glutathion reduziert f. d. Biochem.	6382.1	Roth, Karlsruhe
L-Glutathion oxidiert f. d. Biochem.	6378.2	Roth, Karlsruhe
L-Glutathionsulfonsäure	G9267-100mg	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glycin p.a.	3908.1	Roth, Karlsruhe
L-Histidin f. d. Biochem.	3852.3	Roth, Karlsruhe
L-Methionin f. d. Biochem.	9359.1	Roth, Karlsruhe
Methanol ULC/MS	0013684102BS	Biosolve, Valkenswaard, NL
N-Acetylcystein p.a.	A7250-5G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid p.a.	1.06400.1000	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat p.a.	71504-1kg	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat p.a.	S6014-1kg	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid 1 M Maßlösung	K021.1	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 1 M Maßlösung	K025.1	Roth, Karlsruhe
S-Methylglutathion	M4139-250mg	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.2 Geräte

Tabelle 2.1.2 Übersicht der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Roxy EC-MS-System	Antec, Niederlande
ESI-MS-Interface	Agilent, Waldbronn
HCTultra (Massenspektrometer I)	Bruker Daltonics, Bremen
PA800 plus (Kapillarelektrophorese)	Beckman Coulter, USA
LTQ-FT ultra (Massenspektrometer II)	Thermo Scientific, Bremen
pH-Meter 766	Knick, Berlin
Pipetten 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl; 1-10ml	Eppendorf, Hamburg
SpeedVac RVT4104	Thermo Fisher, Bremen
Spritzenpumpe PHD 2212 BINT	Harvard Apparatus, USA
Thermomixer, comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Souorex RK	Bandelin, Berlin
Laborwaage Kern ABT	Dietrich-Waagenbau, Herborn
Wasseraufbereitungsanlage Purelab	ELGA LabWater, Celle
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Software

Tabelle 2.1.2 Übersicht der verwendeten Software

Geräte	Hersteller
Kapillarelektrophorese: 32 Karat 9.0	Beckman Coulter, USA
Massenspektrometer I Steuerung: ESI Compass 1.3	Bruker Daltonics, Bremen
Massenspektrometer I Auswertung: DataAnalysis 4.0	Bruker Daltonics, Bremen
Massenspektrometer II: Xcalibur 2.2	Thermo Scientific, Bremen
Roxy EC-MS-System: Dialogue 2.02	Antec, Niederlande

3.1.4 Puffer und Reagenzien

Tabelle 2.1.2 Übersicht der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
EOF (LIF) 488 nm	50 µM Atto 495; 6,61 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,39 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
EOF (LIF) 633 nm	0,5 µM Atto 635; 6,61 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,39 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
EOF (MS)	1,0 mM Koffein
BGE (LIF) I	6,61 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,39 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
BGE (LIF) II	20 mM NH ₄ HCO ₃ ; pH 7,4
BGE (MS) I	20 mM NH ₄ HCO ₃ ; pH 7,4
BGE (MS) II	10 mM NH ₄ CH ₃ COO; pH 7,4
BGE (DB-ESI)	10 mM NH ₄ CH ₃ COO in 50% Methanol; pH 7,4
Inkubationspuffer I	6,61 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,39 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Inkubationspuffer II	6,61 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,39 mM NaH ₂ PO ₄ ; 150 mM NaCl; pH 7,4
Inkubationspuffer III	20 mM NaHCO ₃ ; pH 7,4
Inkubationspuffer IV	20 mM NH ₄ HCO ₃ ; pH 7,4
Lysepuffer	6,61 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,39 mM NaH ₂ PO ₄ ; 2 µM Pepstatin; 1 µM Leuptin; pH 7,4
ROXY-Laufpuffer	20 mM NH ₄ CHOO in 50% Acetonitril; pH 7,4
Sheath Liquid	5 mM NH ₄ CH ₃ COO in 50% Isopropanol
TBS	50 mM TRIS; 150 mM NaCl; pH 8,95

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Die pH-Werte der Lösungen wurden bei 20°C mit einem pH-Meter gemessen und mit Natronlauge, Ammoniaklösung und Salzsäure auf die gewünschten Werte eingestellt, regelmäßig überprüft und bei Bedarf neu eingestellt. Bei Reagenzien, die einen Anteil an organischen Lösungsmitteln besitzen, wurde der pH-Wert vor der Zugabe des organischen Lösungsmittels ermittelt und wenn nötig entsprechend eingestellt. Hierzu wurden die entsprechenden Pufferbestandteile in einem Messkolben in deionisiertem Wasser (25% bzw. 50% des nominellen Volumens) gelöst. Im Anschluss wurde der pH-Wert bestimmt und wenn

notwendig mit Natronlauge, Ammoniaklösung und Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Anschließend wurde der entsprechend nominelle Anteil des organischen Lösungsmittels hinzugegeben und mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Volumenkontraktion beim Mischen wurde vernachlässigt, sodass der reale Anteil des organischen Lösungsmittels nicht dem nominellem entspricht. Bei phosphatgepufferten Lösungen wurden die notwendigen Mengen an Hydrogen- und Dihydrogenphosphat mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung für den gewünschten pH-Wert ausgerechnet und eingewogen. Der Zusatz von Natronlauge oder Salzsäure war nicht notwendig. Die Leitfähigkeit insbesondere des Lysepuffers und des Hintergrundelektrolyts für CE-LIF konnten somit verringert werden. Alle Lösungen und Puffer wurden vor dem Verwenden im Ultraschallbad für fünf Minuten entgast. Die Lagerung erfolgte bei 4°C für maximal eine Woche.

3.2 Methoden

3.2.1 Grundsätzliche Arbeitsweise

Alle Proben und zu Versuchszwecken hergestellten CF-Pt-Komplexe wurden in lichtgeschützten braunen Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Der Transport erfolgte in schwarzen Boxen und die Lagerung bei -80°C. Der Kontakt zu Lichtquellen wurde auf ein geringstes mögliches Maß beschränkt. Die Aufbewahrung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen erfolgte bei 4°C. Aufgrund der zytostatischen Eigenschaften des CFDA-Pt-Cl₂ bzw. der potentiellen zytostatischen Eigenschaften der aus CFDA-Pt-Cl₂ hervorgehenden Komplexverbindungen fanden alle vorbereitenden Arbeiten innerhalb einer Sicherheitswerkbank statt.

3.2.2 Synthese und Aufreinigung des CFDA-Pt-Cl₂

Die Synthese des CFDA-Platins basiert auf der Arbeit von Molenaar et al. [75]. In einem ersten Schritt erfolgt der Aufbau des Platinkomplexes, der in einem letzten Schritt mit dem Fluorophor 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidester (CFDA-NHS) gekoppelt wird (Abbildung 4.17). Die Kopplung verläuft über das primäre Amin des Platinkomplexes und dem N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) des Fluorophors. Die Ausbeute dieser Reaktion wird mit 50-70% angegeben [75]. Anschließend wird das Produkt {1-([5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat]aminomethyl)-1,2-ethylendiamin}dichloroplatin(II) (CFDA-Pt-Cl₂) gewaschen, getrocknet und in wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) gelöst und bei -80°C lichtgeschützt gelagert. Die Synthese und Aufreinigung des CFDA-Pt-Cl₂ erfolgte durch den Kooperationspartner an der Universität Bonn.

3.2.3 Deacetylierung des CFDA-Pt-Cl₂

Der Carboxyfluoresceindiacetatrest (CFDA) ist nicht fluoreszierend. Erst durch Abspaltung der beiden Acetylgruppen entsteht die entsprechende fluoreszierende Form Carboxyfluorescein (CF). Insbesondere zur Überprüfung der Reinheit und wenn nicht gesondert im Text beschrieben, erfolgte die Deacetylierung nach Molenaar et al. [75]. Hierfür wurde das CFDA-Pt-Cl₂ (50 µM) über Nacht (acht Stunden) bei 37°C lichtgeschützt in TBS (TRIS-gepufferte Salzlösung (eng. *tris buffered saline*)) mit einem pH-Wert von 8,95 inkubiert.

3.2.4 Herstellung der CF-Pt-Komplexe

Zur Herstellung verschiedener CF-Pt-Komplexe wurde CFDA-Pt-Cl₂ (50 µM) mit dem jeweiligen Liganden (1 mM) über Nacht (acht Stunden) bei 37°C lichtgeschützt in einem 10 mM Phosphatpuffer (Inkubationspuffer I) inkubiert. In dieser Zeit erfolgten sowohl die

Deacetylierung als auch die Reaktionen am Platinzentrum. Auf eine nachfolgende Deacetylierung in TBS konnte verzichtet werden. Sollte der fluoreszierende Dichlorokomplex (CF-Pt-Cl₂) generiert werden, erfolgte die Inkubation in Phosphatpuffer mit Chlorid (150 mM) (Inkubationspuffer II). Zur Untersuchung der Reaktionen von CFDA-Pt-Cl₂ mit Bestandteilen verschiedener Puffer wurde CFDA-Pt-Cl₂ in diesen Puffern (Inkubationspuffer I – IV) über Nacht (acht Stunden) bei 37°C lichtgeschützt inkubiert.

3.2.5 Zellkultur, -lyse und Proteinbestimmung

Für Zellkulturversuche wurden die Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und die Cisplatin-resistente Variante A2780cis (Quelle: ECACC: *European Authenticated Collection of Cell Cultures*, Großbritannien) verwendet. Die Zellen beider Zelllinien wurden in RPMI-1640[®] supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1,5 % Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Experimenten verwendet oder subkultiviert bei maximal zwölf Passagen. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in DMSO mit 10 % FKS in flüssigem Stickstoff. Die Resistenz von A2780cis gegenüber Cisplatin wurde regelmäßig mittels eines MTT-Cytotoxizitätstest überprüft. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Casy[®]1 Zellzählers. Tests auf Kontamination durch Mykoplasmen wurden regelmäßig durchgeführt und basierten auf 2-(4-Amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide-dihydrochloride (DAPI). Die Behandlung der Zellen mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 µM) für zwei Stunden erfolgte in nicht supplementiertem RPMI-1640[®]-Medium, d.h. ohne den oben beschriebenen Zusatz von FKS, Glutamin, etc.. Für die Zelllyse wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit kaltem PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung (eng. *phosphate buffered saline*)) gespült. Die Zellen wurden anschließend vom Flaschenboden abgeschabt und bei 160 g für vier Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Lysepuffer suspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgte mittels eines

Ultraschallhomogenisators (Bandelin Sonopuls HD2070/UW2070): Dreimal für fünf Sekunden bei 25 % Power mit jeweils 30-sekündiger Pause. Das Lysat wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 700 g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet entsprach der Kernfraktion und der Überstand wurde erneut bei 15.000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet entsprach der mitochondrialen Fraktion und der daraus hergehende Überstand wurde als cytosolische Fraktion für weitere Analysen verwendet. Die Effizienz der Fraktionierung wurde mittels der Analyse von Markerproteinen überprüft: Lamin B1 (GTX103292) für die Kernfraktion, Cytochrome C Oxidase Untereinheit IV Isoform 1 (GTX100118) für die mitochondriale Fraktion, GAPDH (GTX100118) für die cytosolische Fraktion. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch über die Reaktion mit Bicinchoninsäure (*BCA-Assay*). Alle in diesem Kapitel (3.2.5) beschriebenen Arbeiten wurden durch den Kooperationspartner an der Universität Bonn ausgeführt.

3.2.6 Probenvorbereitung

Soweit nicht anders im Text erwähnt, wurden alle Proben auf einen Proteingehalt von $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ normiert. Um die Proteine der cytosolischen Fraktion auszufällen wurden 50 μl Zelllysat mit 450 μl eiskaltem Ethanol (-25°C) vermischt und für eine Stunde bei -25°C inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 20.000 g für 30 Minuten. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand in der SpeedVac bis fast zur Trockene (70 Minuten) eingedampft. Nach Zugabe von 49 μl Wasser wurde die Probe für 15 Minuten im Thermomixer geschüttelt (750 min^{-1}). Nach Zugabe von 1 μl der entsprechenden EOF-Markerlösung erfolgte, bis zur Messung, die Lagerung lichtgeschützt bei 4°C . Die effektive Konzentration des EOF-Markers in der Probe betrug 10 nM (Atto 635) für die LIF-Detektion und 20 μM (Koffein) für die MS-Detektion.

3.2.7 Kapillarelektrophoretische Arbeiten

3.2.7.1 Kapillarelektrophorese

Alle kapillarelektrophoretischen Messungen wurden mit einem PA 800plus CE System von Beckman Coulter durchgeführt. Für die Detektion der Laser-induzierten Fluoreszenz war das Gerät mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattet. Das erlaubte das Arbeiten bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (488 nm und 633 nm). Der Probenaufbewahrungsraum der Kapillarelektrophorese wurde auf 5°C temperiert. Die Temperatur des Autosamplers mit den Spül- und Pufferflüssigkeiten konnte nicht kontrolliert werden und lag bei Raumtemperatur. Die Temperatur der Kapillare wurde mittels einer effektiven Flüssigkühlung bei 20°C gehalten. Bei der massenspektrometrischen Detektion erfolgte aus gerätetechnischen Gründen die Temperierung nur bis zum Austreten der Kapillare aus dem Gehäuse der Kapillarelektrophorese (ca. 50 cm). Insbesondere auf den letzten zehn cm, im ESI-Sprayer, war die Kapillare der Temperatur (ca. 50°C) der ESI-Quelle ausgesetzt.

3.2.7.2 Kapillaren

Für die kapillarelektrophoretischen Trennungen wurden unbeschichtete Kieselglaskapillaren (*fused-silica*) mit einem Innendurchmesser von 50 µm (in einzelnen Fällen auch 75 µm) und einem Außendurchmesser von 360 µm verwendet. Die Kapillaren lagen als Meterware vor und wurden vor Verwendung mit einem Keramikplättchen auf die entsprechende Länge zugeschnitten. Die Qualität der Schnittkante wurde mit einer Lupe überprüft. Bei der LIF-Detektion betrug die effektive Länge der Kapillare zum Detektor 32 cm bei einer Gesamtlänge von 43 cm. Bei der massenspektrometrischen Detektion lagen effektive und Gesamtlänge bei 75 cm. Die äußere Polyimidschutzschicht wurde am Kapillarein- und ausgang (ca. 1 cm) und im

Bereich des Detektors (ca. 0,5 cm) abgeflammt und die Rußreste vorsichtig mit Isopropanol entfernt. Neue Kapillaren wurden wie folgt konditioniert: Spülen mit 0,1 M Natronlauge, Wasser und dem jeweiligen Hintergrundelektrolyten (jeweils zehn Minuten bei einem Druck von 20 psi (1,379 bar)), Anlegen einer Trennungsspannung von 20 kV für zehn Minuten und einem abschließenden zehnmütigen Spülen mit dem jeweiligen Hintergrundelektrolyten bei einem Druck von 20 psi (1,379 bar). Diese Prozedur erfolgte zusätzlich jeden Tag vor Beginn der Messungen. Bei Kopplung an das Massenspektrometer befand sich der Kapillarausgang während der Konditionierung nicht im Interface sondern in einem gesonderten Spülgefäß.

3.2.7.3 Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierten Fluoreszenz Detektion

Für die Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) wurde hauptsächlich ein 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) als BGE und für einige Messungen auch ein 20 mM Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,4) verwendet. Vor jeder Messung wurde die Kapillare für zwei Minuten bei einem Druck von 20 psi (1,379 bar) mit dem jeweiligen BGE gespült. Die Injektion der Probe erfolgte hydrodynamisch durch Anlegen eines Druckes von 0,5 psi (0,034 bar) für fünf Sekunden auf der Probenaufgabeseite der Kapillare. Das Injektionsvolumen wurde mit einer nach Gleichung 13 modifizierten Formel (Gleichung 13.1) berechnet. Für die Viskosität der Probe und des Hintergrundelektrolyten wurde der Wert für Wasser bei 20°C (1,00 mPa · s) genutzt. 6894,8 entspricht dem Umrechnungsfaktor für den Druck von [psi] nach [Pa] und 10^{12} dem Umrechnungsfaktor für das Injektionsvolumen von [m^3] nach [nl]. Bei Verwendung der oben beschriebenen Kapillare (Gesamtlänge = 43 cm) betrug das Injektionsvolumen 6,2 nl.

Gleichung 13.1:

$$V_{\text{Inj.}} = \frac{(\Delta p \cdot 6894,8) \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{2 \cdot 10^6}\right)^4 \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot L} \cdot 10^{12}$$

$V_{\text{Inj.}}$ = Injektionsvolumen [nl]

Δp = angelegter Druck [psi]

d = Innendurchmesser der Kapillare [μm]

t = Zeit [s]

η = Viskosität [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]

L = Gesamtlänge der Kapillare [m]

Nach Injektion der Probe folgte zusätzlich die hydrodynamische Injektion eines kleinen Volumens BGE in die Kapillare (0,5 psi (0,034 bar) für fünf Sekunden). Anschließend fand die elektrophoretische Trennung bei einer Spannung von 30 kV für fünf Minuten statt. Die Spannung wurde gleichmäßig innerhalb von neun Sekunden (*ramp time*) von null auf 30 kV erhöht. Detektiert wurde die nach Anregung emittierte Fluoreszenz der Analyten. Die Anregung erfolgte über zwei Laser mit den Wellenlänge 488 und 635 nm und fand an der gleichen Stelle direkt in der Kapillare statt (Abbildung 3.1). Die daraus resultierenden Signale waren dadurch ohne vorhergehende Betrachtung der jeweiligen effektiven elektrophoretischen Mobilitäten direkt miteinander vergleichbar. Die Fluoreszenz der CF-Pt-Komplexe wurde über den 488-nm-Kanal gemessen. Zur Bestimmung des EOF wurde das Signal des EOF-Marker Atto 633 im 635-nm-Kanal genutzt. Ein Vergleich verschiedener Messungen erfolgte über die effektiven Mobilitäten der Analyten um Unterschiede in der Stärke des EOFs auszugleichen. Die Bestimmung der effektiven Mobilitäten erfolgte mittels Gleichung 12. Soweit im Text nicht anders beschrieben, beziehen sich die angegebenen effektiven Mobilitäten auf den Hintergrundelektrolyten BGE (LIF I) mit folgenden Parametern: $L_{\text{ges.}} = 43 \text{ cm}$, $l_{\text{eff.}} = 32 \text{ cm}$, $U = 30 \text{ kV}$.

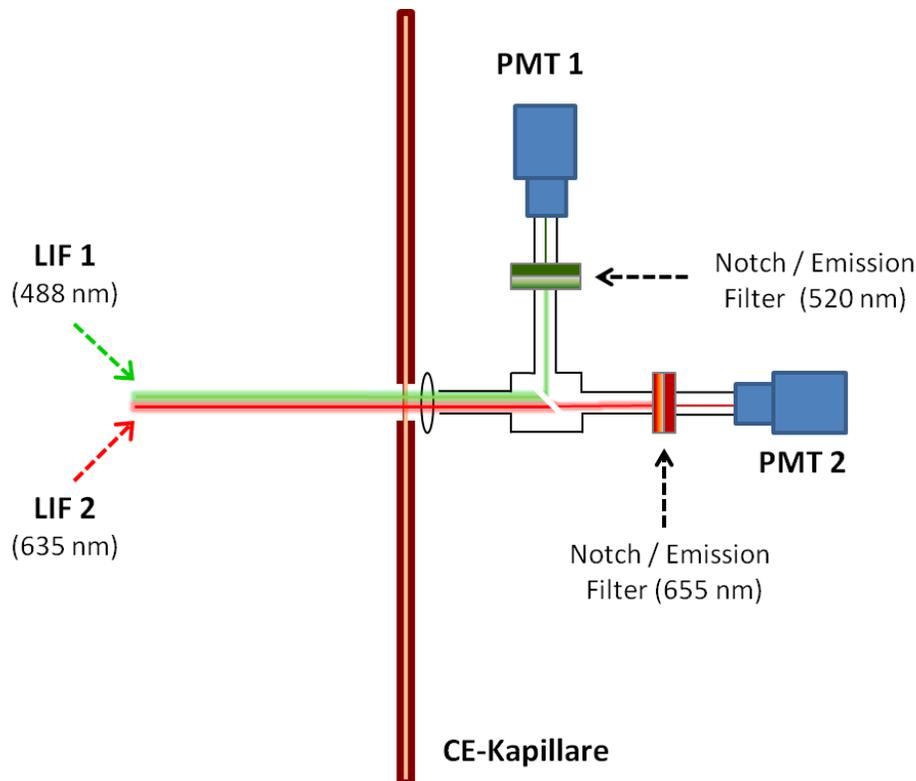


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung Dual-LIF-Detektion

3.2.7.4 Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion

Für die Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion (CE-MS) wurde hauptsächlich ein 20 mM Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,4) als Hintergrundelektrolyt und für einige Messungen auch ein 20 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7,4) verwendet. Vor jeder Messung wurde die Kapillare für drei Minuten bei einem Druck von 20 psi (1,379 bar) mit dem jeweiligen BGE gespült. Die Injektion der Probe erfolgte hydrodynamisch durch Anlegen eines Druckes von 0,5 psi (0,034 bar) für fünfzehn Sekunden auf der Probenaufgabeseite der Kapillare. Bei Verwendung der oben beschriebenen Kapillare (Gesamtlänge = 75 cm) betrug das Injektionsvolumen nach Gleichung 13.1 10,6 nl. Nach Injektion der Probe folgte zusätzlich die hydrodynamische Injektion eines kleinen Volumens BGE in die Kapillare (0,5 psi (0,034 bar) für fünf Sekunden). Anschließend fand die elektrophoretische Trennung bei einer Spannung von

30 kV für 20 Minuten statt. Die *ramp time* betrug neun Sekunden. Die Kapillarelektrophorese und das Massenspektrometer (Bruker HCT) wurden über ein CE-ESI-MS Interface gekoppelt (Abbildung 3.2).

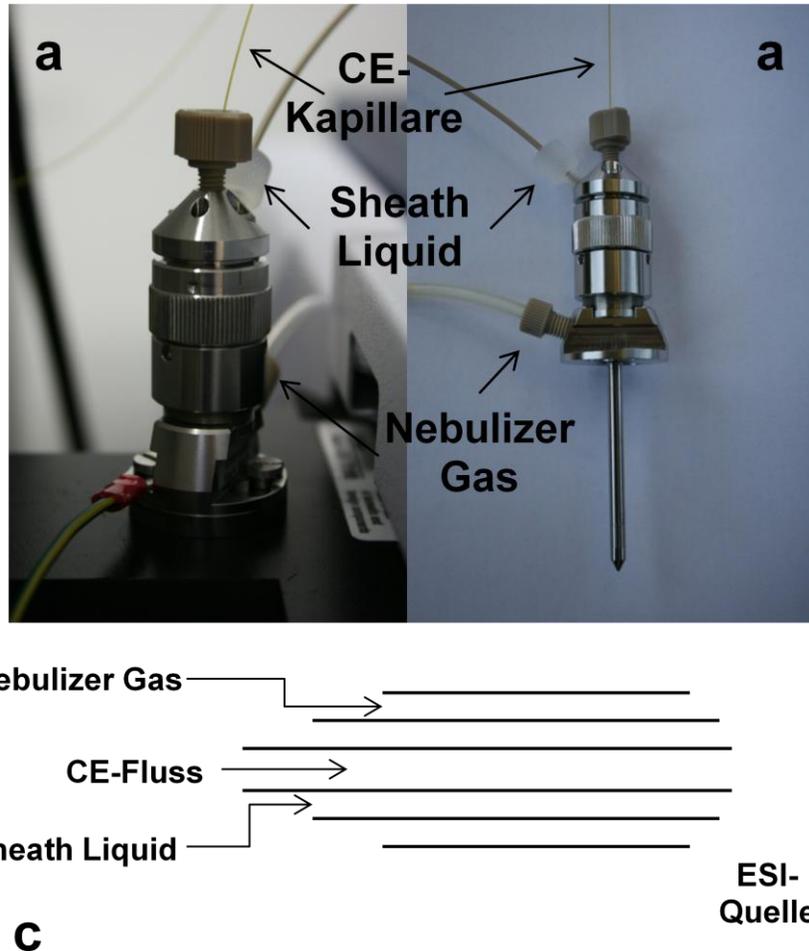


Abbildung 3.2: Verwendetes CE-ESI-MS-Interface mit Illustration der Anschlüsse für Nebulizer Gas und Sheath Liquid eingebaut in die Quelle des Massenspektrometers a) in Seitenansicht b) und als schematische Darstellung c)

Für die CE-MS-Kopplung muss die CE-Kapillare aus der Kapillarelektrophorese herausgeführt werden. Der Kapillarausgang befindet sich innerhalb des ESI-Sprayers, der in einer senkrechten Position zum Eingang des Massenspektrometers montiert ist. An der Spitze des ESI-Sprayers liegt das Nullpotential sowohl für die Kapillarelektrophorese als auch für die Elektrosprayionisation. Beide Spannungen sind

somit voneinander entkoppelt und stören sich nicht. Das benötigte Sheath-Liquid wurde mit einer Spritzenpumpe bei einer konstanten Flussrate von $4 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ zugeführt. Die Ionisation erfolgt mittels Elektrosprayionisation im positiven Modus (4 kV) und in einigen Fällen auch im negativen Modus (-3 kV). Der Druck des Nebulizergases lag bei 2,0 psi (0,138 bar). Der Fluss des Trocknungsgases betrug $8 \text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 200°C . Die Bestimmung des EOF erfolgte über das Signal für Koffein. Wenn nicht gesondert im Text erwähnt, stellen die genannten Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) die einfach positiven geladenen Molekülonen dar. Alle m/z beziehen sich auf das Platinisotop 195.

3.2.8 CE-DB-ESI-MS

Für die Versuche zur Kopplung CE-MS über ein dielektrisch behindertes Elektrospray (DB-ESI) wurden die Kapillarelektrophorese (BeckmanCoulter) und die HCTultra als Massenspektrometer verwendet. Es kamen unbeschichtete Quarzglas Kapillaren mit $360 \mu\text{m}$ Außendurchmesser und $50 \mu\text{m}$ Innendurchmesser zum Einsatz. Die Gesamtlänge der Kapillare betrug 80 cm. Der Zuschnitt und die Konditionierung der Kapillare erfolgten wie oben beschrieben. Als Hintergrundelektrolyt wurde eine 10 mM Ammoniumacetatlösung in 50% Methanol (BGE (DB-ESI)) verwendet. Das DB-ESI wurde mit einer Spannung von 3 kV und einer Frequenz von 100 Hz betrieben. Die Trennungsspannung der Kapillarelektrophorese betrug 25 kV. Während der Versuche wurden drei verschiedene Aufbauten verwendet. Zu Beginn wurde der Standardaufbau für CE-MS inklusive des ESI-Interface wie oben beschrieben genutzt. Zusätzlich wurde das DB-ESI ca. 40 cm vor dem Kapillarausgang installiert und betrieben um dessen Einfluss auf den EOF und die Trennung zu untersuchen. Für den zweiten Aufbau wurde das Standard-ESI-Interface entfernt und das DB-ESI zum Kapillarausgang vor dem Einlass des MS verschoben. Die Ionisierung und die Generierung des Sprays waren in diesem Aufbau nur auf das DB-ESI zurückzuführen. Das Nullpotential der Trennungsspannung der Kapillarelektrophorese lag im Massenspektrometer. Der dritte Aufbau beruhte auf dem zweiten. Zusätzlich wurde ca. 10 cm vor dem DB-ESI mittels

eines Verbindungsstücks ein Platindraht mit leitendem Kontakt zur Flüssigkeit in die Kapillare eingebracht. In diesem Aufbau lag das Nullpotential der Trennungsspannung der Kapillarelektrophorese nicht mehr im Massenspektrometer sondern vor dem DB-ESI. In Abbildung 3.3 sind alle drei Aufbauten schematisch dargestellt.

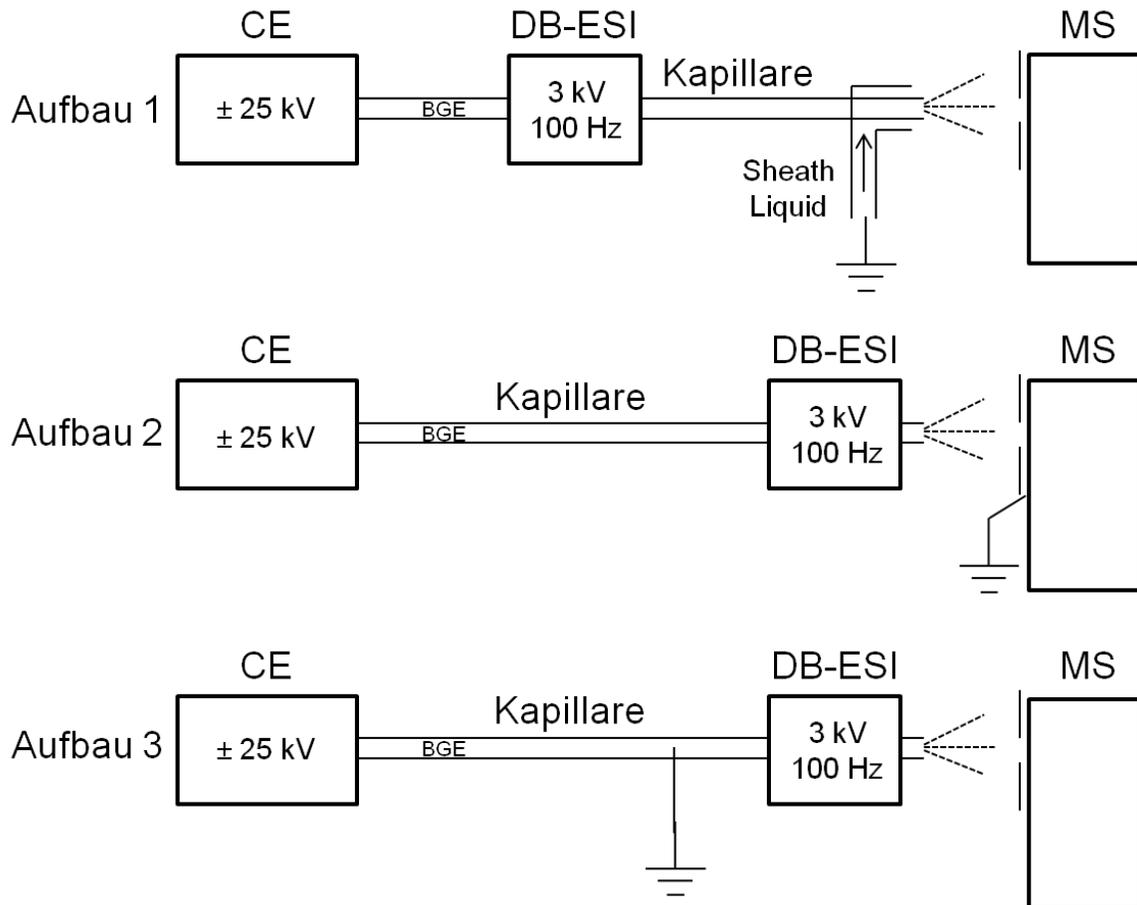


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der drei Aufbauten für die Kopplungsversuche CE-MS mittels DB-ESI

3.2.9 EC-MS (ROXY)

Der für diese Arbeit verwendete EC-MS-Aufbau bestand aus einer elektrochemischen Zelle, verbunden mit einem Potentiostaten, in einem thermostatisierbaren Gehäuse. Die elektrochemische Reaktionszelle (Volumen: 0,75 μl) war mit einer Arbeitselektrode (Bor-dotierter Diamant; Fläche: 15 mm^2), einer Hilfselektrode (Graphit) und einer Referenzelektrode (Palladium/Wasserstoff) ausgestattet. Mit einer Spritzenpumpe wurde die Analytenlösung mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ durch die Reaktionszelle und weiter zur Detektion der Reaktionsprodukte im Massenspektrometer gepumpt (HCTultra als Standard und LTQ-FT für hochauflösende Massenspektrometrie zur eindeutigen Identifikation). Alle Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Als Laufpuffer diente eine 20 mM Ammoniumformiatlösung in 50% Acetonitril (Roxy-Laufpuffer). Die Analyten wurden aus einer Stammlösung (1 mM in Inkubationspuffer III) mit dem Roxy-Laufpuffer auf die Arbeitskonzentration von 10 μM verdünnt. Um den Einfluss von Cisplatin auf das Redox-Verhalten der schwefelhaltigen Aminosäuren zu untersuchen, wurden Cisplatin und die jeweilige Aminosäure in einem molaren Verhältnis von 1:2 (5 μM Cisplatin auf 10 μM Ligand) in den Laufpuffer gemischt und zwischen 30 Minuten und einem Tag inkubiert. Vor Beginn der Messungen wurde die Arbeitselektrode durch ein Pulsprogramm (+2 V und -2 V, je eine Sekunde) für fünf Minuten gereinigt und aktiviert. Anschließend wurde die Reaktionszelle mit Laufpuffer (fünf Minuten bei 10 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$) und der Analytenlösung (zwei Minuten bei 10 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$) gespült. Die Messungen erfolgten sowohl bei konstantem Potential als auch im Scanmodus. In diesem wurde das Potential mit einer Scanrate von 20 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ zwischen 0 V und 1,5 V (und zurück auf 0 V) variiert. Dies wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen jeweils dreimal wiederholt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits in Kapitel 2 geschildert, ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer neuen analytischen Methodik zur Untersuchung niedermolekularer intrazellulärer Addukte Platin-haltiger Medikamente. Die Grundidee ist dabei die Zellaufnahme und Metabolisierung mittels fluoreszenzmarkierter Platinkomplexe (CFDA-Pt-Cl₂) zu verfolgen. Die Verwendung von CE-LIF als Basis der Analytik muss zum einen eine hohe Empfindlichkeit garantieren und einen sicheren Nachweis der Platinkomplexe bis in den unteren nM-Bereich erlauben. In Hinblick auf labile Platinspezies müssen die Analysenzeiten kurz, d.h. möglichst im Bereich von einigen Minuten, gehalten werden. Für die Identifizierung unbekannter Addukte ist zusätzlich eine massenspektrometrische Detektion und somit die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer notwendig. Es muss auch überprüft werden, ob sich CFDA-Pt-Cl₂ ähnlich verhält wie Cisplatin und vergleichbare Reaktionen eingehen kann. Aber auch die Reinheit und Stabilität des CFDA-Pt-Cl₂ sollte gegeben sein.

4.1 CFDA-Pt-Cl₂

CFDA-Pt-Cl₂ ist ein mit Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) fluoreszenzmarkiertes Cisplatin-Analogon. Die Synthese und Verwendung für In-vitro-Experimente wurde erstmals 2000 von Molenaar et al. beschrieben [75]. Das Platinatom befindet sich im Cisplatin wie auch im CFDA-Pt-Cl₂ in der Oxidationsstufe plus zwei mit der Koordinationszahl vier. Die Elektronenkonfiguration des Platins (ohne Liganden) lautet: [Xe] 4f¹⁴ 5d⁸. Die Geometrie beider Komplexe ist quadratisch-planar und damit typisch für ein Zentralteilchen mit d⁸-Konfiguration der äußeren Elektronen [59]. Das Platin fungiert als Elektronenpaarakzeptor der freien Elektronenpaare des Stickstoffs in den Aminogruppen/Amin-Liganden bzw. der beiden Chloro-Liganden. Die Reaktivität des CF-Pt-Cl₂ ist durch die beiden Chloro-Liganden als gute Abgangsgruppe zu erklären – analog zum Cisplatin. Bei Cisplatin als auch bei CFDA-Pt-Cl₂ handelt es sich jeweils um

das entsprechende Cis-Isomer. Aufgrund des identischen Platinzentrums ist auch zu erwarten, dass intrazellulär beide Verbindungen bezüglich des Platins vergleichbare Reaktionen eingehen. Wie bei Cisplatin ist die Zytotoxizität von CFDA-Pt-Cl₂ auf Zellen einer Cisplatin-resistenten Ovarialkrebszelllinie (A2780cis) signifikant reduziert im Vergleich zur entsprechenden sensitiven Zelllinie (A2780) [113]. Die zelluläre Aufnahme von CFDA-Pt-Cl₂ ist höher als bei Cisplatin, vermutlich durch einen höheren lipophilen Charakter durch den Fluoreszenzrest und eine damit einhergehende höhere passive Diffusion durch die Zellmembran. Trotzdem ist die Aufnahme von CFDA-Pt-Cl₂ in Cisplatin-resistenten Zellen, verglichen mit den sensitiven Zellen, signifikant reduziert. Dies deutet darauf hin, dass CFDA-Pt-Cl₂ entsprechend wie Cisplatin auch aktiv in die Zelle aufgenommen wird [114]. CFDA-Pt-Cl₂ ist selbst nicht fluoreszierend. Erst die Hydrolyse der Acetylgruppen führt zum fluoreszierenden Carboxyfluoresceindichloro-Platinkomplex (CF-Pt-Cl₂) mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Deacetylierung hat dabei keinen Einfluss auf die pharmakologische Aktivität des Platinzentrums, da dieses nicht verändert wird (siehe Abbildung 4.1). Intrazellulär erfolgt die Abspaltung der Acetylgruppen über Esterasen.

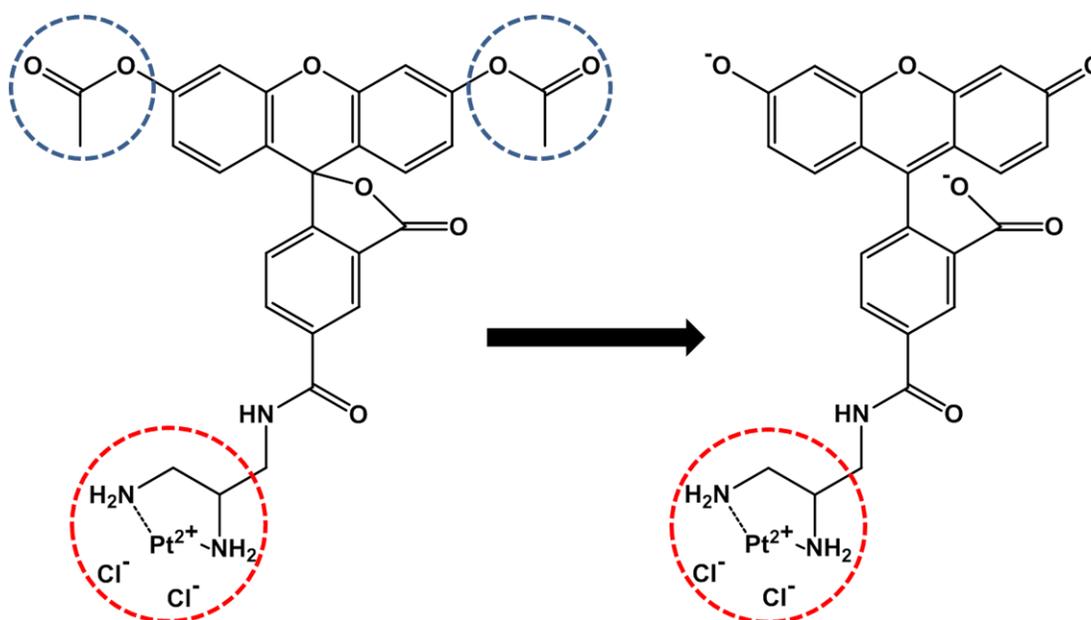


Abbildung 4.1: Chemische Strukturen von CFDA-Pt-Cl₂ (links) vor und CF-Pt-Cl₂ (rechts) nach der Deacetylierung. Die blauen Kreise markieren die Acetylgruppen, der rote Kreis das reaktive Platinzentrum.

Bei pH-Werten größer 7 liegt der Fluoreszenzrest überwiegend (pKs: 6,7 [115]) als Dianion vor. Durch die zwei positiven Ladungen des Platins ergibt sich für CF-Pt ohne weiteren Liganden eine Nettoladung von Null, wobei das Platinzentrum ohne Liganden, wie im Cisplatin, stark positiv geladen ist und sich die negative Ladung auf den Fluoreszenzrest verteilt. D.h. auch, dass die Ladung des Liganden X ausschlaggebend für die Gesamtladung des Komplexes CF-Pt-X ist. Mögliche Liganden für CF-Pt können sowohl negativ geladen (R-COO^- , OH^- , Cl^- , Oxalat) oder neutral (H_2O , $-\text{R-NH}_2$, R-S-CH_3) sein. Denkbar sind aber auch Liganden mit positiven geladenen Strukturelementen (quartäres Stickstoffatom), wobei dieses aber nicht zur Komplexbindung beiträgt, sondern lediglich im Molekül vorhanden ist. Als Trennmethode für die Untersuchung der Adduktbildung von CF-Pt- Cl_2 wurde die Kapillaronenelektrophorese (CZE) gewählt, da diese sowohl negative als auch positive Komplexe erfasst. Ein weiteres Argument für die Kapillaronenelektrophorese ist die hohe Trennschärfe dieser Methode. Dies könnte insbesondere dann hilfreich sein, wenn unterschiedliche Liganden (mit gleicher Ladung und vergleichbarer Größe) ähnliche elektrophoretische Eigenschaften besitzen. Um mit Untersuchungen bezüglich des Reaktionsverhalten von CF-Pt- Cl_2 gegenüber potentiellen Liganden und der Adduktbildung mit niedermolekularen Bestandteilen des Zytoplasmas zu beginnen, mussten geeignete analytische Nachweisverfahren entwickelt und optimiert werden. Hierzu zählten auch die Untersuchungen bezüglich des Reaktionsverhaltens von CF-Pt- Cl_2 gegenüber Pufferbestandteilen und damit die Entscheidung für geeignete Puffer für den Hintergrundelektrolyten oder die Zellyse.

4.2 Methodenentwicklung und -optimierung CE-LIF

Der Hintergrundelektrolyt spielt in der Kapillaronenelektrophorese eine entscheidende Rolle. Wichtige Parameter sind pH-Wert und Konzentration und somit die Ionenstärke. Neben der Wahl der Puffersubstanz kann auch der Zusatz von organischen Lösungsmitteln Einfluss auf die Eigenschaften des Hintergrundelektrolyten haben.

Wichtig für die Vergleichbarkeit verschiedener Messungen ist eine genaue Kenntnis der Stärke des EOF.

4.2.1 Reaktionsverhalten von CFDA-Pt-Cl₂ gegenüber Pufferbestandteilen

Puffer spielen eine wichtige Rolle in der (bio)chemischen Analytik. Sie sollen einen stabilen pH-Wert garantieren und mit dem Analyten nicht reagieren. Für einen pH-Bereich zwischen 7 und 8 existiert nur eine limitierte Auswahl, insbesondere Phosphat, Carbonat, TRIS/HCl und weitere organische Puffer wie z.B. HEPES. Puffer stellen aber immer ein Gleichgewicht zwischen einer Säure und der korrespondierenden Base dar und sind somit auch potentielle Liganden für Metallspezies wie Platin. Insbesondere Komplexe mit Carbonat sind in der Literatur für Platin beschrieben. Je nach pH-Wert und Konzentration wurden Mono-, Dicarbonato- oder Hydroxocarbonato-Komplexe nachgewiesen [21, 116, 117, 118]. Es gibt aber auch Hinweise auf Addukte mit Phosphat [119, 120] und TRIS [121]. Neben der Detektion möglicher Artefakte ist insbesondere bei mechanistischen Studien der Einfluss der Pufferkomponenten auf die Kinetik und den Mechanismus der untersuchten Reaktion zu beachten. Systematische Untersuchungen hierzu sind eher selten [119]. Grabmann et. al. fanden bei der Untersuchung der Reaktion von Cisplatin mit Guanosindiphosphat in verschiedenen Puffersystemen (Phosphat, Carbonat, TRIS), neben der Bildung von Addukten mit Pufferbestandteilen, einen Einfluss der Pufferkomposition auf die Kinetik der Reaktion. Dabei war unter anderem die Halbwertszeit für Cisplatin in Carbonatpuffer um den Faktor sechs höher als in reinem Wasser. Darüber hinaus wurde auch ein Einfluss der Chloridkonzentration im Puffer auf die Kinetik gefunden [121].

Pufferbestandteile können also Addukte mit Platinspezies bilden und dabei auch die Kinetik bzw. die Reaktivität der zu untersuchenden Vorgänge beeinflussen. Durch die Inkubation von CFDA-Pt-Cl₂ in verschiedenen Puffern (bei pH: 7,4 und bei 37°C) wurde dessen Reaktivität bezüglich verschiedener Pufferbestandteile und die Adduktbildung

untersucht und die gebildeten Spezies bestimmt. Die Identifizierung der gefundenen Platinspezies erfolgte durch die in Kapitel 4.3 beschriebene Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer. Die Ergebnisse wurden insbesondere bei der Entwicklung von Zellysepuffer bzw. Inkubationspuffern und Hintergrundelektrolyt (BGE) für die Kapillarelektrophorese berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung: 4.2 dargestellt.

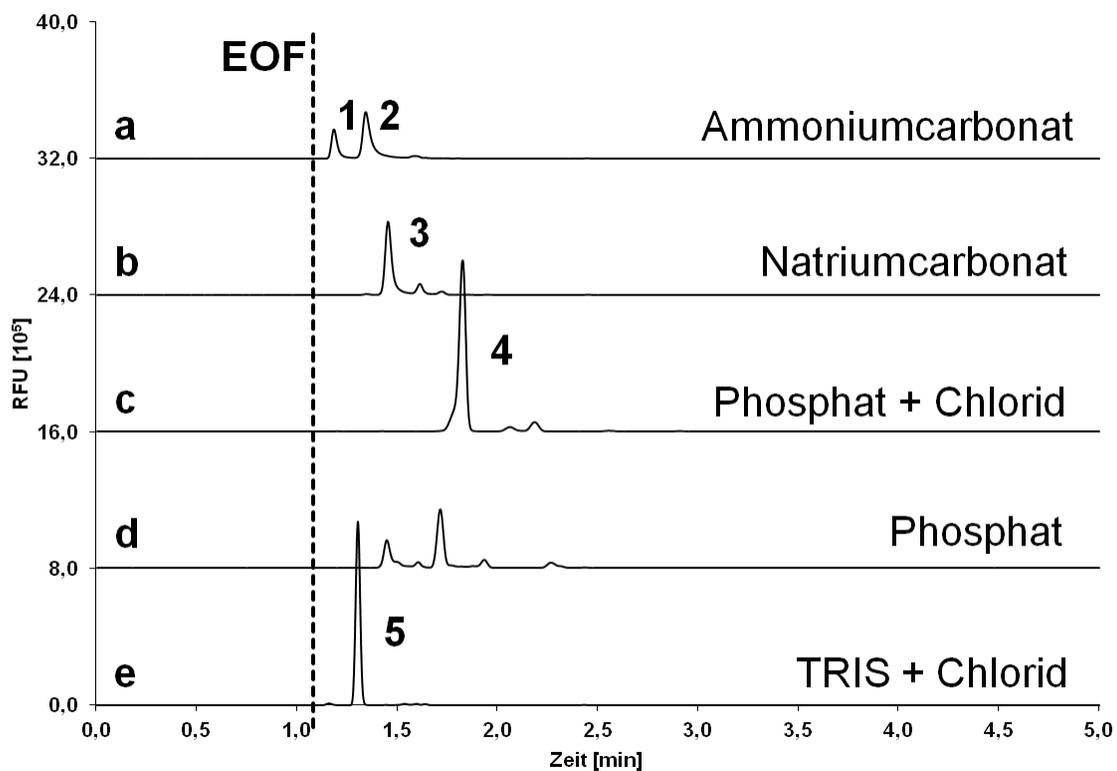


Abbildung 4.2: Elektropherogramme (CE-LIF) von CFDA-Pt-Cl₂ nach Inkubation in Ammoniumcarbonat- (a), Natriumcarbonat- (b), Natriumphosphat- mit (c) bzw. ohne Chlorid (d) und TRIS-Puffer mit Chlorid (e). pH-Wert aller Puffer: 7,4; Chloridkonzentration: 150 mmol/l. (1) CF-Pt-(NH₃)₂, (2) CF-Pt-NH₃H₂O, (3) CF-Pt-CO₃, (4) CF-Pt-Cl₂ (5) CF-Pt-TRIS.

Nach der Inkubation von CFDA-Pt-Cl₂ in Natriumcarbonatpuffer lässt sich eine fluoreszierende Verbindung nachweisen (Abbildung 4.2 Spur b). Hierbei handelt es sich um einen 1:1 Carbonatkomplex (CF-Pt-CO₃, m/z: 701,2 (Peak 3)). Einen Dicarbonatkomplex, wie durch Centerwall et. al für Cisplatin beschrieben [117], konnte nicht nachgewiesen werden. Auch Mischkomplexe aus Aqua-, Hydroxo- oder Chloroliganden mit Carbonat und CF-Pt wurden nicht gefunden.

Ersetzt man Natrium durch Ammonium als Gegenion im Carbonatpuffer, findet man nach der Inkubation keinen Carbonatkomplex mehr, sondern zwei neue Komplexe (Abbildung 4.2 Spur a). Die beiden Chloro-Liganden wurden abgespalten und gegen zwei Ammin-Liganden (CF-Pt-(NH₃)₂, m/z: 675,2 (Peak 2)) bzw. durch einen Aqua- und einen Ammin-Liganden (CF-Pt-(NH₃)(H₂O), m/z: 676,2 (Peak 1)) ausgetauscht. Somit muss auch die Wahl des Gegenions der eigentlichen Pufferkomponente berücksichtigt werden, da es auch hier zur Bildung von Komplexen mit Platinspezies kommen kann. Dies gilt insbesondere für Ammonium, das in wässriger Lösung in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit Ammoniak steht, der wiederum einen attraktiven Liganden für Platin darstellt. Ammonium ist somit insbesondere als Bestandteil von Inkubationspuffern oder Zellysepuffern ungeeignet.

Die Inkubation im Natriumphosphatpuffer liefert ein etwas komplexeres Bild (Abbildung: 4.2 Spur d). Abbildung 4.3 zeigt im Detail den Nachweis von vier verschiedenen platinhaltigen Komplexen. Der Diaquakomplex (Abbildung 4.3) (CF-Pt-(H₂O)₂, m/z: 677,1 (Peak 1)) stellt das zu erwartende Hydrolyseprodukt des CFDA-Platins dar. Darüber hinaus konnten aber auch Komplexe mit einem Phosphatliganden (CF-Pt-H₂PO₄/H₂O, m/z: 755,1 (Peak 2)) bzw. zwei Phosphatliganden (CF-Pt-(H₂PO₄)₂, m/z: 835,1 (Peak 4)) detektiert werden. Zusätzlich wurde auch ein zweikerniger Platinkomplex (CF-Pt)₂-H₃PO₄/H₂O, m/z: 1395,1 (Peak 3)) nachgewiesen.

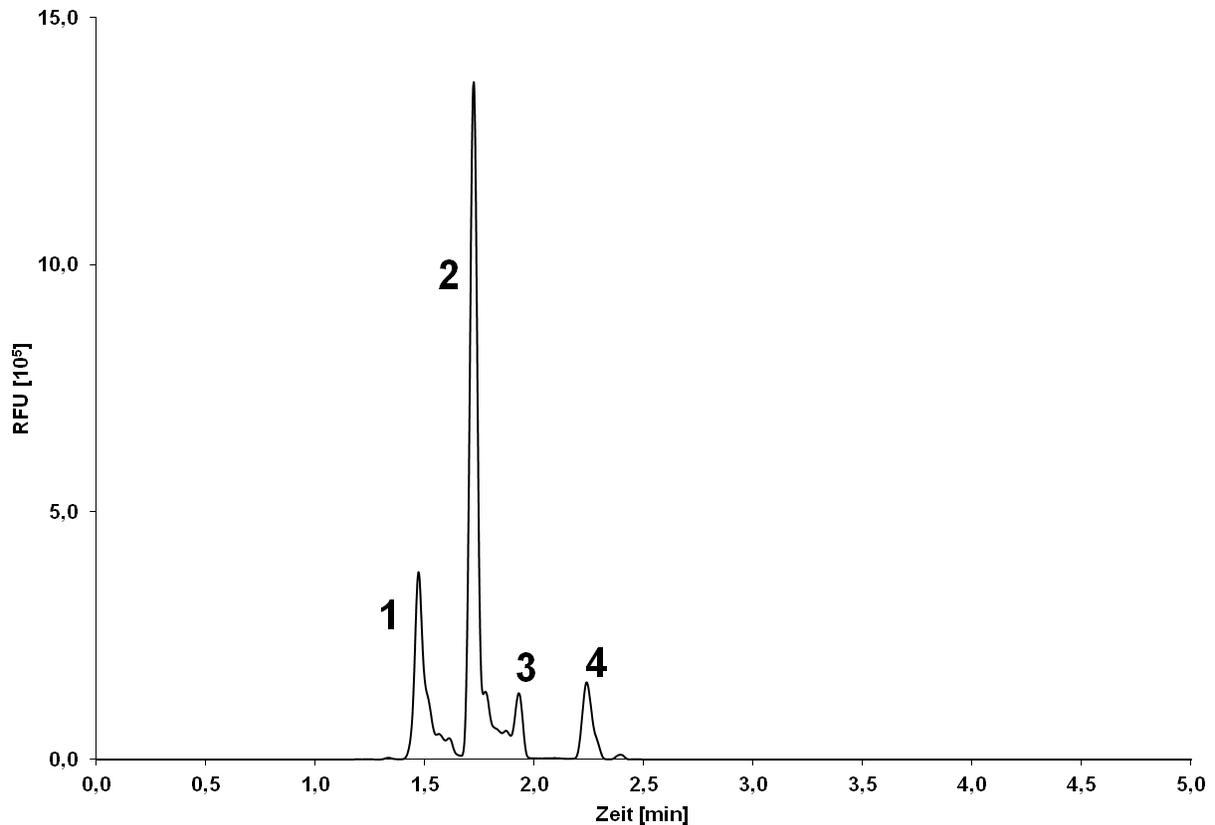


Abbildung 4.3: Elektropherogramm (CE-LIF) von CFDA-Pt-Cl₂ nach Inkubation in Natriumphosphatpuffer ohne Chlorid. (1) CF-Pt-(H₂O)₂, (2) CF-Pt-H₂PO₄/H₂O, (3) (CF-Pt)₂-H₂PO₄/H₂O, (4) CF-Pt-(H₂PO₄)₂.

Wurde dem Phosphatpuffer Chlorid beigefügt (150 mM), konnten keine Phosphat-Addukte mehr beobachtet werden (Abbildung 4.2 Spur c). Das Chlorid führte zu einer Stabilisierung des Dichlorokomplexes (CF-Pt-Cl₂, m/z: 713,1). Vergleichbares wurde auch für die Reaktion im Natriumcarbonatpuffer beobachtet.

Die Inkubation von CFDA-Pt-Cl₂ in TBS (Abbildung 4.2 Spur e) hingegen führte trotz einer Chloridkonzentration von 150 mmol · l⁻¹ zu einem Austausch der beiden Chloro-Liganden gegen ein TRIS-Molekül (CF-Pt-TRIS, m/z: 760,2 (Peak 5)). Vergleichbares gilt auch für andere organische Puffer wie z.B. HEPES. Die Reaktivität des Platins bezüglich der stickstoffhaltigen Liganden ist sehr hoch und resultiert in der Bildung entsprechender Addukte. Das macht organische stickstoffhaltige Puffer somit für die

Analytik von Platinkomplexen ungeeignet. Dies gilt insbesondere für labile Platinkomplexe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich für CF-Pt-Cl₂, genauso wie für Cisplatin beschrieben, eine Reaktion mit Pufferbestandteilen beobachten lässt. Die unterschiedlichen Affinitäten und Reaktivitäten von Pufferbestandteilen bezüglich des Platins müssen grundsätzlich berücksichtigt werden und die Bildung von entsprechenden Komplexen kann nicht ausgeschlossen werden. Die höchsten experimentell beobachtbaren Stabilitäten sind bei Komplexen mit organischen Puffern (TRIS, HEPES) festzustellen. Auch eine hohe Chloridkonzentration kann den Dichlorokomplex nicht stabilisieren. Die Reaktion verläuft direkt mit dem Dichlorokomplex. Die entstehenden Komplexe mit z.B. TRIS weisen eine hohe Stabilität auf. Ein Grund hierfür ist, dass es sich um Chelatkomplexe handelt und die Komplexierung über ein Stickstoffatom erfolgt.

Die Stabilität der Komplexe des CF-Pt mit anorganischen Puffern ist geringer. Hier zeigte sich, dass Platin eine höhere Affinität zu Ammin-Liganden hat als z.B. zu Carbonat. Die Reaktion verläuft über die Hydrolyseprodukte (Aqua- und Hydroxo-Komplexe) des Dichlorokomplexes. Die Affinität von anorganischen Puffern (Carbonat, Phosphat) hängt dabei von der Chloridkonzentration ab, die zu einer Stabilisierung des Dichlorokomplexes führt. Die Ergebnisse bestätigen auch die bekannte höhere Affinität des Platins zu stickstoffhaltigen Liganden im Vergleich zu sauerstoffhaltigen Liganden.

Diese Ergebnisse führten zu der Entscheidung für weitere Arbeiten auf Phosphatpuffer zurückzugreifen. Ausschlaggebend waren dabei zusätzlich die hohe Pufferkapazität beim erforderlichen pH-Wert (7,4) und die pH-Wert-Stabilität, die im Vergleich zu Carbonat auch im offenen System gewährleistet ist. Die Addukte von Phosphat mit Platin haben eine vergleichsweise geringe Stabilität und der Dichlorokomplex lässt sich durch den Zusatz von Chlorid stabilisieren.

4.2.2 Hintergrundelektrolyt

4.2.2.1 pH-Wert

Der Hintergrundelektrolyt (BGE) ist für die Kapillar(zonen)elektrophorese von entscheidender Bedeutung. Generelle Anforderungen an einen BGE sind gute pH-Wert-Kontrolle bzw. Pufferkapazität und geringe Leitfähigkeit um zu hohe Ströme und damit einhergehende Joulesche Wärme zu vermeiden. Der pH-Wert des BGE hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke des EOFs und damit auf die Analysenzeit. Gleichzeitig entscheidet der pH-Wert aber auch über den Ladungszustand der Analyten und deren Migrationszeit. Im Falle von Komplexverbindungen hat der pH-Wert auch Einfluss auf deren Stabilität. Da das verwendete Cisplatinanalogon mit einem Fluoresceinrest markiert wurde, hängt aber auch die Intensität des Fluoreszenzsignals vom pH-Wert ab [115]. Unterhalb von pH 7 nimmt die Intensität stark ab. In Abbildung 4.4 wird dieser Zusammenhang für vier verschiedene CF-Pt-Komplexe gezeigt. Somit ist die Analytik auch bei niedrigeren pH-Werten möglich, aber mit Intensitätsverlusten verbunden. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass in einigen Krebszellen auch pH-Werte unter 7,4 beobachtet werden (Warbureffekt) [122, 123].

Desweiteren hängt auch die Mobilität eines Analyten zu einem großen Teil von dessen Ladung ab. Dies macht es sinnvoll für einen einheitlichen Ladungszustand eines Analyten zu sorgen. Der pKs-Wert für das Fluoresceinmono- bzw. dianion liegt bei 6,7 [115]. Unter der Annahme, dass der Platinrest den pKs nicht wesentlich beeinflusst, hat dies zu Folge, dass ein CF-Pt-Komplex bei pH 6,7 zwei elektrophoretische unterscheidbare Spezies bildet, mit entsprechenden Folgen für die Nachweisgrenzen. Sowohl für die Untersuchungen der Komplexbildung von CF-Pt-Cl₂ mit niedermolekularen Bestandteilen des Cytoplasma als auch für weitere Arbeiten wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 [122, 124] gewählt.

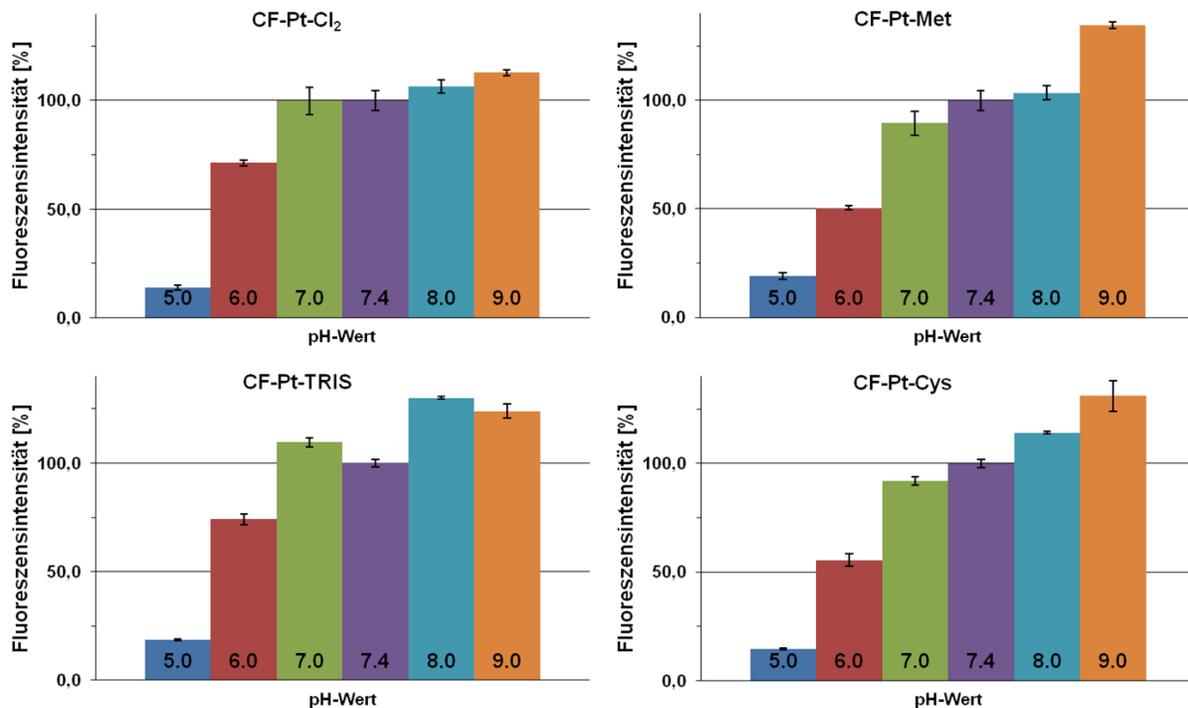


Abbildung 4.4: Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenzintensität verschiedener CF-Pt-Komplexe: CF-Pt-Cys, CF-Pt-TRIS, CF-Pt-Cl₂, CF-Pt-Met. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten (Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, pH 7,4 entspricht 100 %)

4.2.2.2 Puffersubstanz

Organische Puffer (TRIS, HEPES) wurden durch die oben gezeigten Ergebnisse als Grundlage für den Hintergrundelektrolyten ausgeschlossen. Phosphat bzw. Carbonat blieben als Möglichkeiten übrig. Die im Carbonatpuffer (je nach pH-Wert) vorhandene Kohlensäure steht im Gleichgewicht mit ihrem Anhydrid (CO₂) und Wasser, wobei das Gleichgewicht stark in Richtung des CO₂ und Wasser verschoben ist. Das CO₂ in der Pufferlösung wiederum steht mit dem CO₂ in der über der Flüssigkeit liegender Atmosphäre im Gleichgewicht. Stellt die Atmosphäre über der Flüssigkeit ein offenes System dar (mit einem geringen CO₂-Partialdruck), tritt CO₂ aus der Flüssigkeit aus und der pH-Wert steigt. Da die Puffergefäße der CE ein solches offenes System darstellen, bleibt der pH-Wert mit dem Carbonat nur kurzzeitig stabil. Dies führte zu der Entscheidung für weitere Arbeiten (CE-LIF) Natriumphosphat als Basis für den

Hintergrundelektrolyten zu verwenden. Es zeichnet sich durch eine gute Pufferstabilität als auch -kapazität bei pH 7,4 aus. Nachteilig ist aber die hohe Leitfähigkeit, was eine Optimierung insbesondere der Konzentration nötig macht.

4.2.2.3 Optimierung der Phosphatkonzentration im BGE (CE-LIF)

Um eine optimale Konzentration für den Hintergrundelektrolyten zu finden, wurden CF-Pt-Cl₂ als auch die selbst hergestellten Komplexe mit Cystein, Methionin und TRIS bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen (5, 10, 25, 50 mM) bei gleicher Trennungsspannung (30 kV) gemessen (Abbildung 4.5).

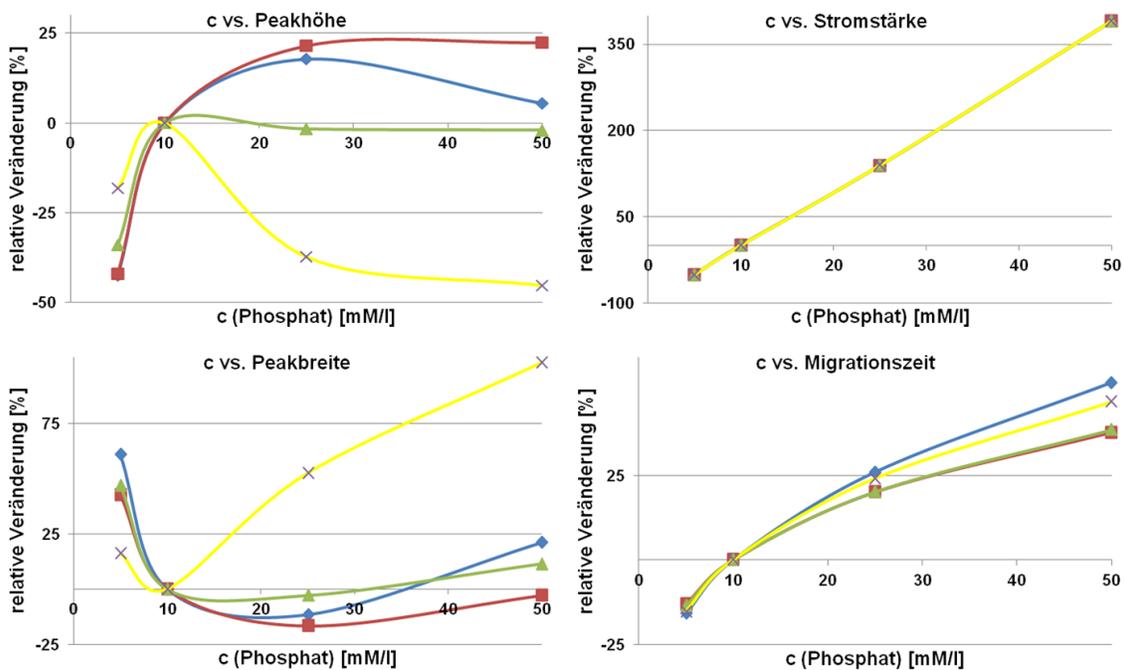


Abbildung 4.5: Einfluss der Konzentration von Phosphat im Hintergrundelektrolyten auf die Stromstärke sowie auf die Peakhöhe, Migrationszeit und Peakbreite verschiedener CF-Pt-Komplexe: Gelb: CF-Pt-Cys, Grün: CF-Pt-TRIS, Blau: CF-Pt-Cl₂, Rot: CF-Pt-Met. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen, 10 mM Phosphat entspricht 100 %)

Die Stromstärke nimmt erwartungsgemäß mit der Konzentration an Phosphat, und der damit einhergehenden Zunahme der Ionenstärke des BGE, zu [76]. Bei 5 mM Phosphat liegt sie bereits bei 12,1 μA und steigt auf 121,7 bei 50 mM Phosphat. Die durch den Stromfluss in der Kapillare erzeugte Wärme steigt mit dem Quadrat der Stromstärke an (Stromwärmegesetz). Dies erhöht die Diffusion und wirkt der Trennleistung entgegen. Die Migrationszeit der Komplexe nimmt ebenfalls mit steigender Pufferkonzentration zu. Die hierdurch zunehmende Ionenstärke des BGE führt zu einer Stauchung der elektrolytischen Doppelschicht an der Kapillaroberfläche und somit zu einer Verringerung des Zeta-Potentials und des EOF [76]. Beim Einfluss auf die Peakhöhe bzw. -breite bot sich ein differenzierteres Bild: Die Peakbreite des Komplexes mit Cystein nahm mit steigender Phosphatkonzentration zu, die Peakhöhe dadurch ab. Bei dem Komplex mit Methionin bzw. beim Dichlorokomplex war jedoch eher das Gegenteil zu beobachten.

Die Anforderungen an die optimale Phosphatkonzentration waren möglichst hohe (Empfindlichkeit), schmale Peaks (hohe Trennschärfe) und kurze Analysezeiten bei einer geringen Stromstärke zu erzielen. Die kurzen Analysezeiten sollten einer möglichen Zersetzung (Hydrolyse) labiler Platinkomplexe bzw. deren Reaktion mit Pufferbestandteilen entgegenwirken. Auf den Zusatz von Chlorid (Stabilisierung des Dichlorokomplexes) zum Hintergrundelektrolyten wurde verzichtet. Zum einen war die Analytik ohne Hydrolyse durch die schnelle Migration möglich und zum anderen hätte das zusätzliche Chlorid erheblich zur Steigerung der Stromstärke beigetragen. Desweiteren wären die Chloridionen gegen den EOF migriert und hätten die Trennung gestört. Eine Phosphatkonzentration von 10 mM erwies sich als optimale Konzentration, da dies für mehrere Spezies (CF-Pt-Cl₂, CF-Pt-Methionin) zu Verbesserungen und nur bei einer Spezies (CF-Pt-Cystein) zu leichten Verschlechterungen der Empfindlichkeit führte. Außerdem blieb die Stromstärke in vertretbaren Größenordnungen (ca. 25 μA) und die Analysezeit für die meisten Komplexe unter drei Minuten.

4.2.2.4 Zusatz von organischen Lösungsmitteln im BGE (CE-LIF)

Eine weitere Möglichkeit die Trennleistung des BGE zu verbessern ist der Zusatz von organischen Lösemitteln. Die Zugabe kann bis 100 % betragen (NACE - *non-aqueous capillary electrophoresis*) [125, 126]. Der Einfluss organischer Lösungsmittel ist vielseitig. Sie verändern das Zeta-Potential, die Viskosität und somit u.a. die Migration der Analyten und beeinflussen die pK_s -Werte von Analyten und BGE. Um die Wirkung eines erhöhten Anteils an organischen Lösungsmitteln im Hintergrundelektrolyten zu testen, wurden vier verschiedene CF-Pt-Komplexe mit unterschiedlichen Konzentrationen an organischen Lösemitteln (u.a. Methanol, Isopropanol, Acetonitril) bei gleichbleibender Phosphatkonzentration (10 mM) und Trennungsspannung (30 kV) vermessen.

Zusammenfassend war für alle getesteten Lösungsmittel eine Abnahme des EOF und eine damit verbundene Zunahme der Migrationszeit zu beobachten. In Abbildung 4.6 sind stellvertretend die Ergebnisse für Acetonitril (ACN) (0, 1, 5, 10, 20 Vol%) dargestellt. Mit zunehmendem Anteil an organischen Lösungsmitteln nahm die Peakhöhe leicht ab (für CF-Pt-Cystein sogar deutlich: ca. 30 % bei 20 % ACN) und die Peakbreite zu. Als positiv war eine leichte Abnahme der Stromstärke zu verzeichnen. Da die Zugabe von organischen Lösungsmitteln keine positiven Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der Analytik hatte, wurde von einem Zusatz abgesehen.

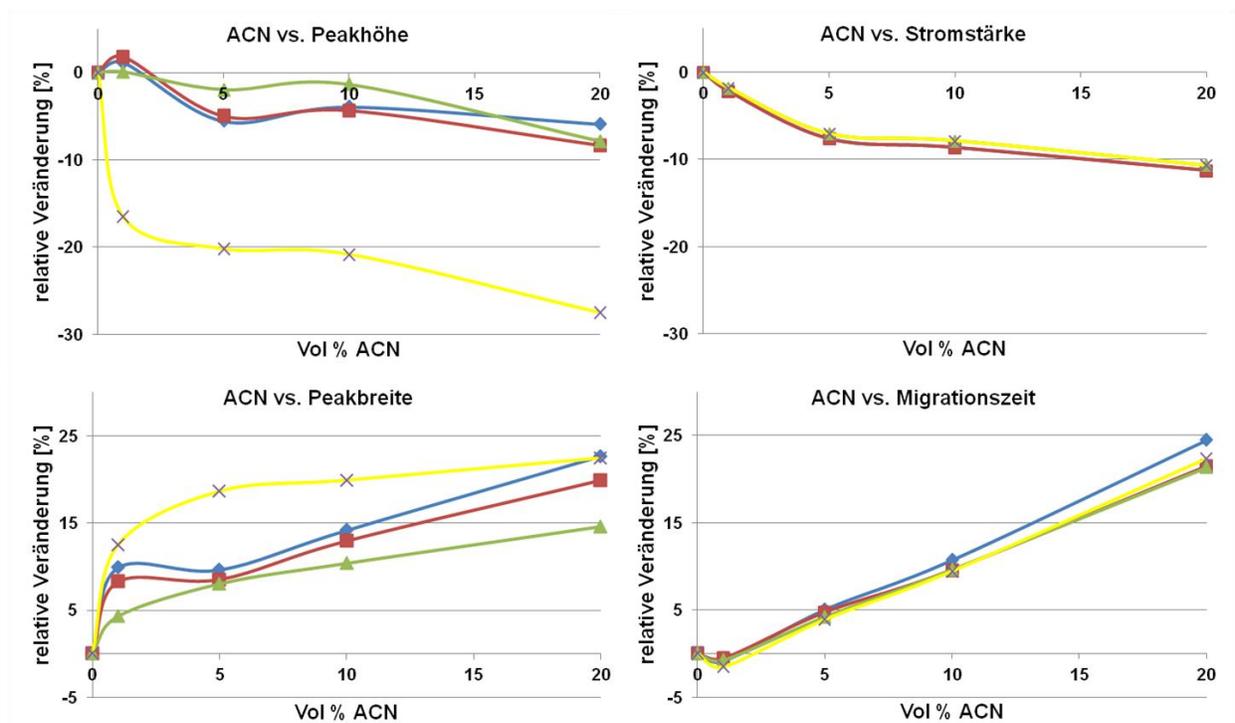


Abbildung 4.6: Einfluss des prozentualen Anteils an ACN im Hintergrundelektrolyt auf die Stromstärke sowie auf die Peakhöhe, Migrationszeit und Peakbreite verschiedener CF-Pt-Komplexe: Gelb: CF-Pt-Cys, Grün: CF-Pt-TRIS, Blau: CF-Pt-Cl₂, Rot: CF-Pt-Met. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen, der rein wässrige BGE entspricht 100 %)

4.2.3 EOF-Marker

Um verschiedene Messungen mittels Kapillaronenelektrophorese direkt miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, die Stärke des elektroosmotischen Flusses (EOF) zu kennen. Kleinste Änderungen des EOFs, z.B. durch Temperatur- oder pH-Schwankungen, führen zu veränderten Migrationszeiten der Analyten. Insbesondere bei der Analytik von biologischen Proben besteht auch die Möglichkeit, dass Bestandteile der Probe (Proteine, Peptide, Lipide) mit der Oberfläche der Kapillare interagieren und so auch zu starken Änderungen des EOF führen können. Ein Vergleich zweier Messungen ist dann nur noch über die effektiven Mobilitäten der Analyten möglich. Die Stärke des EOFs kann mit einem EOF-Marker bestimmt werden. Dieser wird mit der

Probe gemessen und muss beim pH-Wert des Hintergrundelektrolyten eine Nettoladung von Null besitzen, d.h. entweder ungeladen oder zwitterionisch sein. Klassische EOF-Marker für einen pH-Wert um 7,4 sind DMSO oder DMF für CE-DAD oder UV bzw. Koffein für CE-MS. Bei der Suche nach EOF-Markern für CE-LIF besteht das Problem, dass die meisten Fluoreszenzfarbstoffe funktionelle Gruppen mit positiven oder negativen Ladungen besitzen um die Löslichkeit zu verbessern. Darüber hinaus muss die Anregungswellenlänge zum verwendeten Laser passen. Demgegenüber steht eine mittlerweile breite Palette kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoffe. Startpunkt bei der Suche nach einem geeigneten EOF-Marker bei pH 7,4 war DMF. Abbildung 4.7 zeigt die Elektropherogramme (links; CE-DAD) von DMF und Rhodamin B.

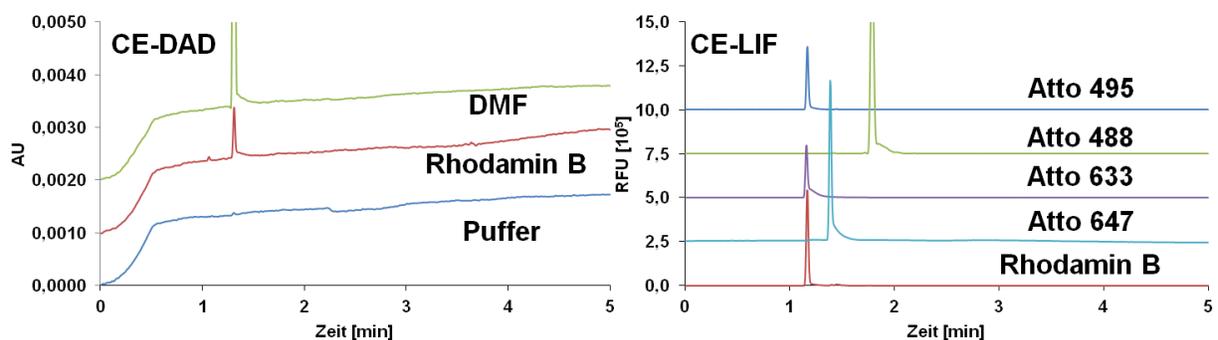


Abbildung 4.7: Elektropherogramme (CE-LIF, rechts) verschiedener fluoreszierender Farbstoffe bzw. (CE-DAD, links) von DMF und Rhodamin B.

Beide zeigen identische Migrationszeiten und bekräftigten dadurch die Annahme, dass auch Rhodamin B als EOF-Marker bei pH 7,4 eingesetzt werden kann. Entsprechend der gleichen Analogie wurde Rhodamin B mit weiteren Fluoreszenzfarbstoffen mittels CE-LIF verglichen (Abbildung 4.7, rechts). Als geeignet erwiesen sich weiterhin Atto 495 und 633. Durch die Nutzung von Atto 633 (effiziente Anregung der Fluoreszenz: 610 – 645 nm) war es möglich die Detektion von EOF und die Analytensignale voneinander zu trennen (Abbildung 4.8 a). Hohe Signale im 488-nm-Kanal führten auch zu kleinen Signalen im 635-nm-Kanal. Anders herum war dies nicht der Fall.

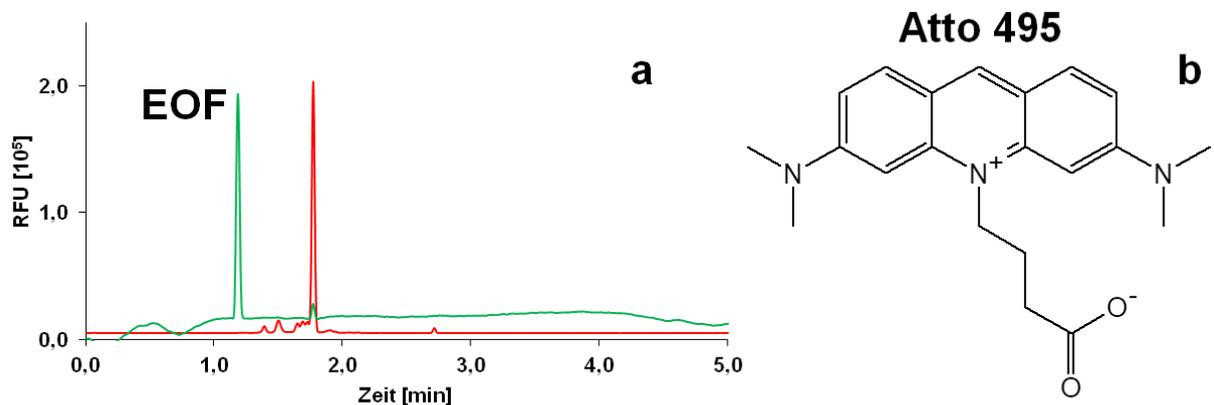


Abbildung 4.8: a) Elektropherogramm einer biologischen Probe + EOF-Marker b) Strukturformel von Atto 495 (EOF-Marker für den 488 nm Kanal)

4.2.4 Empfindlichkeit CE-LIF

Mit den beschriebenen Optimierungen war es möglich fluoreszierende CF-Platinaddukte mittels CE-LIF bei Konzentrationen im unteren pikomolaren Bereich nachzuweisen und zu quantifizieren (Abbildung 4.9). Tabelle 4.1 zeigt für CE-LIF die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen für die beiden Komplexe CF-Pt-Cl₂ und CF-Pt-Methionin. Das entspricht bei einem Injektionsvolumen von ca. 6 nl (5 s bei 0,5 psi (0,0344 bar)) einigen Attomol absoluter Stoffmenge. Eine weitere Erhöhung des Injektionsvolumens führte überwiegend zur Peakverbreiterung und nicht zu einem Absinken der Nachweisgrenzen.

Tabelle 4.1: Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (CE-LIF) für CF-Pt-Cl₂ und CF-Pt-Methionin. Berechnet nach DIN 32645 (Kalibriermethode)

Platin-Komplex	Nachweisgrenze [ng/l]	Quantifizierungsgrenze [ng/l]
CF-Pt-Cl ₂	0,16	0,60
CF-Pt-Methionin	0,11	0,39

Über den Vergleich von Mobilitäten bekannter Platinkomplexe ist auch eine eingeschränkte Identifizierung möglich. Eine eindeutige Quantifizierung der Platinkomplexe ist mit CE-LIF bis hinunter zu sehr kleinen Konzentrationen sicher

möglich und im Vergleich zur massenspektrometrischen Detektion wesentlich einfacher. Abbildung 4.9 d zeigt die lineare Regression von elf Standards von CF-Pt-Cl₂ (97,7 pM bis 100 nM) mit einer Varianz R² von 0,9999.

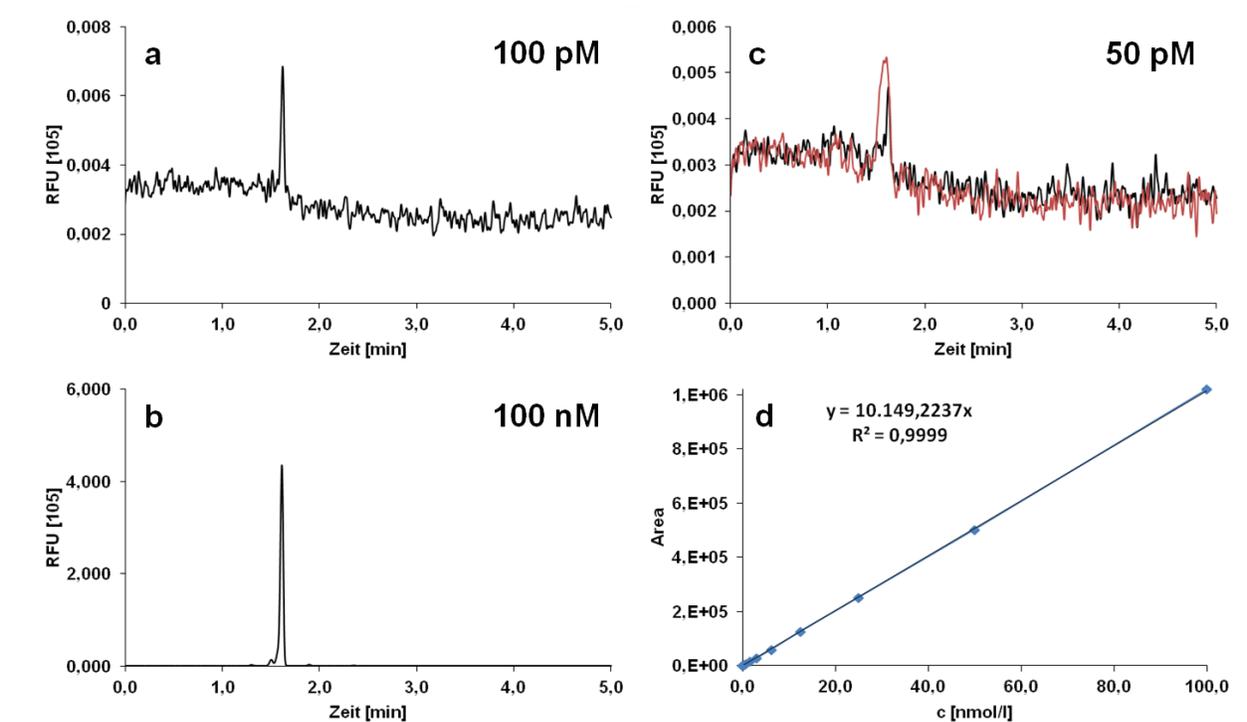


Abbildung 4.9: Elektropherogramme (CE-LIF) von CF-Pt-Cl₂: a) 100 pM, b) 100 nM, c) 50 pM bei 6,2 nl (schwarz) bzw. 25,2 nl (rot) Injektionsvolumen.

Mit CE-LIF ist zwar eine empfindliche Detektion und genaue Quantifizierung möglich, nicht jedoch eine eindeutige Identifizierung der Platinkomplexe. Insbesondere bei unbekanntem Spezies muss die Identifizierung mittels massenspektrometrischer Detektion erfolgen.

4.3 Methodenentwicklung und -optimierung CE-MS

Bei der Verbindung von CE und MS sind einige Besonderheiten zu berücksichtigen. Vor allem die möglichst störungsfreie Kopplung der Trennungsspannung der CE (bis 30 kV) mit

der ESI-Spannung (bis 5 kV) ist zu beachten. Darüber hinaus sind nicht alle Puffer MS-kompatibel. Verschiedene MS-Parameter, BGEs und Sheath-Liquid Einstellungen bzw. Varianten wurden mit Hilfe der beiden Komplexe CF-Pt-Cystein bzw. dem Dichlorokomplex untersucht und optimiert.

4.3.1 Hintergrundelektrolyt

Für den BGE für CE-MS gelten die gleichen Anforderungen wie bereits für CE-LIF beschrieben. Darüber hinaus muss der verwendete Puffer ESI-kompatibel sein. Aus diesem Grund wurde auf Phosphat verzichtet. Ammoniumhydrogencarbonat und -acetat sind beide ESI-kompatibel. Der pK_s -Wert (6,35) von Carbonat liegt näher am gewählten pH-Wert von 7,4 als Acetat (4,76) und war somit besser geeignet [127]. Auch bezüglich der Empfindlichkeit konnten mit Carbonat bessere Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 4.10).

Der pH-Instabilität des Carbonatpuffers im offenen System wurde durch einmalige Verwendung pro Analyse und anschließendem Austausch mit frischem Puffer entgegengewirkt. Die Zugabe von 10 % Isopropanol zum Hintergrundelektrolyten sollte die Vermischung von BGE und Sheath Liquid (5 mM Ammoniumacetat in Wasser : Isopropanol (50:50)) erleichtern und zu einem verbesserten Desolvatationsprozess in der ESI-Quelle führen. Zu beobachten war jedoch eine schlechtere Empfindlichkeit mit der bereits beobachteten langsameren Migration der Analyten (Abbildung 4.10). Aus diesem Grund wurde auf die Zugabe von Isopropanol verzichtet. Als Hintergrundelektrolyt für die CE-MS-Analytik wurde somit ein 20 mM Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,4) verwendet. Als EOF-Marker wurde Koffein (10 μ M) genutzt.

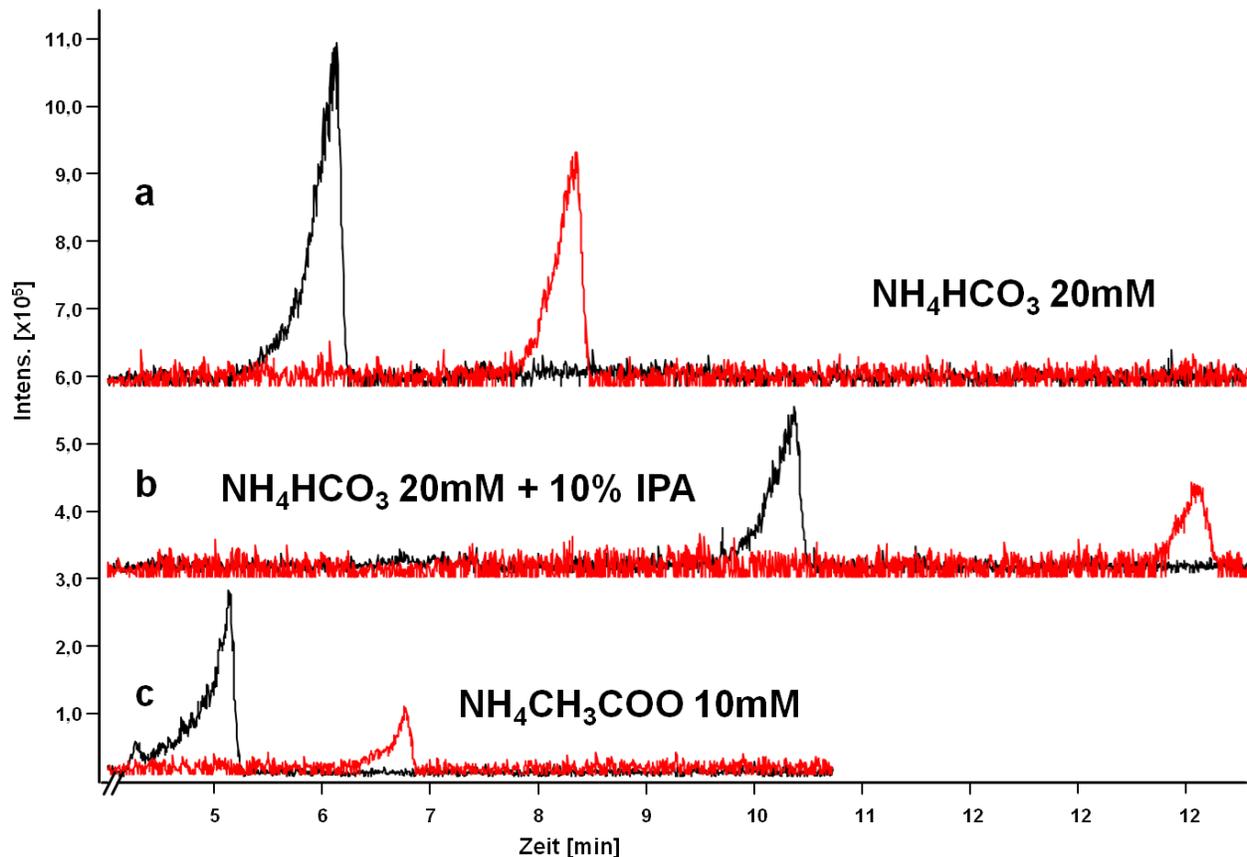


Abbildung 4.10: Elektropherogramme (CE-MS) von CF-Pt-Cystein (schwarz) und CF-Pt-Cl₂ (rot) bei verschiedenen BGE: a) NH₄HCO₃ (20 mM), b) NH₄HCO₃ (20 mM) plus 10 % Isopropanol, c) NH₄CH₃COO (10 mM).

4.3.2 Optimierung der MS-Parameter

Als relevante MS-Parameter wurden die ESI-Spannung bzw. Nebulizer- und Drygas hinsichtlich ihres Einflusses auf den Nachweis von CF-Pt-Cystein und CF-Pt-Cl₂ untersucht und entsprechend optimiert. Als Ergebnis zeigte sich, dass für das Nebulizergas ein Mindestdruck von 2 psi (0,138 bar) zu wählen ist. Unterhalb dieses Druckes bricht das Spray zusammen und eine Detektion ist nicht möglich. Wird der Druck erhöht, nehmen die Peakhöhe und die Analysenzeit ab (Abbildung 4.11). Generell konnte beobachtet werden, dass ein injiziertes Probevolumen auch ohne angelegte Trennspannung durch die Kapillare in die ESI-Quelle wandert (ca. 30 min bei 8 psi

(0,552 bar)). Da Kapillareingang und -ausgang auf der gleichen Höhe lagen, ist ein hydrostatischer Einfluss auszuschließen. Erklären lässt sich dies durch einen höheren Saugeffekt auf der ESI-Seite durch das Nebulizer-Gas [128, 129]. Ein Fluss von 8 l/min wurde als optimaler Wert für das Drygas ermittelt. Die Temperatur des Drygases wurde auf 200°C (Abbildung 4.11) festgelegt. Eine Erhöhung auf 250°C führte zwar zu einer leichten Intensitätssteigerung für CF-Pt-Cystein, einer Zersetzung insbesondere von labilen Komplexen durch zu hohe Temperaturen sollte aber verhindert werden. Dies gilt auch für die ESI-Spannung. Hierfür wurde ein Wert von 4,0 kV (Abbildung 4.11) gewählt. Eine Erhöhung ergab ebenfalls eine leicht bessere Intensität. Ein Zerfall von weniger stabilen Komplexen in der ESI-Quelle sollte ebenfalls minimiert werden.

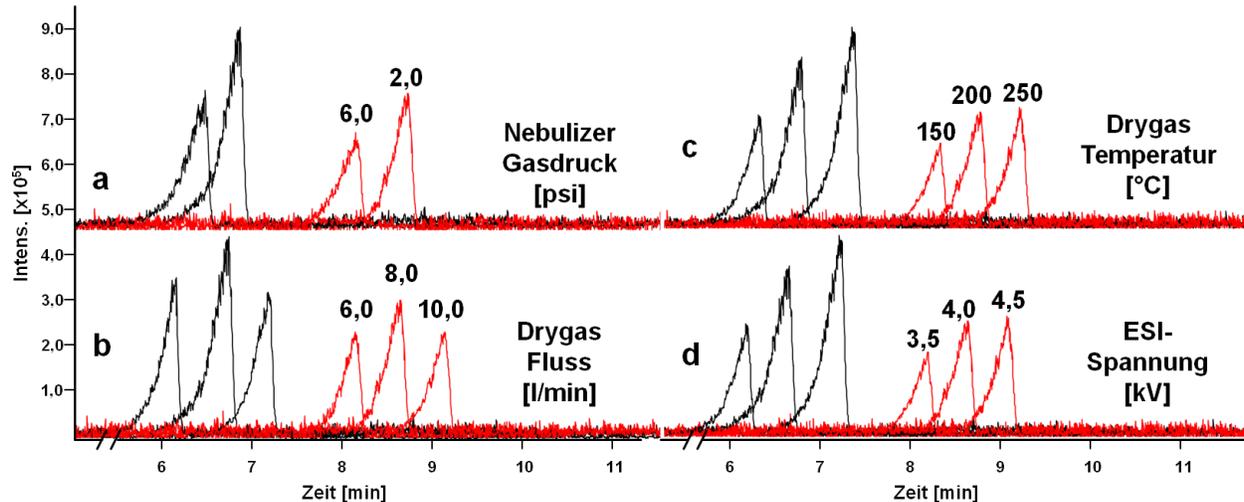


Abbildung 4.11: Elektropherogramme (CE-MS) von CF-Pt-Cystein (schwarz) und CF-Pt-Cl₂ (rot) bei verschiedenen MS-Parametern: a) Nebulizer Gasdruck, b) Drygas Fluss, c) Drygastemperatur, d) ESI-Spannung (BGE: 20 mM NH₄HCO₃ pH 7,4; U_{CE}: 25 kV; SL: 5 mM Ammoniumacetat in Wasser/Isopropanol (50/50)).

4.3.3 Kopplung Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer

Die gewählte Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer (Agilent) war zu Beginn dieser Arbeit das einzige kommerzielle erhältliche Interface zwischen CE

und MS. Zu optimierende Parameter sind die Höhe des Flusses und insbesondere die Zusammensetzung des Sheath liquid.

4.3.3.1 Sheath Liquid

In der verwendeten CE-MS Kopplung (Agilent) vermittelt das Sheath Liquid den elektrischen Kontakt zwischen den beiden Kapillarenden der CE. Die Potentialdifferenz und die Polarität resultiert aus der angelegten Spannung am Kapillareingang, da der Ausgang der Kapillare zusammen mit der Quelle des MS geerdet ist und bei einem Potential von Null liegt. Das Ende der Kapillare befindet sich hierfür in einer Stahlkapillare, über die das Sheath Liquid zugeleitet wird. An der Spitze der beiden Kapillaren treffen Hintergrundelektrolyt und Sheath Liquid konzentrisch aufeinander. Die Potentialdifferenz wird dadurch bis zum Kapillarende aufrechterhalten. Nachteil dieser Kopplung ist die Verdünnung des Hintergrundelektrolytens inklusive der Analyten durch das Sheath Liquid. Grundlage des Sheath Liquid bildet ein ESI-kompatibler Elektrolyt. Zur Verbesserung des Desolvationsprozesses liegt der Anteil organischer Lösungsmittel am Sheath Liquid zwischen 10 und 90 Prozent. Ein Fluss von 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ wird in der Literatur [130, 131] als Standardfluss beschrieben. Eine Reduktion auf bis zu 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ ist möglich, führt aber zu einer Zunahme des Hintergrundrauschens und zeitweilig zum Zusammenbruch des Sprays. Darüber hinaus war keine Intensitätssteigerung für die Komplexe CF-Pt-Cystein und $-\text{Cl}_2$ zu beobachten (Abbildung 4.12 Spur a und b). Unterhalb von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ war das Spray dauerhaft instabil. Der Zusatz von Ameisensäure (0,1 %) zum Sheath Liquid verringert die Intensität der beiden Komplexe dagegen erheblich (Spur c). Ein Verhältnis Wasser zu Isopropanol von 50:50 zeigte ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis bei maximaler Intensität (Spur a). Wurde der Anteil an Isopropanol erhöht nahm das Hintergrundrauschen stark zu. Bei einem geringeren Anteil Isopropanol nahm die Signalintensität stark ab.

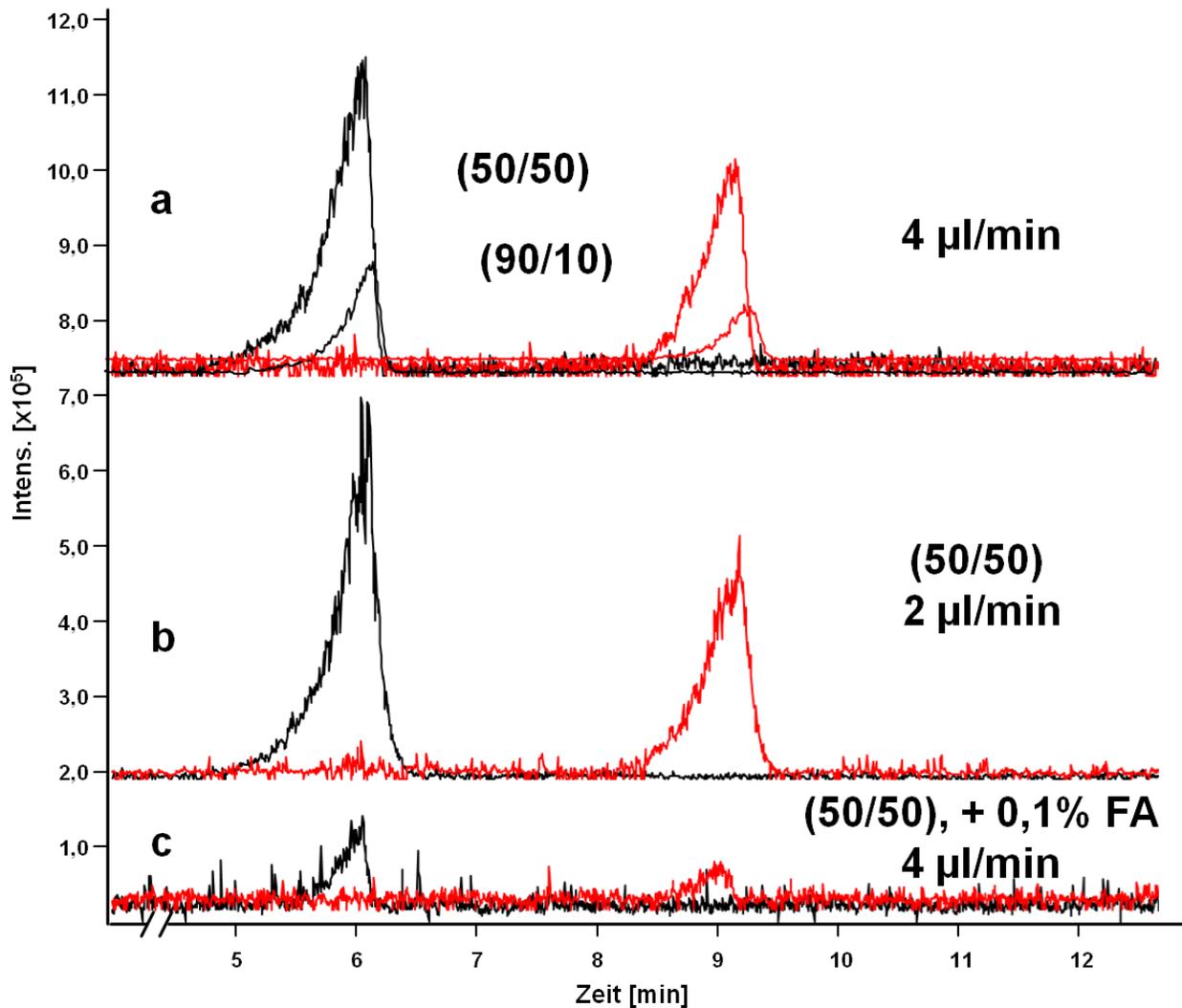


Abbildung 4.12: Elektropherogramme (CE-MS) von CF-Pt-Cystein (1 µM, schwarz) und CF-Pt-Cl₂ (1 µM, rot) bei verschiedenen Sheath Liquid Varianten/Einstellungen: a) H₂O/Isopropanol (50/50) und (90/10) bei 4 µl/min, b) H₂O/Isopropanol (50/50) bei 2 µl/min, c) H₂O/Isopropanol (50/50) 4 µl/min plus 0,1 % Ameisensäure (BGE: 20 mM NH₄HCO₃ pH 7,4; U_{CE}: 25 kV).

Ausgehend von diesen Ergebnissen bestand das verwendete Sheath-Liquid aus 5 mM Ammoniumacetat in Wasser/Isopropanol (50/50) und wurde mit einem Fluss von 4 µl/min in das Interface gepumpt.

4.3.3.2 CE-MS-Kopplung mittels dielektrisch behindertem Elektrospray

Für die Ionisation im Bereich der Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie wird über eine Anwendung des DB-ESI berichtet [86, 87]. Eine Verwendung des DB-ESI zur Kopplung von CE und MS ist in der Literatur nicht erwähnt und wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet. Das Ziel war eine Kopplung von CE und MS ohne ein verdünnendes Sheath-Liquid und ohne eine Limitierung der Trennungsspannung wie bei den bereits existierenden Sheathless-Kopplungen.

Zu Beginn der Arbeiten wurde überprüft, ob die durch das BD-ESI hervorgerufenen Ladungsverschiebungen in der Silica-Kapillare einen störenden Effekt auf die elektrolytische Doppelschicht an der Kapillaroberfläche haben. Dabei konnte kein negativer Einfluss auf den EOF und die kapillarelektrophoretische Trennung beobachtet werden.

Der schematische Aufbau einer experimentellen CE-DB-ESI-MS Kopplung ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Bei diesem Aufbau gibt es keine direkte Stromableitung des CE-Stromes, wie in den oben beschriebenen Interfacetypen. Das Massenspektrometer dient als Nullpotential der CE-Spannung. Der leitende Kontakt zwischen MS und der CE-Kapillare erfolgt über das Spray.

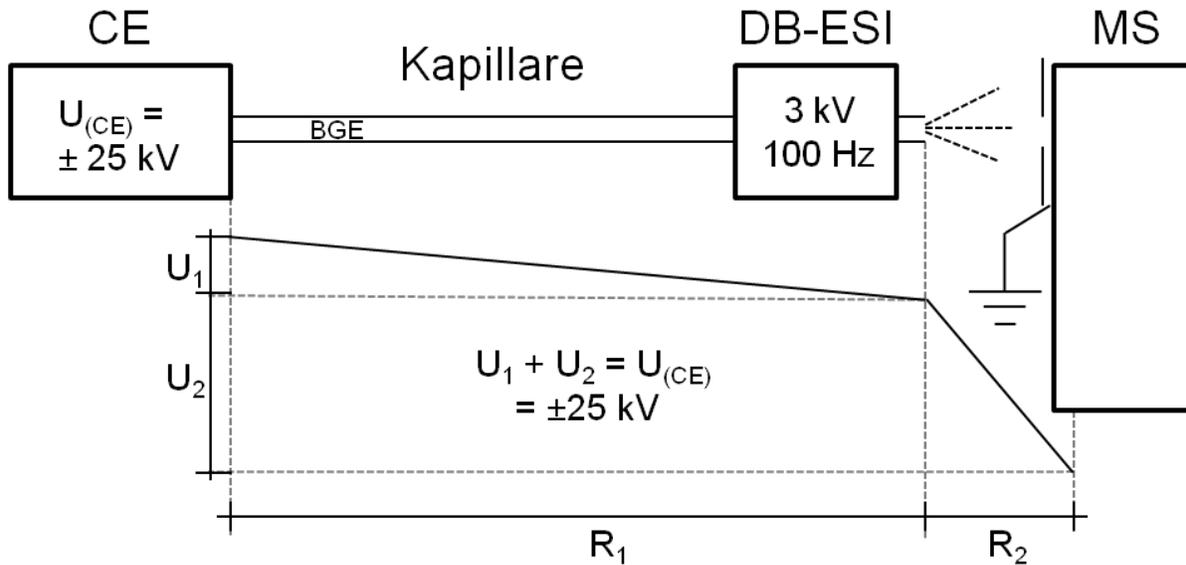


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung einer experimentellen CE-MS online-Kopplung über ein dielektrisch behindertes Elektrospray

Da das Spray jedoch einen wesentlich höheren Widerstand (R_2) darstellt als der Widerstand des Hintergrundelektrolyten in der CE-Kapillare (R_1), ist der Spannungsabfall innerhalb der Kapillare (U_1) entsprechend geringer als im Spray (U_2) und die effektive Trennungsspannung ist nicht mehr ausreichend für eine sinnvolle elektrophoretische Trennung. Dieser Versuch zeigt auch, dass für die Kopplung von CE und MS eine direkte Stromableitung des CE-Stroms nötig ist, um ein ausreichendes Potential für eine kapillarelektrophoretische Trennung zu erzielen. Diese Ergebnisse führten zu einem weiteren experimentellen CE-DB-ESI-MS-Aufbau (Abbildung 4.15) mit einem direkten Stromabfluss für den CE-Strom.

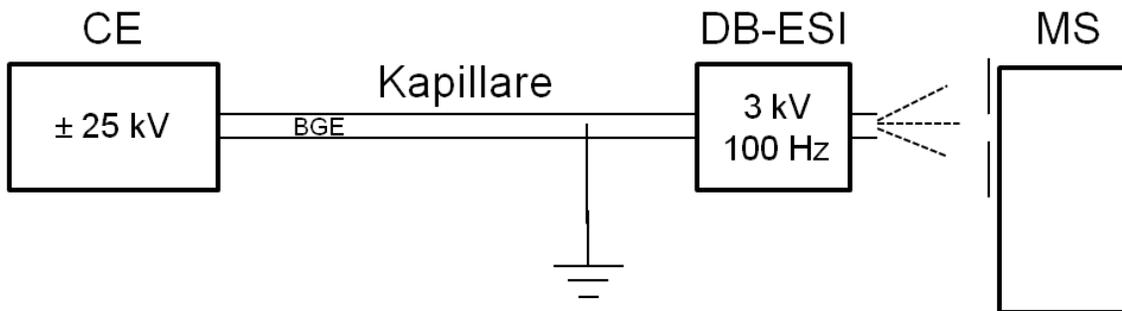


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung einer experimentellen CE-MS online-Kopplung über ein dielektrisch behindertes Elektrospray

Ein direkter Stromschluss am Ausgang der Kapillare würde jedoch die Funktion des DB-ESI stören und muss deshalb einige cm vor dem DB-ESI erfolgen, um ein ausreichendes Spray zu garantieren. Wird dieser Kontakt über einen Drei-Wege-Verbinder mit einem eingeschobenen Platindraht als Elektrode vermittelt ist die Kopplung prinzipiell funktionsfähig. Die bei der Elektrolyse am Platindraht gebildeten Gasblasen stören sowohl die kapillarelektrophoretische Trennung als auch das DB-ESI. Um dies zu verhindern, wurde das in Abbildung 4.16 dargestellte Interface entwickelt.

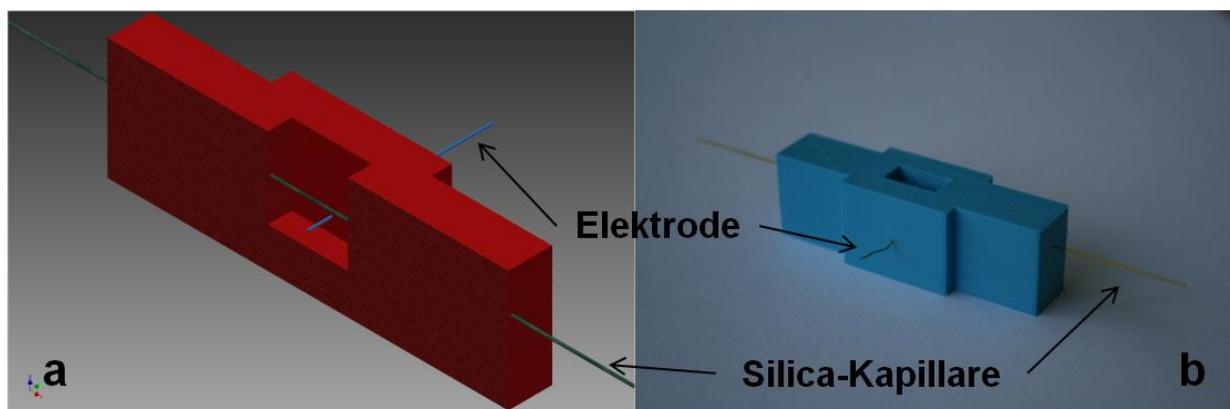


Abbildung 4.16: Darstellung eines CE-MS-Interface: a) Schematischer Halbschnitt und b) Prototyp

Hierfür wird ein Stück Silica-Kapillare mit Hilfe eines 3D-Druckers stabil in einen Kunststoffblock eingebettet und durchläuft innerhalb des Blockes einen Hohlraum. Dieser wird genutzt um, entsprechend der Arbeiten von Moini et. al, die Kapillare mit Flusssäure auf wenige μm Wandstärke zu ätzen. Anschließend kann das Interface mit der CE-Kapillare und dem DB-ESI verbunden werden. Der Hohlraum wird mit einem Elektrolyten gefüllt und über die eingebaute Elektrode kann der Stromschluss der CE-Kapillare erfolgen. Der Ort der Elektrolyse wird aus der Kapillare heraus genommen und ein zusätzliches Totvolumen durch den Drei-Wege-Verbinder wird ebenfalls vermieden.

Das entwickelte Interface bietet die Möglichkeit CE und MS über ein DB-ESI unter den beschriebenen Bedingungen zu koppeln. Vorteil dieser Art Kopplung ist die fehlende Verdünnung der Analyten durch ein Sheath-Liquid (Sheathless-Interface) und eine hohe

Kompatibilität mit verschiedenen Typen von Massenspektrometern, da die Potentiale von Kapillarelektrophorese und ESI-Spannung voneinander entkoppelt sind. Ein Nachteil ist, dass das Potentialgefälle in der CE-Kapillare - und somit die für die Trennung der Analyten verantwortliche Kraft - nicht bis zur Emitterspitze reicht. Auf den letzten sieben bis zehn cm fehlt somit die trennende Kraft und die Diffusion wirkt der Trennung entgegen. Eine Evaluierung der Vor- und Nachteile bzw. der konstruktiven Stabilität des Interfaces ist Gegenstand weiterer Arbeiten. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Arbeiten das Standard Interface (Agilent) verwendet.

4.3.4 Empfindlichkeit CE-MS

Generell ist die Detektion der Laser-induzierten Fluoreszenz eine der sensitivsten bioanalytischen Nachweisverfahren [132, 133]. Die in dieser Arbeit für die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer erzielten Nachweisgrenzen waren weniger empfindlich als bei CE-LIF. Dies ist zum einen auf konstruktive Gründe zurück zu führen. So musste für die CE-MS-Kopplung die Kapillare auf 75 cm etwa verdoppelt werden und konnte auf den hinteren 20 cm nicht mehr auf 20°C temperiert werden. Insbesondere auf den letzten fünf bis sieben cm im ESI-Sprayer des Interfaces war die Kapillare auch Temperaturen von 50°C bis 60°C ausgesetzt. Dies führte zu einer Verbreiterung der Peaks verbunden mit der Abnahme der Peakhöhe und einem Verlust an Sensitivität. Ein Sheathless-Interface stand nicht zur Verfügung.

Desweiteren konnte für einige CF-Pt-Komplexe im ESI-Prozess ein Zerfall beobachtet werden. Mit CE-LIF konnte eine einzige Spezies detektiert werden. Bei der massenspektrometrische Detektion verteilte sich diese auf mehrere Spezies, die dann einzeln detektiert wurden. Darüber hinaus erfolgte die massenspektrometrische Detektion zum Teil als Addukte aus Analyten mit Bestandteilen des BGE oder des Sheath-Liquids. Exemplarisch ist diese Problematik für den Nachweis von CF-Pt-Komplexen in Phosphatpuffer ohne Chlorid in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Essigsäure

(5 mM) stammt aus dem Sheath-Liquid und die Bildung der Addukte erfolgte in der ESI-Quelle.

Tabelle 4.2: Übersicht von Pt-Komplexen mit Mobilitäten und m/z nach Inkubation von CF-Pt-Cl₂ in Natriumphosphatpuffer ohne Zusatz von Chlorid.

Nr.	$10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ μ_{eff}	Komplex	detektiert als	ESI +		ESI -	
				m/z	Q	m/z	Q
1	-1,63	CF-Pt-(H ₂ O) ₂	CF-Pt-CH ₃ COO	351,1	+2	699,0	-1
			CF-Pt-CH ₃ COO/H ₂ O	719,1	+1	717,1	-1
			CF-Pt			639,1	-1
2	-2,46	CF-Pt-H ₂ PO ₄ /H ₂ O	CF-Pt-H ₂ PO ₄ /H ₂ O	757,1	+1	755,1	-1
			CF-Pt-H ₂ PO ₄	739,1	+1	737,1	-1
3	-2,96	(CF-Pt) ₂ -H ₂ PO ₄ /OH	(CF-Pt) ₂ -H ₂ PO ₄ /OH			697,2	-2
			CF-Pt-H ₂ PO ₄			737,1	-1
4	-3,54	CF-Pt-(H ₂ PO ₄) ₂	CF-Pt-(H ₂ PO ₄) ₂			417,1	-2

Durch die Verringerung der Leitfähigkeit des Lysepuffers und damit der Probe, konnte die Fokussierung (Stacking) der Analyten (siehe Kapitel 4.6.2) beim Beginn der kapillarelektrophoretischen Trennung deutlich verbessert werden. Dies ermöglichte auch ein höheres Injektionsvolumen von ca. 18 nl (entspricht 1,2 % des Gesamtvolumens der Kapillare) für die CE-MS-Methode.

Tatsächlich lagen die Nachweisgrenzen, nach Optimierung der einzelnen Parameter für Sheath-Liquid, Massenspektrometer und kapillarelektrophoretischer Trennung, im unteren mikromolaren Bereich. Dies entspricht, bei einem Injektionsvolumen von 18 nl, einer absoluten Stoffmenge von einigen Femtomol und stellt damit ein gutes Ergebnis für die CE-MS bei der Verwendung des genutzten Interfacetyps dar [131, 134].

4.4 Synthese und Reinheit des CFDA-Platins

Für die geplanten Zellkulturversuche und weitere Vorversuche war es wichtig, dass das CFDA-Pt-Cl₂ eine hohe Reinheit, insbesondere bezüglich der fluoreszierenden Komponenten, aufweist. Erste Analysen des CFDA-Pt-Cl₂ (nominelle Konzentration: 50 nmol/l, chemische Deacetylierung in TBS) mittels CE-LIF zeigten, neben einer hohen Empfindlichkeit, drei statt der erwarteten einen fluoreszierenden Verbindung (Abbildung 4.17).

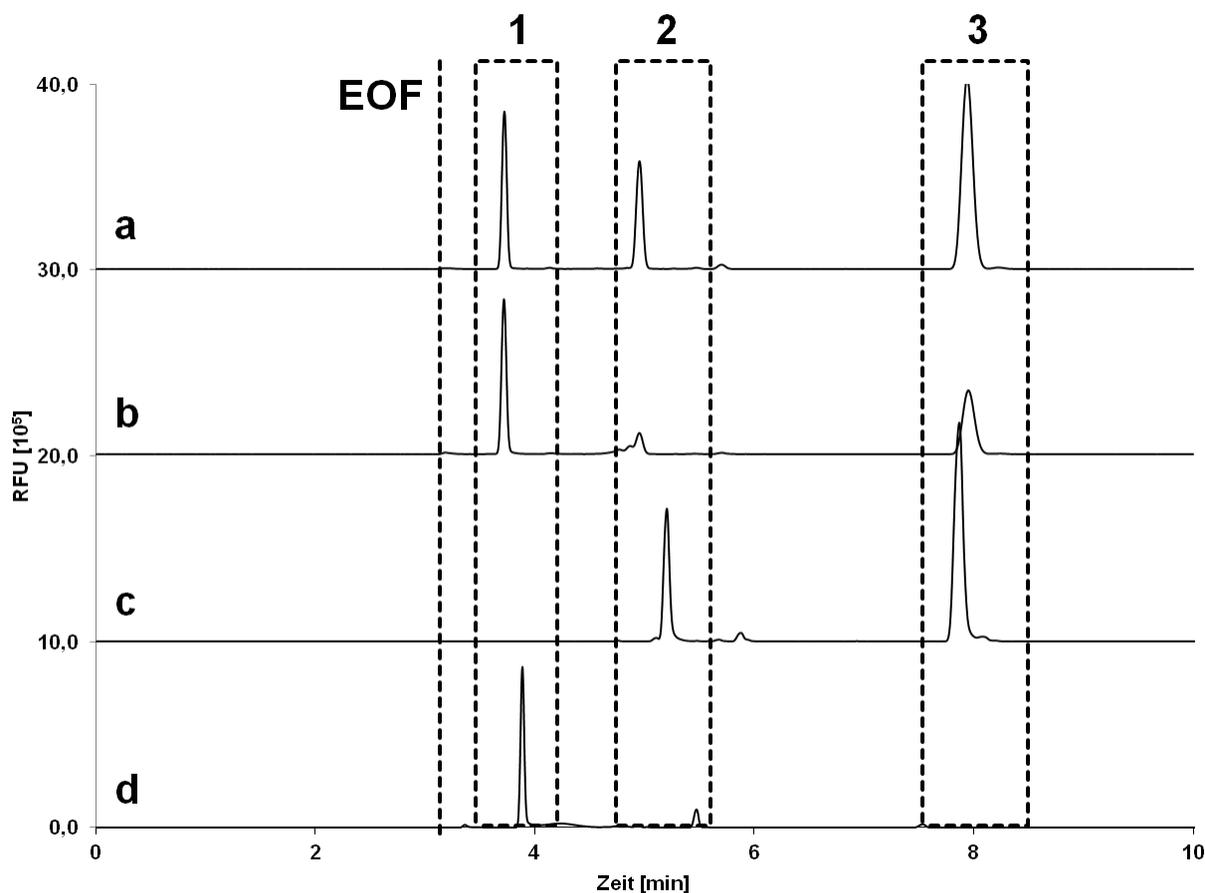


Abbildung 4.17: Elektropherogramme nach Inkubation in TBS über Nacht bei 37°C von: a) CFDA-Pt-Cl₂, synthetisiert nach Molenaar et al. [75]; b) CFDA-Pt-Cl₂, synthetisiert mit einem Überschuss an Platin-Vorstufe; c) CFDA-NHS und d) aufgereinigtes CFDA-Pt-Cl₂. Identifiziert wurden folgende Verbindungen: 1) CF-Pt-TRIS, 2) CF-TRIS und 3) CF-COO.

Dies warf Fragen bezüglich der Reinheit und der Stabilität des CFDA-Pt-Cl₂ auf. Es musste geklärt werden, ob die Synthese nicht zu einer, sondern zu mehreren fluoreszierenden Verbindungen führt, oder ob sich erst während der Aufarbeitung bzw. Trennung aus dem CFDA-Pt-Cl₂ weitere fluoreszierenden Spezies bilden. Der Vergleich mit dem analog deacetylierten CFDA-NHS-Ester machte deutlich, dass die letzten beiden Verbindungen (Minute 5 und 8) auf den CFDA-NHS-Ester zurückzuführen sind und es sich bei der ersten Verbindung (Minute 3,7) entsprechend um die platinhaltige Verbindung handelt (Abbildung 4.17). Mittels CE-MS konnten die m/z und daraus die Strukturen aller drei Verbindungen ermittelt werden. Bei der ersten Verbindung (Minute 3,5; m/z: 760,2) handelt es sich um einen 1:1 Komplex von CF-Pt mit TRIS (Abbildung 4.18).

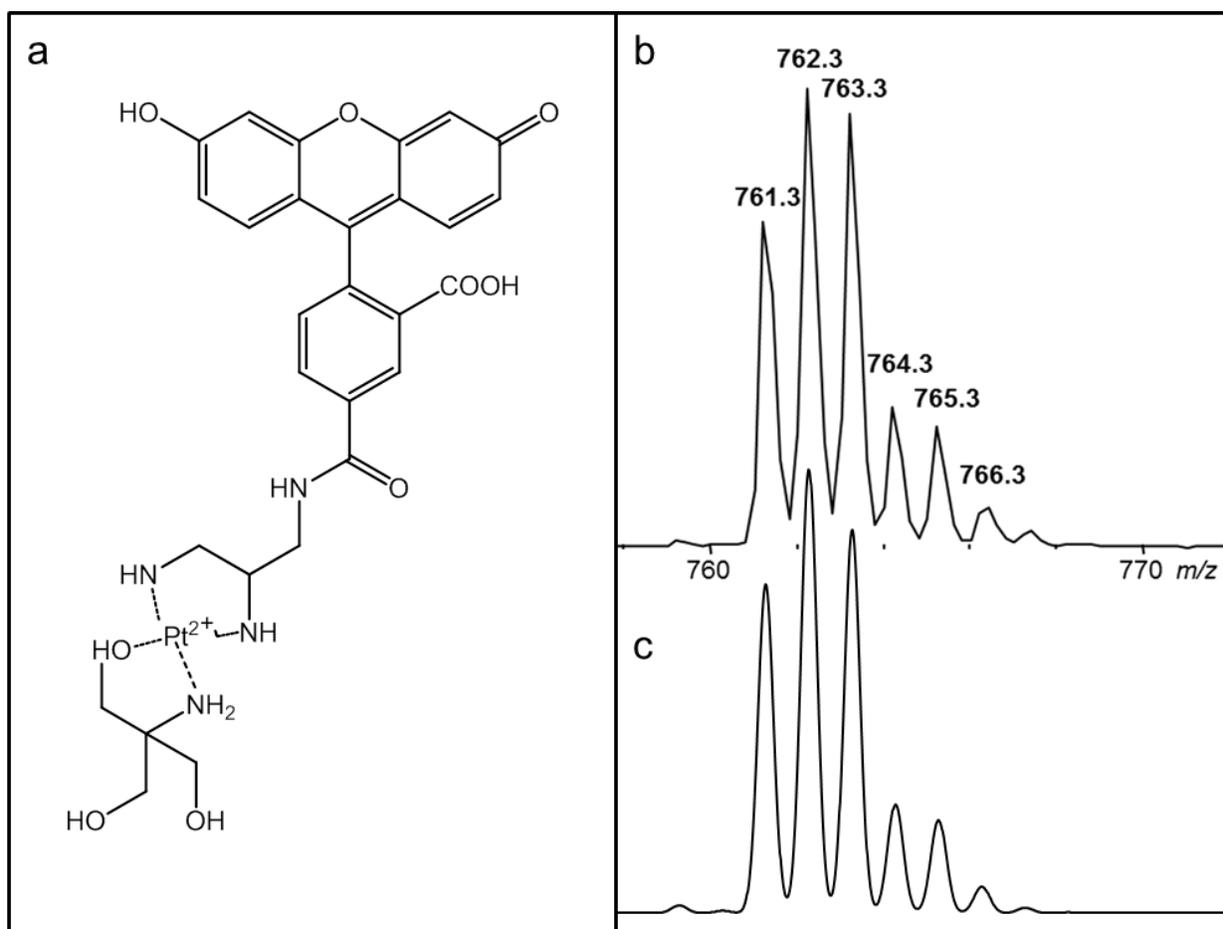


Abbildung 4.18: Struktur (a) und Massenspektrum von CF-Pt-TRIS ((b) gemessen und (c) simuliert)

Bereits aus dem Isotopenmuster ließ sich erkennen, dass diese Verbindung Platin aber keine Chloro-Liganden mehr enthält. Verbindung 2 (Minute 5; m/z: 478,1) ist das Reaktionsprodukt des CFDA-NHS mit dem primären Amin eines TRIS-Moleküls (CF-TRIS) und Verbindung 3 (Minute 8; m/z 375,1) ist der hydrolysierte CFDA-NHS, das Reaktionsprodukt des CFDA-NHS mit Wasser (CF-COOH). Dies erklärt auch das elektrophoretische Verhalten der drei Verbindungen.

Der Fluoresceinrest trägt bei pH 7,4 zwei negative Ladungen. Für den CF-Pt-Komplex mit TRIS ergibt sich durch die beiden positiven Ladungen am Platin eine Gesamtladung von Null. Die Komplexierung des TRIS-Moleküls vollzieht sich über das freie Elektronenpaar des Stickstoffs bzw. des Sauerstoffs. Bei CF-TRIS fehlen die beiden positiven Ladungen des Platins, jedoch könnte das Stickstoffatom als sekundäres Amin protoniert sein und die Gesamtladung somit einfach negativ sein. CF-COOH ist durch die zweite Säuregruppe dreifach negativ geladen. Am schnellsten migriert somit der Platinkomplex mit TRIS und findet sich nahe dem EOF, gefolgt vom CF-TRIS und CF-COOH.

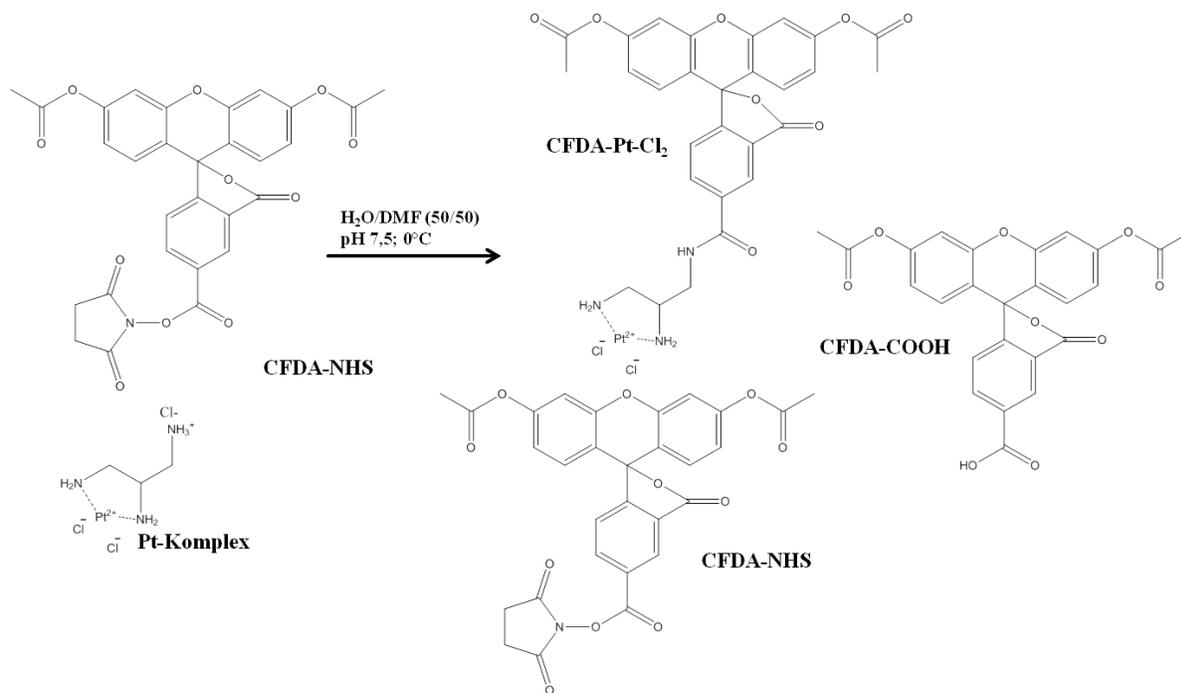


Abbildung 4.19: Reaktionsschema der Synthese von CFDA-Pt-Cl₂ nach Molenaar et al. [75]

Die Synthese liefert neben dem gewünschten Produkt also auch zwei weitere fluoreszierende Nebenprodukte: CF-NHS (nicht reagiert während der Synthese) und das entsprechend bereits daraus hydrolysierte CF-COOH (Abbildung 4.19). Um die Bedeutung der gefundenen Verunreinigungen, insbesondere in Hinblick auf die geplanten Zellkulturversuche, beurteilen zu können, erfolgte in einem nächsten Schritt eine quantitative Bestimmung dieser beiden Verunreinigungen. Hierzu wurde das Syntheseprodukt in Ammoniumcarbonat (pH 8,9; 37°C; über Nacht) inkubiert. In ammoniumhaltigem Puffer reagiert der NHS-Ester fast vollständig mit dem Ammonium-Ion zum entsprechenden Amin. Der Anteil der Hydrolyse zum CF-COOH ist dabei vernachlässigbar klein. Somit kann auch unterschieden werden, ob der Anteil an CF-COOH im Syntheseprodukt während der Synthese oder der Deacetylierung entstanden ist.

Die Quantifizierung von CF-NH₂ und CF-COOH mittels CE-LIF erfolgte über selbst hergestellte Standards. Hierfür wurde der CFDA-NHS-Ester entsprechend in Natrium- und Ammoniumcarbonat (pH 8,9; 37°C; über Nacht) inkubiert. Als Ergebnis fanden sich im Syntheseprodukt bei einer nominellen Konzentration von 50 mM CFDA-Pt-Cl₂ 12 mM CFDA-NHS und 7 mM CFDA-COOH. Dementsprechend konnte die Konzentration von CFDA-Pt-Cl₂ nicht mehr als 39 mM betragen. Durch diese quantitative Bestimmung (nichtfluoreszierende Nebenprodukte blieben unbeachtet) konnte gezeigt werden, dass trotz mehrfachen Waschens das Syntheseprodukt einen nicht zu unterschätzenden Anteil an fluoreszierenden Nebenprodukten enthält. Insbesondere der hohe Anteil an nicht reagiertem CFDA-NHS ist problematisch. Intrazellulär kann dieser mit Aminen reagieren. Die anschließend detektierte Fluoreszenz wäre dann aber nicht auf eine entsprechende Platinbindung zurückzuführen und würde zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Molenaar et al. berichten nichts über eine Aufreinigung des CFDA-Pt-Cl₂ nach der Reaktion [75].

Entsprechend dieser Ergebnisse wurde die Synthese angepasst. Statt eines Verhältnisses Platinvorstufe zu CFDA-NHS von 1:1 wurde nun die Platinvorstufe im

Überschuss eingesetzt. Dies führte zwar zu einer deutlichen Reduktion der fluoreszierenden Nebenprodukte (Abbildung 4.17 Spur b) aber erst durch die Aufreinigung mittels präparativer HPLC konnte ein überwiegend reines CFDA-Pt-Cl₂ gewonnen werden (Abbildung 4.17 Spur d). Durch diese präparative Reinigung konnten auch nicht-fluoreszierende Platinverbindungen und Vorstufen abgetrennt werden und falsch-negative Ergebnisse, also z.B. Blockierung von Bindungsstellen durch nicht-fluoreszierende Platin-Verbindungen, verhindert werden. Das aus der Aufreinigung hervorgegangene CFDA-Pt-Cl₂ hat eine Reinheit von 95 % und war damit für weitere Untersuchungen geeignet. Die weiteren Arbeiten erfolgten weitestgehend mit dem aufgereinigten CFDA-Pt-Cl₂. Sowohl die vollständige Synthese als auch die folgende Aufreinigung des CFDA-Pt-Cl₂ erfolgte durch den Kooperationspartner (Arbeitsgruppe Prof. Jaehde) an der Universität Bonn.

4.5 Reaktionsverhalten von CFDA-Pt-Cl₂ mit organischen Liganden

Die Reaktion und Komplexbildung von Cisplatin mit kleineren organischen Molekülen wie Nukleinbasen [121, 135, 136], Aminosäuren oder kleineren Peptiden [137, 138, 139] sind in Modelversuchen gut untersucht. Von besonderem Interesse waren, aufgrund der hohen Affinität des Platins zum Schwefel, die Reaktionen mit schwefelhaltigen Aminosäuren bzw. Methionin- und Cystein-haltigen Peptiden [36, 37, 140, 141]. Insbesondere die Reaktion mit Glutathion gilt als wichtige intrazelluläre Inaktivierung (Detoxifizierung) von Cisplatin [29, 142, 143].

Der Ligandenaustausch am Cisplatin erfolgt fast ausschließlich als nukleophile Substitution nach einem S_N2-Mechanismus (Abbildung 4.20) [59]. Der eintretende Ligand X nähert sich dem Platin senkrecht zur Koordinationsebene. Es kommt zur Bildung eines trigonal-bipyramidalen Übergangszustandes, in dem der ein- und austretende Ligand in einer Ebene angeordnet sind. Die Reorganisation zum quadratisch-planaren Komplex erfolgt über die Freisetzung des austretenden Liganden

(Abgangsgruppe). Die Geschwindigkeit der Substitution ist abhängig von den nukleophilen Eigenschaften des eintretenden Liganden. Zunehmende Weichheit (d.h. geringe Ladungsdichte und gute Polarisierbarkeit) des eintretenden Liganden erleichtern den Ligandenaustausch. Die Abgangsgruppe ergibt sich aus sterischen Bedingungen und dem trans-Effekt. Als trans-Effekt wird der Einfluss eines nicht reagierenden Liganden, auf die Substitutionsgeschwindigkeit des *trans* zu ihm stehenden Liganden bezeichnet [49, 59, 144]. Der trans-Effekt und damit die Substitutionsgeschwindigkeit nehmen in folgender Reihenfolge zu:

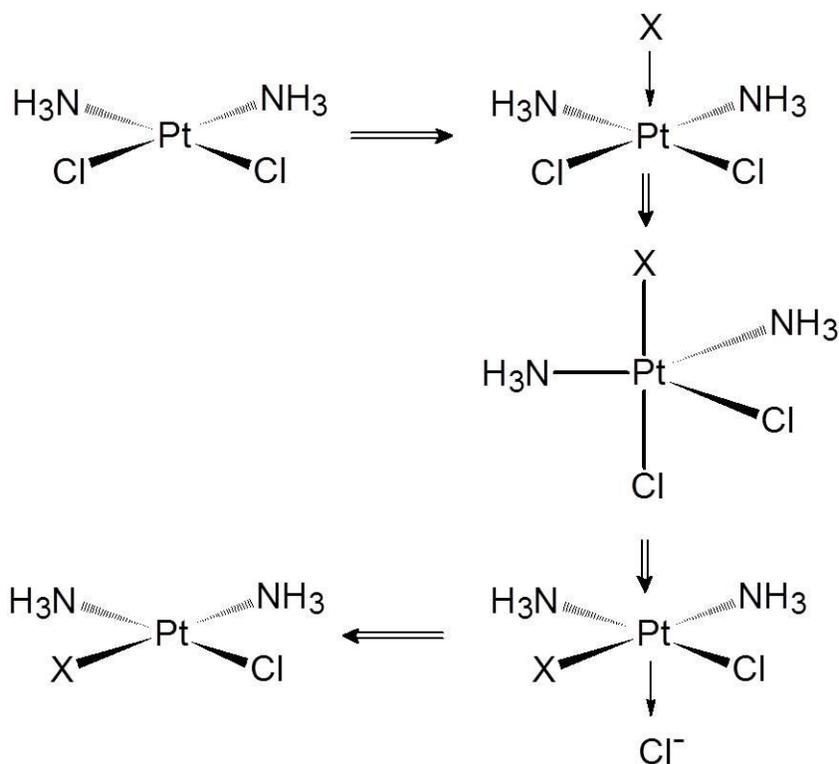
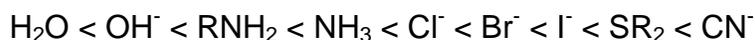


Abbildung 4.20: Ligandenaustausch beim Cisplatin: Mechanismus der nukleophilen Substitution ($\text{S}_{\text{N}}2$) am quadratisch-planaren Platinkomplex

4.5.1 CFDA-Pt-Cl₂

Um zu zeigen, dass CFDA-Pt-Cl₂ hinsichtlich der Komplexbildung ein gutes Analogon für Cisplatin ist, wurde es mit kleineren organischen Molekülen und potentiellen Liganden inkubiert. Als wichtige (potentielle) Liganden wurden insbesondere Glutathion und die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein, Methionin und Acetylcystein ausgewählt. Komplexe dieser Liganden mit Cisplatin sind vielfältig untersucht worden [142, 143, 145, 146]. Um auch die Komplexbildung mit sauerstoff- und stickstoffhaltigen Liganden zu untersuchen, wurden nicht-schwefelhaltige Aminosäure wie z.B. Glycin, Glutamin, Histidin und Arginin verwendet.

Das Ziel dieser Versuche war es zum einen zu zeigen, dass CF-Pt in der Lage ist mit diesen Liganden Komplexe zu bilden und zum anderen Informationen über deren elektrophoretisches Verhalten (z.B. effektive Mobilitäten) bzw. deren Stabilität (während der Trennung) zu erhalten. Weiterhin sollten Reaktivitätsunterschiede bezüglich der Liganden untersucht und mögliche Aussagen zu generellen Reaktionswegen aufgezeigt werden. Die Versuche erfolgten in Phosphatpuffer ohne Zugabe von Chlorid bei 37°C. Das molekulare Verhältnis von CFDA-Pt zum jeweiligen Liganden betrug, wenn nicht gesondert erwähnt, 1:20 (50 µM : 1 mM).

Aus Abbildung 4.21 zeigt sich, dass die Inkubation von CFDA-Pt-Cl₂ mit verschiedenen stickstoff- und sauerstoffhaltigen Aminosäuren unter den genannten Bedingungen zu entsprechenden Komplexen führt. Es wurden ausschließlich 1:1 Komplexe nachgewiesen. Zusätzlich zu diesen Komplexen, waren aber auch die Kapitel 4.2.1 beschriebenen Phosphataddukte zu detektieren (1). Unter anderem konnten Komplexe von CF-Pt mit Glycin, Glutamin, Histidin und Arginin nachgewiesen werden. Die Mobilitäten der gefundenen Komplexe waren zum Teil sehr ähnlich. Zusätzliche funktionelle Gruppen in den Liganden, führten aber zu Verschiebungen der Mobilitäten, z.B.: CF-Pt-Glutamin ($-1,03 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und CF-Pt-Glutaminsäure ($-2,00 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

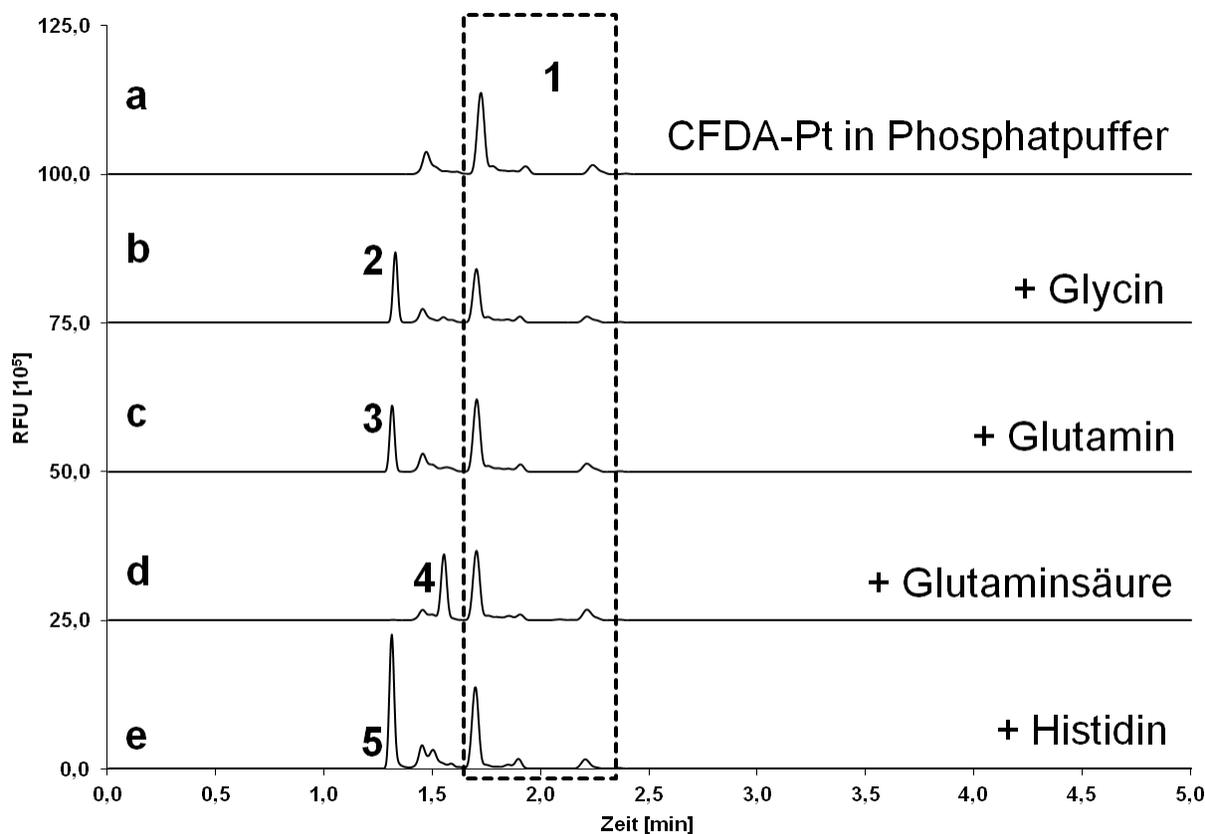


Abbildung 4.21: Elektropherogramme (CE-LIF) von CFDA-Pt nach Inkubation in Phosphatpuffer ohne Chlorid (a) bzw. mit Glycin (b), Glutamin (c), Glutaminsäure (d) und Histidin (e). (1) Phosphataddukte (siehe Abbildung 4.3), (2) CF-Pt-Gly, (3) CF-Pt-Gln, (4) CF-Pt-Glu, (5) CF-Pt-His

Die Reaktion von CFDA-Pt-Cl₂ mit schwefelhaltigen Aminosäuren (Abbildung 4.22) war im Vergleich zu der Reaktion mit stickstoff- und sauerstoffhaltigen Aminosäuren komplexer und insbesondere abhängig von der Oxidationsstufe des Schwefelatoms. Die Reaktion von CF-Pt-Cl₂ mit der freien Thiolgruppe des Cystein führte zu einem 1:1 Komplex mit Cystein (m/z: 762,2). Zusätzlich konnte eine weitere fluoreszierende Verbindung detektiert werden und als Fluoreszenzrest mit den beiden Aminogruppen (m/z: 448,2) (Abbildung 4.22, Peak 2), über die das Platin komplexiert wird, identifiziert werden. Die Reaktion mit der Thiolgruppe führt nicht nur zur Abspaltung der beiden Chloroliganden sondern auch teilweise zur Abspaltung des Fluoreszenzrestes, der über zwei Aminogruppen an das Platin gebunden ist. Nach zwölf Stunden Inkubation bei

37°C lag das Verhältnis von Fluoreszenzrest zu CF-Pt-Cystein bei 1:2 und verringerte sich bei weiterer Inkubation über sieben Stunden auf 1:1,5.

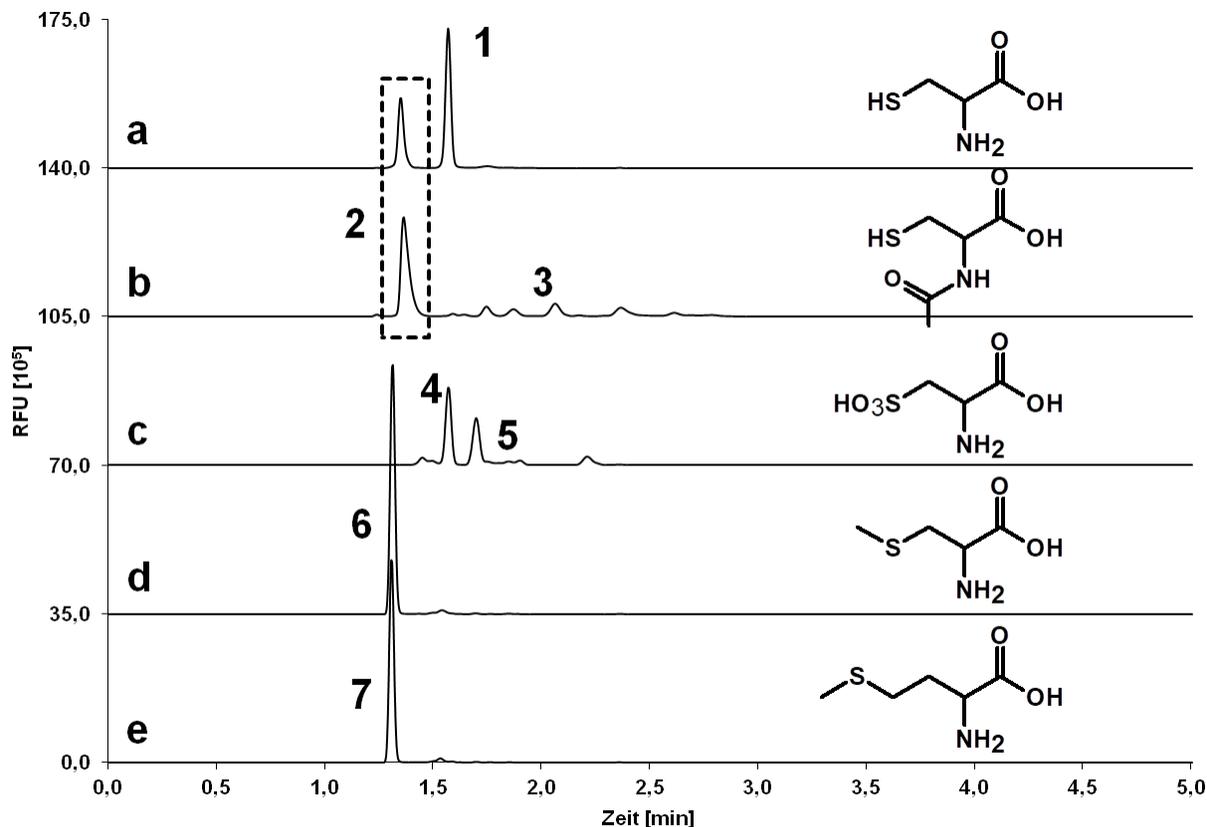


Abbildung 4.22: Elektropherogramme (CE-LIF) von CFDA-Pt nach Inkubation in Phosphatpuffer ohne Chlorid mit Cystein (a), N-Acetylcystein (b), Cysteinsäure (c), S-Methylcystein (d) und Methionin (e). (1) CF-Pt-Cystein, (2) Fluoreszenzrest ohne Platin, (3) Reaktionsprodukte mit N-Acetylcystein, (4) CF-Pt-Cysteinsäure, (5) Phosphataddukte (siehe Abbildung 4.3), (6) CF-Pt-S-Methylcystein, (7) CF-Pt-Methionin

Bei der Reaktion von CF-Pt-Cl₂ mit N-Acetylcystein dagegen ist eine annähernd vollständige Abspaltung des Fluoreszenzrestes zu beobachten. Die zusätzliche Acetylgruppe erhöht die Reaktivität gegenüber CF-Pt-Cl₂ deutlich. Trotzdem wurden aber auch ein fluoreszierender Platinkomplex mit Acetylcystein (m/z: 804,1) und das entsprechende Dimer (m/z: 1607,1) nachgewiesen. Wird die Thiolgruppe dagegen vollständig zur Sulfonsäure oxidiert, nimmt die Reaktivität stark ab. Neben einem

1:1 Komplex mit Cysteinsäure (m/z : 810,2) finden sich auch wieder Phosphataddukte. Der Thioether bildet dagegen vollständig einen 1:1-Komplex mit CF-Pt: CF-Pt-Methionin (m/z : 790,2) und CF-Pt-S-Methylcystein (m/z : 776,2). Ein Abgang des Fluoreszenzrestes ist für beide Liganden nicht zu beobachten.

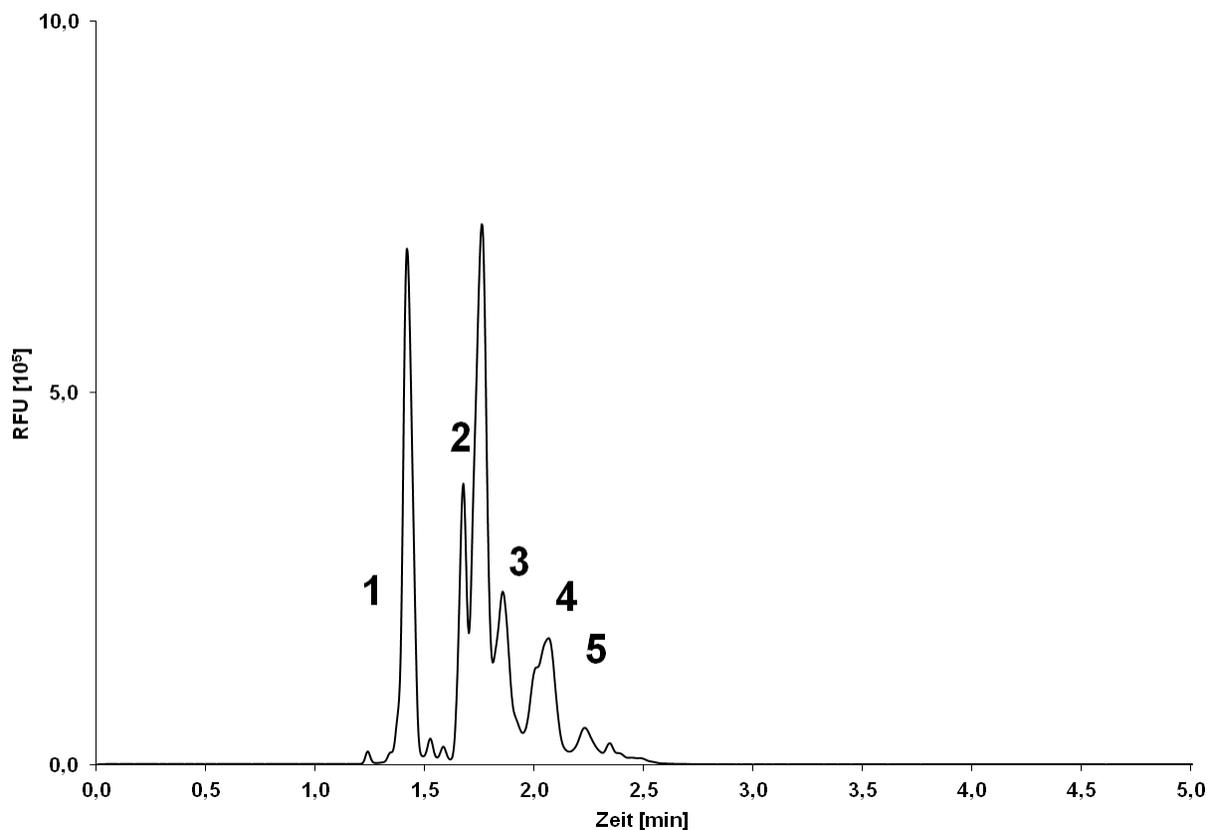


Abbildung 4.23: Elektropherogramme (CE-LIF) von CFDA-Pt nach Inkubation in Phosphatpuffer ohne Chlorid mit Glutathion. (1) Fluoreszenzrest ohne Platin, (2) CF-Pt-GSH, (3) (CF-Pt)₂-GSH, (4) (CF-Pt-GSH)₂ und CF-Pt-GSSG-H₂O (5) CF-Pt-GSSG-Pt-GSH

Das Ergebnis der biologisch relevanten Reaktion von CF-Pt-Cl₂ mit Glutathion ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Neben einem 1:1-Komplex (Peak 2; m/z : 948,2) findet sich auch ein entsprechendes Dimer (Peak 4; m/z : 1895,3). Weiterhin finden sich auch Addukte mit oxidiertem Glutathion (GSSG) (Peak 4 und 5). Wie bei Cystein und Acetylcystein führt auch die Reaktion mit Glutathion teilweise zum Abgang des Fluoreszenzrestes (Peak 1).

4.5.2 CFDA-Oxaliplatin

CFDA-Oxaliplatin (CFDA-OxPt) (Abbildung 4.24) ist ein weiteres fluoreszierendes platinhaltiges Analogon, dessen Grundlage das Oxaliplatin bildet. Das, wie im Cisplatin 2-fach positiv geladene Platinion, ist hierbei von einem Oxalation und einem 1,2-Diaminocyclohexan-Liganden, an dem auch der Fluoreszenzrest hängt, komplexiert. Die vollständige Synthese (Arbeitsgruppe Prof. Jaehde an der Universität Bonn) konnte erst gegen Ende der Arbeit beendet werden, sodass nur einige wenige Versuche bezüglich des Reaktionsverhaltens durchgeführt werden konnten. Unterschiede zum CFDA-Pt-Cl₂ waren insbesondere durch die unterschiedlichen Abgangsgruppen zu erwarten. Der Fluoreszenzrest muss, analog zum CFDA-Pt-Cl₂, durch Deacetylierung in die fluoreszierende Form überführt werden.

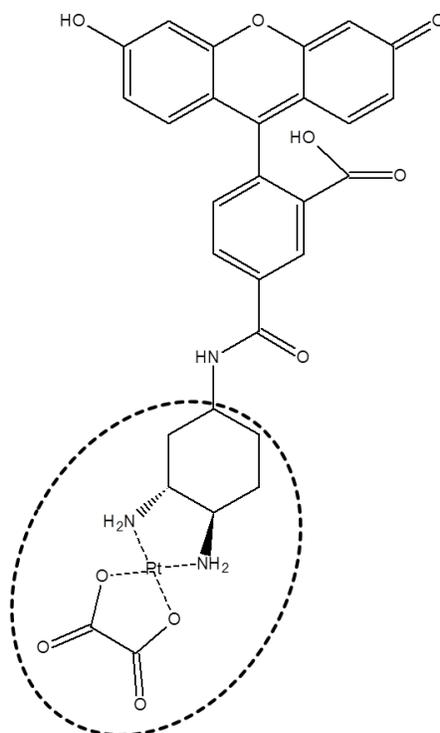


Abbildung 4.24: Chemische Struktur von CF-OxPt (die markierte Struktur entspricht dem Oxaliplatin)

Grundsätzlich zeigt CF-OxPt ein ähnliches Verhalten gegenüber den getesteten Liganden wie CF-Pt-Cl₂. Es wurden unter anderem Komplexe mit Cystein, Glutathion und Histidin gefunden. Die Mobilitäten der nachgewiesenen Komplexe waren vergleichbar mit den Mobilitäten der entsprechenden Komplexe mit CF-Pt-Cl₂ (siehe Tabelle 4.3). Unterschiede zeigten sich im Hinblick auf die Reaktion mit Phosphat. Es konnten keine Phosphataddukte detektiert werden. Sonstige Hydrolyseprodukte konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Selbst nach zehn Stunden Inkubation mit Histidin in Phosphatpuffer war die Ausgangsverbindung CF-OxPt-Oxalat noch deutlich nachweisbar (siehe Abbildung 4.25 Spur b Peak 4).

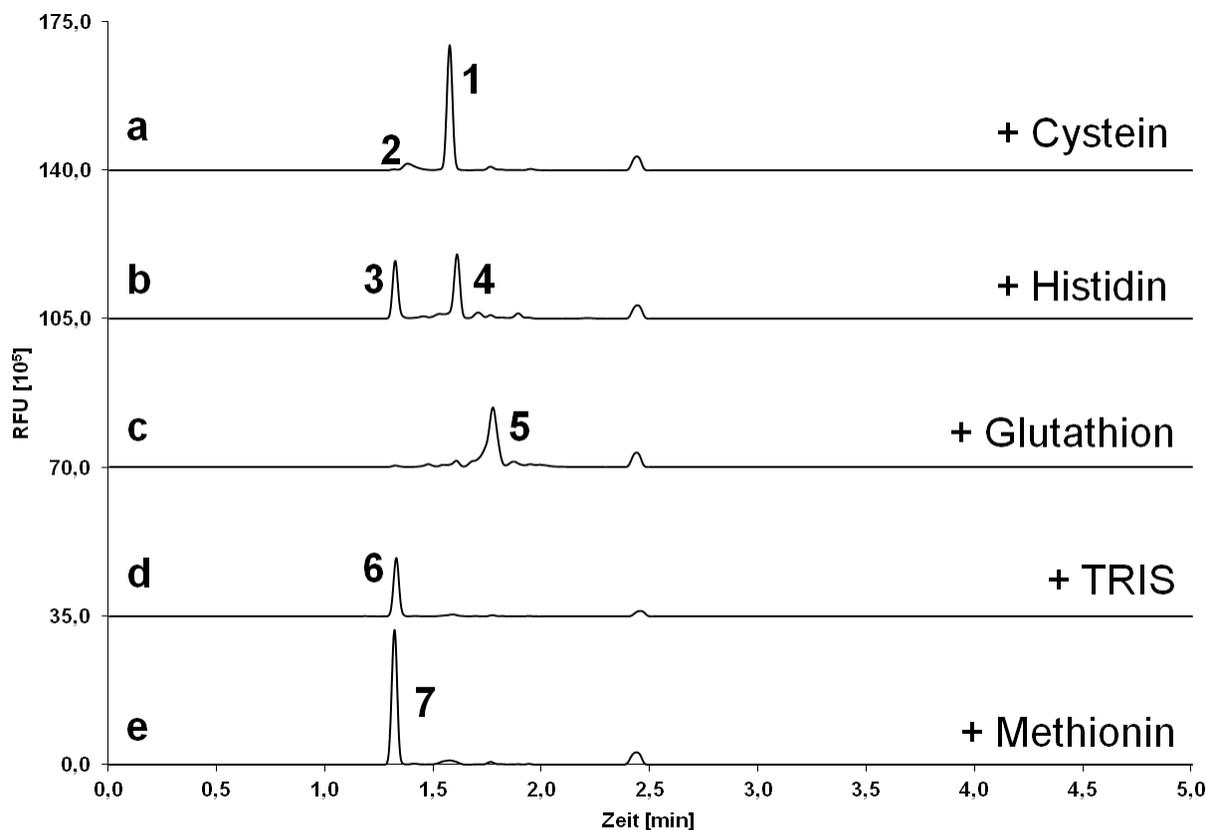


Abbildung 4.25: Elektropherogramme (CE-LIF) von CFDA-OxPt nach Inkubation in Phosphatpuffer mit Cystein (a), Histidin (b), Glutathion (c), TRIS (d) und Methionin (e). (1) CF-OxPt-Cystein, (2) Fluoreszenzrest ohne Platin, (3) CF-OxPt-Histidin (4) CF-OxPt-Oxalat, (5) CF-OxPt-Glutathion (6) CF-OxPt-TRIS, (7) CF-OxPt-Methionin

Ein weiterer Unterschied konnte bezüglich der Reaktivität gegenüber der Thiolgruppe gefunden werden. Zwar führt die Reaktion mit Cystein bei beiden Platinkomplexen zur Bildung eines 1:1-Komplexes mit Cystein bzw. auch zum Abgang des Fluoreszenzrestes. Jedoch bildet sich im Falle von CF-OxPt deutlich weniger der fluoreszierenden Verbindung ohne Platin als bei der Reaktion von CF-Pt-Cl₂ mit Cystein (Abbildung 4.25 Spur a). Dies gilt auch für die Reaktion mit Glutathion (Abbildung 4.25 Spur c). Hier ist weiterhin die Bildung nur eines Platinkomplexes (CF-OxPt-Glutathion, m/z: 988,2) zu beobachten.

Abschließend lässt sich die eingangs gestellte Vermutung bestätigen: CFDA-Pt-Cl₂ kann, wie auch Cisplatin, Komplexverbindungen eingehen. Darunter sind Addukte mit Pufferbestandteilen als auch Komplexe mit relevanten biologischen Molekülen. Komplexe von CF-Pt mit Glutathion konnten, wie die für Cisplatin beschriebenen [32, 143, 147, 148], ebenfalls nachgewiesen werden.

Die gefundenen Komplexe von CF-Pt mit den untersuchten Liganden ließen sich mittels Kapillarzonenlektrophorese voneinander trennen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifizieren. Hierbei zeigte sich auch, dass labile Komplexe während der Ionisierung in der Quelle zerfallen können, was zum einen die eindeutige Bestimmung erschweren kann und zum anderen sich gleichzeitig negativ auf die Nachweisgrenze auswirkt.

Prinzipiell war für beide Platinverbindungen eine Adduktbildung mit allen inkubierten Verbindungen festzustellen. Einen Überblick über nachgewiesene Platinkomplexe gibt Tabelle 4.2. Auch in der Gegenwart von organischen Liganden und der Komplexbildung über Sauerstoff oder Stickstoff ist eine Adduktbildung mit Pufferbestandteilen (Phosphat) möglich. Die mögliche Bildung solcher Artefakte sollte also stets berücksichtigt werden. Bei der Komplexbildung über Schwefel wurden keine Phosphataddukte nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass schwefelhaltigen Liganden auch direkt mit dem Dichlorokomplex reagieren können und dass sauerstoff-

bzw. stickstoffhaltige Liganden erst mit den Hydrolyseprodukten des Dichlorokomplex reagieren.

Auch der in der Literatur beschriebene Unterschied bezüglich der Reaktivität von Cisplatin und Oxaliplatin konnten an den beiden fluoreszierenden Analoga nachgewiesen werden und lässt sich auf das durch den Chelat-Effekt stabilisierte Oxalat als Abgangsgruppe zurückführen. CF-OxPt erwies sich, wie Oxaliplatin, als weniger reaktiv [10, 149].

Wie für Cisplatin konnte auch für CF-Pt-Cl₂ eine bevorzugte Bindung an das weiche Nukleophil Schwefel beobachtet werden [59, 142]. Die Reaktion mit dem Thioether (Methionin, S-Methylcystein) führte trotz eines hohen Trans-Effektes jedoch nicht, wie zum Teil für Cisplatin berichtet [36, 37], zum Verlust des Fluoreszenzrestes.

Erklärt werden kann dieses Verhalten durch die unterschiedlichen Bindungsverhältnisse bezüglich der beiden Amino- bzw. Amminliganden im CF(DA)-Pt-Cl₂ bzw. im Cisplatin. Im Cisplatin können beide Amminliganden als eigenständige Liganden betrachtet werden. Im CF(DA)-Pt-Cl₂ sind die beiden Aminogruppen jedoch über die Fluoreszenzstruktur miteinander verbunden und reagieren damit als ein zweizähniger Ligand, der durch den Chelat-Effekt einen stabileren Komplex mit dem Platin bildet [59]. Dies hat den Vorteil, dass der Fluoreszenzrest im CF(DA)-Pt-Cl₂ stärker an das Platin gebunden ist und entstehende Komplexe somit über die Fluoreszenz detektiert werden können. Nachteilig ist, dass das Reaktionsverhalten von Cisplatin und CF(DA)-Pt-Cl₂ somit nicht ganz identisch ist. In Bezug auf den Fluoreszenzrest ist CFDA-Oxaliplatin ein besser geeignetes Analogon als CFDA-Pt-Cl₂, da im Oxaliplatin der 1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand ebenfalls einen zweizähniger Liganden darstellt.

Ein Verlust des Fluoreszenzrestes des CF-Pt-Cl₂ war jedoch teilweise bei der Reaktion mit der freien Thiolgruppe (Cystein, Glutathion, Acetylcystein) zu beobachten. Ein Abgang der Amminliganden bei der Reaktion mit Glutathion bzw. schwefelhaltigen

Liganden ist auch für Cisplatin beschrieben [32, 37, 38]. Im Fall von CF-Pt-Cl₂ führt der Abgang des Fluoreszenzrestes zum Verlust der Fluoreszenzstruktur und zur Detektion einer fluoreszierenden Spezies ohne Platin (μ_{eff} : $-1,26 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; m/z: 448,2). Die dadurch entstandenen Platinkomplexe können somit auch nicht mehr über ihre Fluoreszenz detektiert werden. Da Glutathion als wichtiger intrazellulärer Bindungspartner für Platinverbindungen beschrieben wird, ist dieses Ergebnis bei späteren *in-vitro*-Versuchen zu berücksichtigen und kann als Marker bzw. Indiz für die Reaktion mit der freien Thiolgruppe gesehen werden.

Tabelle 4.3: Übersicht von Komplexen von CF-Pt und CF-OxPt mit verschiedenen organischen Molekülen mit Mobilitäten und Massen

Komplex	m/z (ESI +)	Mobilität [$10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
CF-Pt-Glycin	716,3	-1,11
CF-Pt-Histidin	796,3	-1,00
CF-Pt-Arginin	815,2	-0,27
CF-Pt-Glutamin	787,3	-1,03
CF-Pt-Glutaminsäure	788,2	-2,00
CF-Pt-Cystein	762,2	-2,10
CF-Pt-Cysteinsäure	810,2	-2,05
CF-Pt-Methionin	790,2	-1,02
CF-Pt-Glutathion	948,2	-2,68
CF-Pt-Cl ₂	713,1	-2,36
CF-OxPt-Glutathion	988,3	-2,60
CF-OxPt-Cystein	802,2	-2,01
CF-OxPt-Histidin	836,2	-1,01
CF-OxPt-Methionin	890,4	-0,99
CF-OxPt-Oxalat	771,2	-2,11

4.6 Probenvorbereitung

4.6.1 Zellkultur

Die Zellen der Zelllinie A2780 und A2780cis wurden routinemäßig in RPMI-1640 bei 37°C unter 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde hierfür mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1,5 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin supplementiert. Da die Behandlung der Zellen mit CFDA-Pt-Cl₂ über das Zellkulturmedium erfolgen sollte, wurde das Verhalten von CFDA-Pt-Cl₂ im Zellkulturmedium untersucht. Im besonderen Blickpunkt stand die Stabilität des Dichlorokomplexes, der pharmakologisch aktiven Spezies und der Hydrolyse der Acetylgruppen, die einen Einfluss auf die Zellaufnahme und auf die Fluoreszenz haben. Trotz eines pH-Wertes von 7,4 findet im Zellkulturmedium die Deacetylierung der beiden Acetylgruppen statt. Dadurch erhält der Fluoreszenzrest zwei negative Ladungen, was einen negativen Einfluss auf die Aufnahme in die Zellen bedingt.

CFDA-Pt-Cl₂ wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen im Zellkulturmedium inkubiert und der zeitliche Verlauf mit CE-LIF und CE-MS beobachtet. Fluoreszierende CF-Pt-Spezies konnten mit CE-LIF detektiert und mit CE-MS identifiziert werden. Darüber hinaus konnten mit CE-MS auch nicht-fluoreszierende CF-Pt-Spezies bestimmt werden (Abbildung 4.25). CFDA-Pt-Cl₂ und die einfach deacetylierte Spezies (CFMA-Pt-Cl₂) sind nicht fluoreszierend.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass CFDA-Pt-Cl₂ wie erwartet schrittweise deacetyliert wird und die beiden Chloro-Liganden gegen Glutamin (m/z: 790,3; $\mu_{\text{eff}}: 1,02 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bzw. Methionin (m/z: 790,2; $\mu_{\text{eff}}: 1,03 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), beide Verbindungen finden sich im Medium, ausgetauscht werden (Abbildung 4.26). Diese beiden Komplexe besitzen eine sehr ähnliche Mobilität und erscheinen in der Fluoreszenzdetektion als ein Peak. Massenspektrometrisch können beide detektiert werden. Dies zeigt einen wesentlichen Vorteil der

massenspektrometrischen Detektion gegenüber der Fluoreszenzdetektion auf, da mit dieser auch co-migrierende Spezies erfasst und identifiziert werden können. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass noch weitere CF-Pt-Komplexe mit ähnlichen Mobilitäten existieren, die mit CE-MS aber nicht mehr nachweisbar sind.

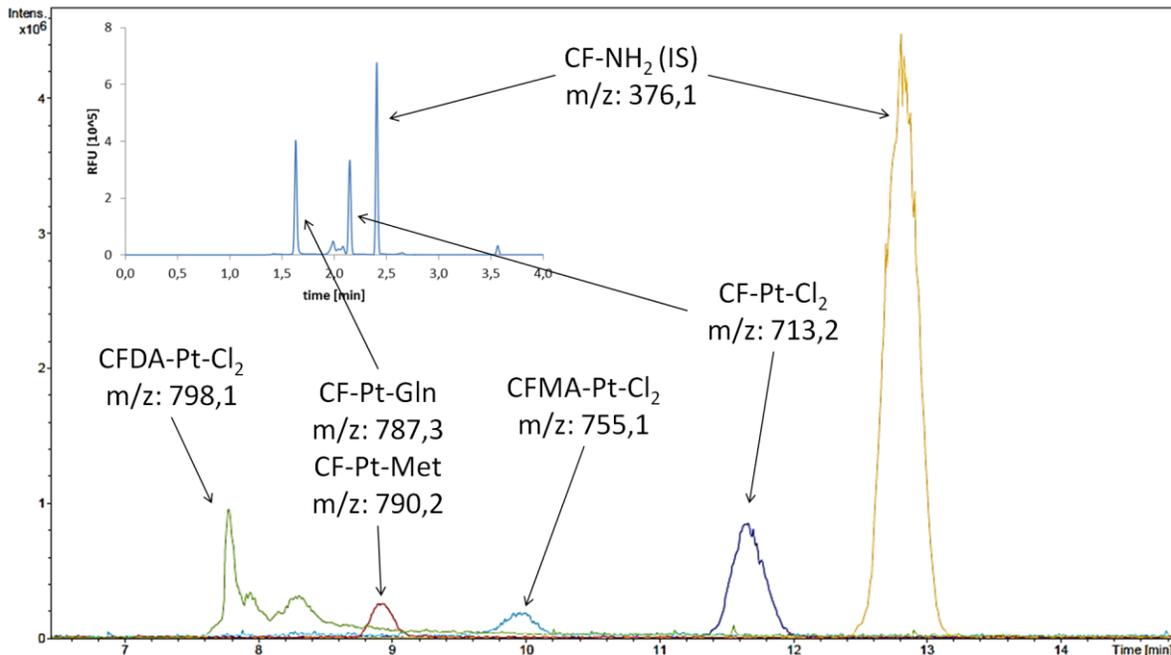


Abbildung 4.26: CE-LIF und CE-MS zur Untersuchung der Reaktion von CFDA-Pt-Cl₂ im Zellkulturmedium.

Weitere durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass die Deacetylierung erwartungsgemäß pH-abhängig ist. Bei pH 8,95 verläuft die Reaktion schneller als bei pH 7,40. Auch zeigte sich in diesen Experimenten, dass die beschriebene Supplementierung des Zellkulturmediums mit FKS sowohl die Deacetylierung als auch den Ligandenaustausch am Platin beeinflusst (Abbildung 4.27). Die Deacetylierungsrate wird durch die Supplementierung deutlich erhöht. Nach zwei Stunden fanden sich im supplementierten Medium 4,8-mal mehr CF-Pt-Cl₂ als im nicht-supplementierten. Hintergrund ist die Zugabe des FKS und darin enthaltener Esterasen. Die Deacetylierung erfolgt somit nicht nur chemisch sondern auch enzymatisch.

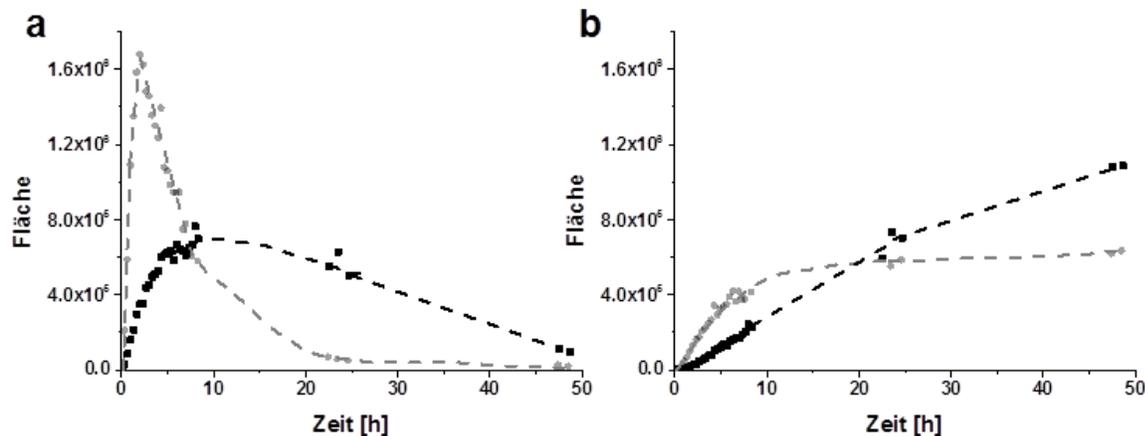


Abbildung 4.27: Stabilität von CFDA-Pt-Cl₂ im Zellkulturmedium: Kinetik der Deacetylierung (a) und dem Ligandenaustausch am Platin (b) in reinem RPMI-1640 (schwarz) und supplementiertem RPMI-1640 (grau).

Diese Ergebnisse bekräftigten die Entscheidung die zweistündiger Behandlung der Zellen in unsupplementiertem Zellkulturmedium durchzuführen. Das Wachstum der Zellen war hierdurch nicht beeinflusst. Auch konnte mit den durchgeführten Arbeiten gezeigt werden, dass für den vorgesehenen Behandlungszeitraum von zwei Stunden ausreichend CFDA-Pt-Cl₂ vorhanden ist und die Behandlung um ein bis zwei Stunden ausgedehnt werden könnte.

4.6.2 Zellyse

Nach der Zellkultur ist die Zellyse ein wichtiger Schritt während der Probenaufbereitung. Wichtig ist hierbei eine hohe Effizienz der Lyse ohne die Probe zu verfälschen. Für den Zellaufschluss existieren sowohl mechanische, physikalische als auch chemische Methoden. Klassische chemische Lysepuffer erwiesen sich für die zu untersuchenden Analyten als ungeeignet. Diese weisen zwar eine hohe Lyseeffektivität auf, enthalten aber auch für die Analytik von Platinspezies mittels kapillarelektrophoretischer Methoden problematische Bestandteile [150]. Dies können unter anderem Detergenzien, EDTA und TRIS als Pufferkomponenten sein. Versuche mit Detergenzien

wie Triton X-100, das die Zellmembran zerstören soll, zeigten einen negativen Effekt auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese. Sie verändern die Oberfläche der Silica-Kapillare und somit auch die gesamte Trennung inklusive des EOFs. TRIS hat, wie bereits beschrieben, eine relativ hohe Affinität zum Platin. Insbesondere bezüglich des Dichlorokomplexes ist ein Ligandenaustausch bei der Reaktion gezeigt worden (s. Kapitel 4.1.1). Dies gilt natürlich im gleichen Maße für EDTA. Aufgrund des Chelat-Effektes ist auch für EDTA die Bildung stabiler Komplexe mit Platin möglich. Aufgrund der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Eigenschaften, wie geringe Affinität des Phosphats zum Platin und die gute Pufferkapazität bei pH 7,4, fiel die Wahl auf Phosphat als Grundlage für den Lysepuffer.

Die eigentliche Lyse mit dem Aufbrechen der Zellmembran erfolgte durch Ultraschall auf Eis. Bei ersten Versuchen mit PBS als Lysepuffer zeigte sich, dass insbesondere die Chloridkonzentration (140 mM) zu einer hohen Leitfähigkeit der Probe führte und dies sich negativ auf die Trennleistung der Elektrophorese auswirkte. Gleichzeitig sollte aber auch nicht ganz auf den stabilisierenden Einfluss des Chlorids auf mögliche Chlorokomplexe verzichtet werden. Eine Reduktion der Chloridkonzentration auf 10 mM führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Trennleistung durch schmalere und symmetrischere Peaks bei vergleichbarer Lyseeffektivität. (Abbildung 4.28).

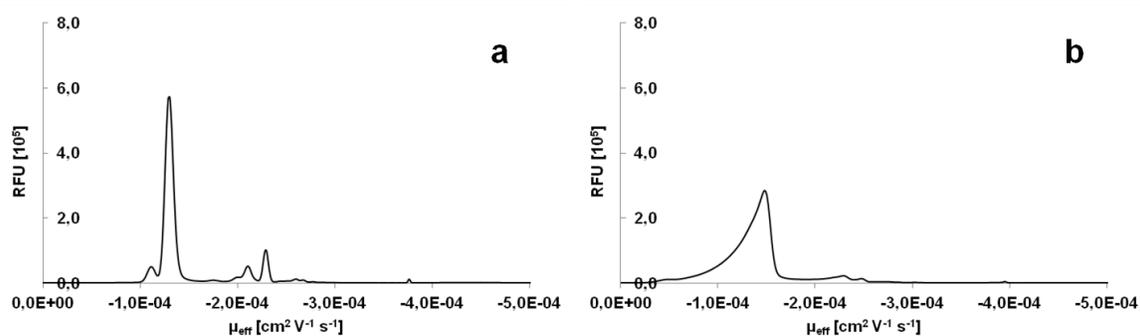


Abbildung 4.28: Einfluss der Chloridkonzentration im Lysepuffer auf die elektrophoretische Trennung: CE-LIF-Messungen von Zelllysaten aus mit CFDA-Pt-Cl₂ behandelten Zellen, lysiert in Zelllysepuffern mit einer Chloridkonzentration von a) 10 mM und b) 140 mM

Der negative Einfluss des Chlorids resultiert zum einen daraus, dass das Chlorid in Richtung der Anode und damit entgegen der Analyten migriert. Bei zu hohen Chloridkonzentration zeigen sich als Folge im Elektropherogramm unsymmetrische Peaks (Fronting) (Abbildung 4.28 b). Ein weiterer Grund für den negativen Einfluss des Chlorids ergibt sich aus der Leitfähigkeit. Eine hohe elektrische Leitfähigkeit bedingt einen geringen elektrischen Widerstand. Zu Beginn der elektrophoretischen Trennung liegt in der Kapillare eine Zone mit dem BGE gefolgt von der Probenzone vor. Ist der Widerstand der Probenzone geringer als der Widerstand des BGE, so ist das elektrische Feld im Bereich der Probenzone kleiner als in der BGE-Zone. Die Analyten migrieren langsam durch die Probenmatrix und werden bei Erreichen des BGE beschleunigt. Dies führt zu einer Verbreiterung der detektierten Peaks und einem schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis [151]. Ist die Leitfähigkeit der Probenzone geringer als im Hintergrundelektrolyten ist der entgegengesetzte Prozess zu beobachten. An der Grenzfläche der Analytenmatrix und des Hintergrundelektrolyten werden die Analyten verlangsamt und somit aufkonzentriert (Stacking). Dies macht die detektierten Peaks schmaler, ermöglicht ein größeres Injektionsvolumen und führt zu niedrigeren Nachweisgrenzen.

Grundlage des Lysepuffers waren entsprechend der beschriebenen Ergebnisse 15 mM Natriumphosphat mit 10 mM Chlorid. Die Chloridkonzentration im Lysepuffer orientiert sich an der intrazellulären Konzentration von Chlorid [152]. Weiterhin wurden dem Lysepuffer Proteaseinhibitoren zugefügt um einen Abbau möglicher Liganden (Glutathion) zu verhindern. Auf weitere Zusätze wurde verzichtet.

4.6.3 Probenstabilität

Die Probenstabilität fand bei dieser Arbeit besondere Beachtung. Generell ist die Stabilität von Komplexverbindungen abhängig von pH-Wert, Konzentration, Temperatur oder der Gegenwart anderer Liganden bzw. andere Metallionen, die zur Bildung stabilerer Verbindungen führen. Innerhalb des Projektes fand die Probengenerierung, inklusive der zellkulturtechnischen Arbeiten, zentral an der Universität Bonn (Arbeitsgruppe Prof. Jaehde) statt. Dies garantierte konstante Arbeitsabläufe und damit eine gleichbleibende Qualität. Des Weiteren konnte dort auf Erfahrungen hinsichtlich des Umganges mit den beiden Zelllinien und dem Arbeiten mit potentiell zytostatischen Verbindungen zurückgegriffen werden. Die ersten Proben wurden entsprechend in Bonn generiert und mehrere Tage bis zu zwei Wochen bei -80°C gelagert. Für die CE-LIF und CE-MS Experimente wurden die Proben auf Eis in einer Styroporbox nach Dortmund versandt. Dort folgte eine weitere Lagerung bei -80°C für einige Tage oder Wochen. Die Analysen erster Proben zeigten jedoch hohe Schwankungen hinsichtlich der Anzahl fluoreszierender Verbindungen als auch bezüglich deren Quantität bzw. dem Verhältnis untereinander. Insbesondere der Gehalt des Fluoreszenzrestes ohne Platin nimmt während der Lagerung deutlich zu (siehe Abbildung 4.29).

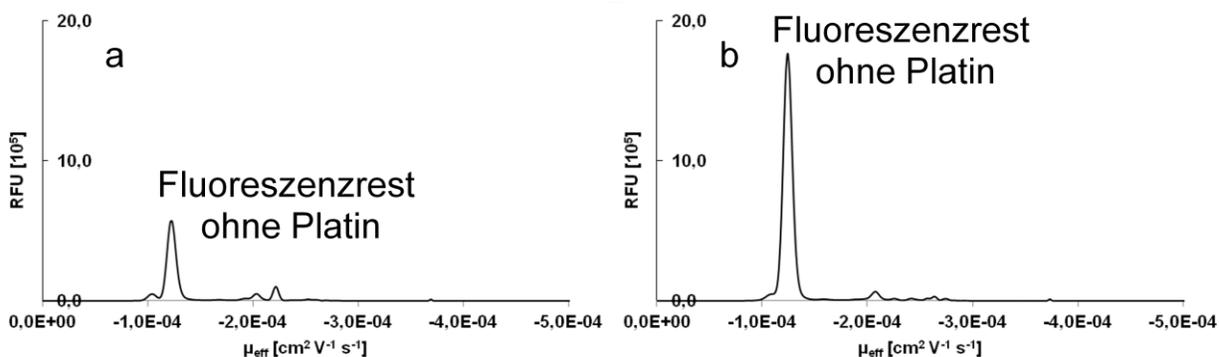


Abbildung 4.29: Stabilität der Probe: Elektropherogramm (CE-LIF) zweier Zelllysate, gewonnen aus einer mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 μM) behandelten Cisplatin-resistenten Zelllinie. Alter der Proben: a) ca. vier Wochen und b) ca. drei Monate. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C ; bei mehrmaligem Auftauen und Einfrieren.

Ein so gravierender Effekt war nicht erwartet worden und ist auf die Reaktivität der Platinkomplexe zurückzuführen. Im Allgemeinen konnte beim Auftauen ein nicht näher bestimmter Rückstand in den Proben beobachtet werden, der nicht wieder in Lösung gebracht werden konnte und unabhängig von der Geschwindigkeit des Einfrier- bzw. Auftauprozesses war. Auch eine leichte Erwärmung der Probe führte zu keiner Verbesserung.

Als Reaktion auf diese Befunde wurden bei nächsten Versuchen die Proben unmittelbar, d.h. nach Transport und Aufarbeitung (ca. 6 Stunden), nach der Generierung analysiert. Es stellte sich in Kombination mit späteren Messungen heraus, dass es auch bei einer Lagerung bei -80°C zu starken Veränderungen der Probe kommt. Für einige Spezies war eine Zunahme für andere eine Abnahme der Intensität festzustellen. Die Gesamtfluoreszenz (nach Aufarbeitung der Probe) nahm dabei in der niedermolekularen Fraktion mit zunehmender Lagerungszeit deutlich ab.

In diesem Zusammenhang konnte CF-Pt-Cl_2 als (fluoreszierende) Hauptkomponente im Zelllysate der mit CFDA-Pt-Cl_2 behandelten Zellen identifiziert werden. Dies gilt sowohl für die Cisplatin-resistente als auch -sensitive Zelllinie. Insbesondere für CF-Pt-Cl_2 war die größte Veränderung (Abnahme) bei der Lagerung zu beobachten (Abbildung 4.30).

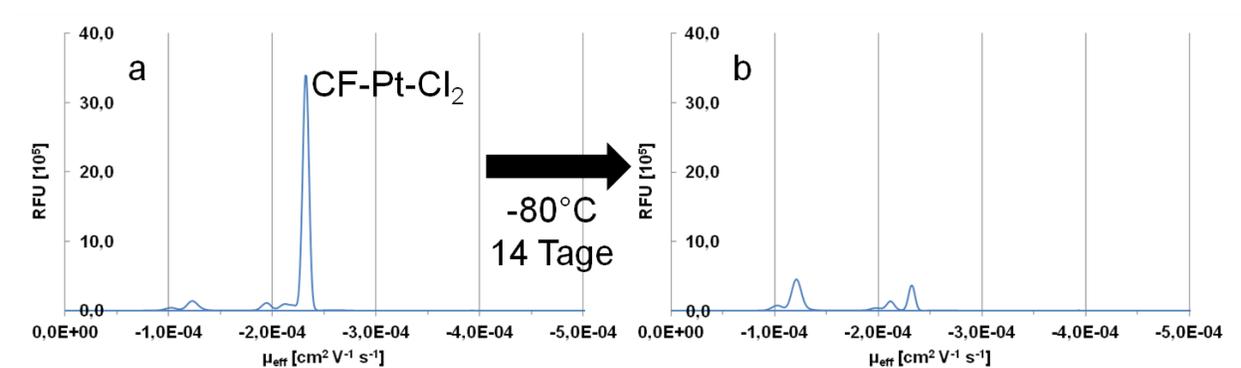


Abbildung 4.30: Stabilität der Probe: Elektropherogramm (CE-LIF) eines Zelllysates, gewonnen aus einer mit CFDA-Pt-Cl_2 ($25\ \mu\text{M}$) behandelten Cisplatin-sensitiven Zelllinie a) 6 Stunden nach der Zelllyse und b) 14 Tage später nach Lagerung bei -80°C .

Zusätzlich zum zeitlichen Problem der Probenlagerung kommt noch die Problematik des Einfrierens bzw. Auftauens der Probe. Dabei können sich zusätzlich zur Temperatur auch die Konzentrationsverhältnisse bzw. der pH-Wert der Probe ändern.

Als Schlussfolgerung aus den beschriebenen Ergebnissen wurden alle folgenden Proben unmittelbar nach der Zellyse nach Dortmund transportiert, aufgearbeitet und analysiert. Die zeitliche Verzögerung zwischen Zellyse und Analyse lagen damit zwischen drei und fünf Stunden. Dies schließt den Transport der Proben von Bonn nach Dortmund und deren Aufarbeitung ein.

Vergleicht man die Gehalte an CF-Pt-Cl₂ im Zellysat bei verschiedenen Versuchen zeigten sich aber, trotz der zügigen Aufarbeitung und Normierung auf den Proteingehalt, zum Teil große Unterschiede. In Abbildung 4.31 sind die Gehalte an CF-Pt-Cl₂ im Zellysat bei verschiedenen Versuchen als Vergleich zwischen resistenter und sensibler Zelllinie dargestellt. Die Buchstaben unter den Säulendiagrammen entsprechen einem Versuch.

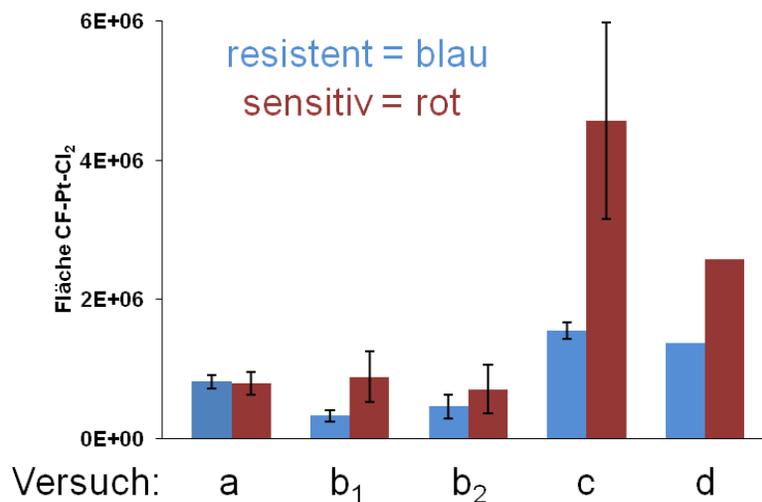


Abbildung 4.31: Vergleich des CF-Pt-Cl₂-Gehaltes (normiert auf den Proteingehalt) im Cytoplasma von Cisplatin-resistenten Zellen (blau) und Cisplatin-sensitiven Zellen (rot) bei verschiedenen Versuchen (a, b₁, b₂, c, d)

Tabelle 4.3 zeigt die zugehörigen numerischen Werte für den Dichlorokomplex mit dem jeweiligen Anteil an der Gesamtfluoreszenz (in der niedermolekularen Fraktion) und der Anzahl der biologischen Replikate (n). Versuch b fand an einem Tag statt. Für b₁ erfolgte die Proteinfällung direkt nach der Zellyse in Bonn. Für b₂ und alle weiteren Versuche wurden die Proteine erst in Dortmund (3 bis 5 Stunden nach der Zellyse) ausgefällt.

Tabelle 4.3: Gehalt von CF-Pt-Cl₂ und dessen Anteil an der Gesamtfluoreszenz in der niedermolekularen Fraktion des Cytosol resistenter und sensibler Zellen bei verschiedenen Versuchen.

Versuch		n	Protein-fällung in	Fläche CF-Pt-Cl ₂	Anteil an der Gesamtfluoreszenz
a	resi	3	Dortmund	814.710 ± 12,3 %	82,5 ± 0,3 %
	sens	3	Dortmund	797.572 ± 20,8 %	77,8 ± 3,1 %
b ₁	resi	3	Bonn	328.829 ± 23,7 %	71,0 ± 5,9 %
	sens	2	Bonn	889.490 ± 40,8 %	74,2 ± 6,9 %
b ₂	resi	3	Dortmund	462.942 ± 36,1 %	68,3 ± 3,0 %
	sens	3	Dortmund	711.918 ± 48,7 %	69,8 ± 8,6 %
c	resi	2	Dortmund	1.547.700 ± 7,7 %	86,9 ± 0,4 %
	sens	2	Dortmund	4.566.906 ± 30,9 %	86,6 ± 1,7 %
d	resi	1	Dortmund	1.376.000	88,5
	sens	1	Dortmund	2.578.520	88,9

Auffällig ist die zum Teil hohe Streuung insbesondere beim Vergleich verschiedener Versuche. Mit biologischer Variabilität alleine lassen sich aber Unterschiede wie z.B. zwischen Versuch a und c nicht erklären.

Ein Erklärungsansatz ist, dass auch mit Beginn der Zellyse in der Probe weiterhin verschiedene Prozesse ablaufen, die den Gehalt und das Verhältnis der CF-Pt-Komplexe zueinander beeinflussen. Zum einen findet sich nach der Zellyse im Zellysat

noch nicht deacetyliertes CFDA-Pt-Cl₂. Die Deacetylierung der nicht fluoreszierenden Ausgangssubstanz CFDA-Pt-Cl₂ liefert fluoreszierendes CF-Pt-Cl₂ nach. Dieser Prozess läuft enzymatisch über Esterasen aber auch chemisch ab - bei pH 7,4 entsprechend langsam. Durch diesen Prozess kann sich der Gehalt des Dichlorokomplex erhöhen.

Zum anderen findet auch ein gegenläufiger Vorgang statt: Der Gehalt des Dichlorokomplexes in der Probe nimmt, wie bei der Lagerung beobachtet, mit der Zeit ab und damit auch dessen Anteil an der Gesamtfluoreszenz in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols. Für die in Tabelle 4.3 gezeigten Versuche schwankt dieser Anteil zwischen 88,9 % und 68,3 %. Auch hier sind die Schwankungen innerhalb eines Versuchs(tages) geringer als zwischen zwei verschiedenen Versuchen.

Die Abnahme des Dichlorokomplexes geht zum einen auf die auch in der Probe nach der Zellyse ablaufende Hydrolyse als auch auf die Reaktion mit (zellulären) Bestandteilen der Probe zurück. Insbesondere durch die Reaktion mit den Proteinen in der Probe kann der niedermolekularen Fraktion CF-Pt entzogen werden, da die Proteine während der Probenaufarbeitung ausgefällt werden (Kapitel 4.6.6).

Um die Reaktivität des Dichlorokomplexes und anderer CF-Pt-Komplexe gegenüber den Proteinen zu testen wurden diese hierfür mit Rinderserumalbumin (BSA) (1 mg/ml) in Phosphatpuffer (15 mM) für fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das BSA, wie in Kapitel 4.6.6 beschrieben, ausgefällt und die Gehalte der jeweiligen CF-Pt-Komplexe mit den Gehalten vor Inkubation verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Insbesondere CF-Pt-Cl₂ und die Hydrolyseprodukte zeigten im Vergleich zu Komplexen mit kleinen schwefelhaltigen Liganden (Methionin, Cystein) eine erhöhte Reaktivität gegenüber BSA. Nach der Inkubation des Dichlorokomplexes mit dem BSA konnten nur noch ca. 1 % des ursprünglich vorhandenen Dichlorokomplexes nachgewiesen werden. Auch für Cisplatin ist die Bindung an Proteine in der Literatur beschrieben [11, 33, 34, 153]. Darüber hinaus konnte durch einen Kooperationspartner, unter Verwendung derselben Zelllinien und identisch

aufgereinigtem CFDA-Pt-Cl₂, die Bindung von CF-Pt an cytosolische Proteine beobachtet und nachgewiesen werden [154].

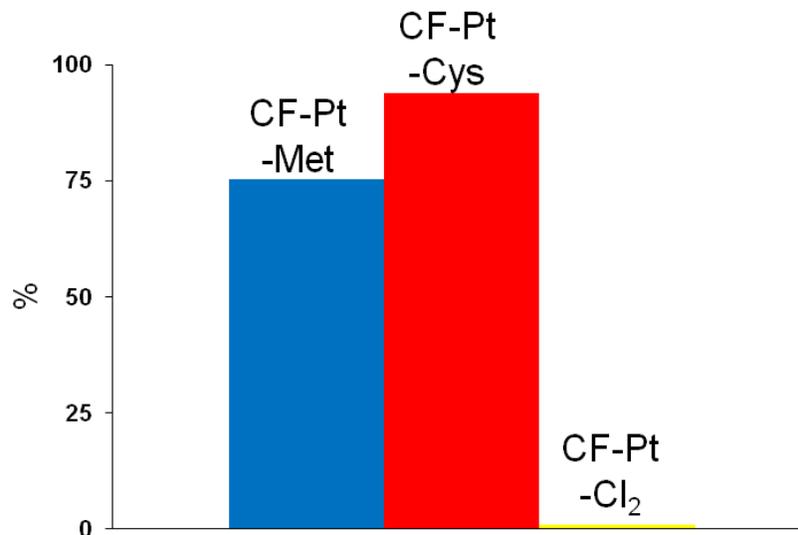


Abbildung 4.32: Reaktivität verschiedener CF-Pt-Komplexe (-Methionin (blau), -Cystein (rot), -Cl₂ (gelb)) mit BSA. Dargestellt ist der relative Vergleich der Flächen im Elektropherogramm vor und nach der Inkubation mit BSA

Die Untersuchung des Einflusses der Zeit zwischen der Zellyse in Bonn und dem Beginn der Analytik in Dortmund auf den Gehalt an CF-Pt-Cl₂ erfolgte über vier mit CFDA-Pt-Cl₂ behandelten Zellkulturansätzen der sensitiven Zellen. Die ersten beiden Ansätze wurde zeitgleich lysiert (sensitiv 1) und die anderen beiden zeitgleich eine Stunde später (sensitiv 2). Die Transportzeit nach Dortmund war bei sensitiv 1 und 2 gleich lang. Die Lagerung und der Transport der Proben nach Dortmund erfolgten auf Eis und lichtgeschützt. In Dortmund wurden alle Proben aufgearbeitet und analysiert. Dies wurde nach einer, 16 und 72 Stunden wiederholt (entspricht der Lagerung mit den Proteinen). Die ersten aufgearbeiteten Proben wurden erneut nach 16 bzw. 72 Stunden gemessen (entspricht der Lagerung ohne die Proteine). Zwischen den einzelnen Aufarbeitungen bzw. Messungen erfolgte die Lagerung der Proben lichtgeschützt bei

4°C und nicht wie gewöhnlich bei -80°C. Dies sollte eine mögliche Reaktion beschleunigen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.33 dargestellt.

Generell sinkt der Gehalt an CF-Pt-Cl₂ mit der Zeit in allen Proben. Unter den gegebenen Bedingungen ist nach 16 Stunden Lagerung mit den Proteinen ca. 50 % des CF-Pt-Cl₂ abgebaut, nach 72 Stunden ca. 95 %. Wird die Probe ohne Proteine gelagert, verringert sich dieser Prozess signifikant.

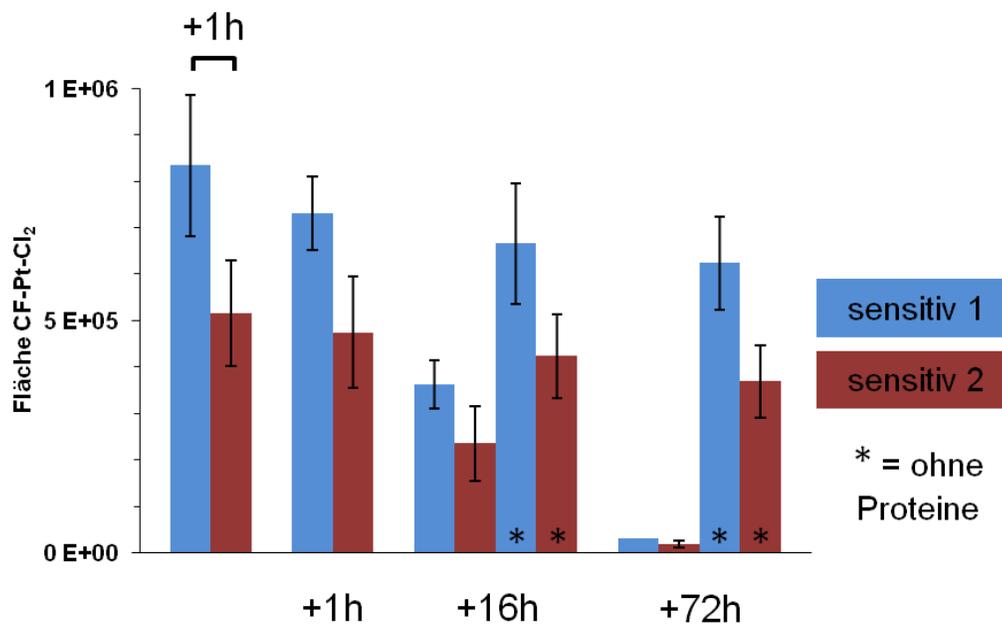


Abbildung 4.33: Gehalt von CF-Pt-Cl₂ in der Probe bei Lagerung mit und ohne Proteine. Dargestellt sind die Mittelwerte von je zwei unabhängigen biologischen Proben

Aus den gewonnenen Daten über den zeitlichen Verlauf des Gehaltes an CF-Pt-Cl₂ lässt sich die Abnahme des Dichlorokomplexes in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols, bei Lagerung mit den Proteinen in der Probe, als eine Kinetik erster Ordnung beschreiben. Tabelle 4.4 zeigt die zugehörigen Funktionen mit den Bestimmtheitsmaßen. Für drei der vier untersuchten Proben, findet sich eine lineare Abhängigkeit der Reaktionskonstante vom Proteingehalt. Hohe Proteingehalte beschleunigen die Hydrolyse des Dichlorokomplexes. Darüber spielen noch andere Mechanismen eine Rolle, da die Probe sens 1h2 nicht diesem Zusammenhang folgt.

Tabelle 4.4: Übersicht über vier Proben (sensitive Zelllinie) mit Proteingehalt und Abklingfunktion für CF-Pt-Cl₂

Probe	Abklingfunktion $y =$	R ²	Proteingehalt [µg/ml]	k [h ⁻¹]	Proteingehalt vs. k
sens 1h2	$0,75 \cdot 10^6 \cdot e^{-0,043x}$	0,9988	986,4	0,04305	$y = -2 \cdot 10^{-5}x - 0,03$ $R^2 = 0,9932$
sens 1h1	$1,04 \cdot 10^6 \cdot e^{-0,047x}$	0,9984	997,7	0,04717	
sens 2h2	$0,46 \cdot 10^6 \cdot e^{-0,050x}$	0,9986	1161,9	0,05017	
sens 2h1	$0,75 \cdot 10^6 \cdot e^{-0,044x}$	0,9999	759,6	0,04392	

Die gezeigten Daten machen deutlich, dass die Analyse der Zellysate möglichst unmittelbar nach der Zellyse erfolgen sollte, da die Hydrolyseprozesse weiterlaufen und durch Verringerung der Temperatur bestenfalls verlangsamt werden können. Gleichzeitig laufen auch Reaktionen der CF-Pt-Komplexe mit zellulären Bestandteilen ab. Diese spiegelt dann aber nicht die Prozesse in lebenden Zellen wieder und können Ergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund sollte die Auftrennung der Lysate in einen nieder- und hochmolekularen Teil auch möglichst unmittelbar nach der Zellyse erfolgen. Auch hier läuft die Verteilung zwischen der nieder- und hochmolekularen Fraktion in der Probe weiter. Aufgrund des Transportes zwischen Bonn und Dortmund konnte die Zeit zwischen Lyse und Beginn der Analyse nicht weiter verkürzt werden und lag bei ca. drei Stunden.

4.6.4 Proteinfällung

Für erste Versuche hinsichtlich der Verteilung von CF-Pt-Cl₂ im Zytoplasma wurde das Zellysat der behandelten Zellen ohne weitere Vorbehandlung kapillarelektrophoretisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proteine in der Probe bei einer kapillarelektrophoretischen Trennung stören und insbesondere bezüglich der Reproduzierbarkeit, Probleme verursachen. Beim gewählten pH von 7,4 kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Kapillaroberfläche, die zu Adsorptionen von Proteinen an der Kapillaroberfläche führen und zu einer Veränderung

der elektrolytischen Doppelschicht und dem Zeta-Potential. Damit verbunden, ist eine Veränderung des EOFs. Dies konnte durch die Verbreiterung der detektierten Peaks und stark verlängerten Migrationszeiten mit zunehmender Verwendungsdauer der Kapillare beobachtet werden.

Um die Proteine aus der Probe zu entfernen, wurde diese mit eiskaltem Ethanol ausgefällt und abzentrifugiert. Bezüglich der Stabilität der Platin-Komplexe waren zwei Schritte während der Proteinfällung kritisch: 1. Das Verdünnen der Probe mit Ethanol (1:9) und 2. das anschließende Eindampfen der Probe bis fast zur Trockne in der SpeedVac. Für die Komplexe von CF-Pt mit Cystein, Glutathion bzw. Methionin wurde durch Versuche gezeigt, dass diese bei der Proteinfällung überwiegend stabil bleiben (Abbildung 4.34). Die Verlustraten liegen zwischen 30 % für den Komplex mit GSH und 5 % für den Komplex mit Methionin.

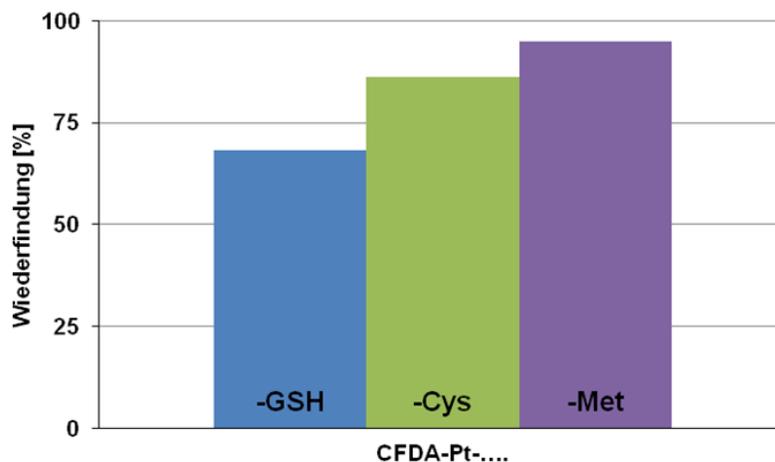


Abbildung 4.34: Prozentuale Wiederfindung nach Durchführung der Proteinfällung für CF-Pt-GSH, CF-Pt-Cystein und CF-Pt-Methionin.

Auch mit Hinblick auf die in Kapitel 4.6.3 gezeigten Ergebnisse bezüglich der Probenstabilität wurden für alle kapillarelektrophoretischen Messungen die Proteine in den Zelllysatproben ausgefällt.

4.6.5 Prüfung auf Kontaminationen während der Zellyse

Wie bereits erwähnt, konnte CF-Pt-Cl₂ als (fluoreszierende) Hauptkomponente in den behandelten Zellen beider Zelllinien identifiziert werden. Dies entspricht der Ausgangssubstanz (abzüglich der beiden Acetylgruppen), mit der die Zellen behandelt wurden. Im behandelten Zellkulturmedium beträgt die Konzentration des Dichlorokomplexes 25 µM. Vor der Zellyse wurde das Medium abgesaugt und anschließend die Zellen dreimal mit PBS gespült. Die Zellyse fand in 1 ml Zellysepuffer statt. Die Verunreinigung des Lysepuffers mit 1 µl des behandelten Mediums könnte bereits zu einer Kontamination der Probe mit CF-Pt-Cl₂ im Bereich von 25 nM führen, was eine beachtliche Verfälschung der Ergebnisse nach sich ziehen würde.

Um eine mögliche Kontamination zu untersuchen und auszuschließen, wurden Zellen der beiden Zelllinien, wie oben beschrieben, behandelt. Zusätzlich wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem die Zellen nicht behandelt wurden aber kurz vor der Lyse für einige Sekunden mit dem Medium der behandelten Zellen überschichtet wurden. Anschließend wurden diese Zellen, wie beschrieben, gespült und lysiert.

Bei der Analyse der behandelten und der Kontrollzellen mit CE-LIF zeigte sich, dass in der niedermolekularen Fraktion des Lysates der Kontrollzellen deutlich weniger Fluoreszenz und CF-Pt-Cl₂ nachzuweisen war als in den behandelten Zellen (Abbildung 4.35, c - f). Weiterhin wurde CF-Pt-Cl₂ quantitativ im Zellkulturmedium, im Spül-PBS und in den Zelllysaten bestimmt. Die logarithmische Auftragung des Gehaltes an CF-Pt-Cl₂ gegen die Spülschritte findet sich ebenfalls in Abbildung 4.35. Spülschritt eins entspricht dem Gehalt im Medium, zwei bis vier im PBS und Spülschritt fünf im Lysat. Geht man davon aus, dass sich nach jedem Spülschritt eine gleichmäßige Verteilung des CF-Pt-Cl₂ in der Spülflüssigkeit einstellt, nimmt das CF-Pt-Cl₂ über mehrere Spülschritte exponentiell ab. Ist das Volumen, das nach jedem Spülschritt zurück bleibt gleich, ergibt die logarithmische Auftragung - des Gehaltes an CF-Pt-Cl₂

gegen die Anzahl der Spülschritte - eine Gerade. Die Steigung dieser Geraden ist abhängig von der Höhe des zurückbleibenden Volumens.

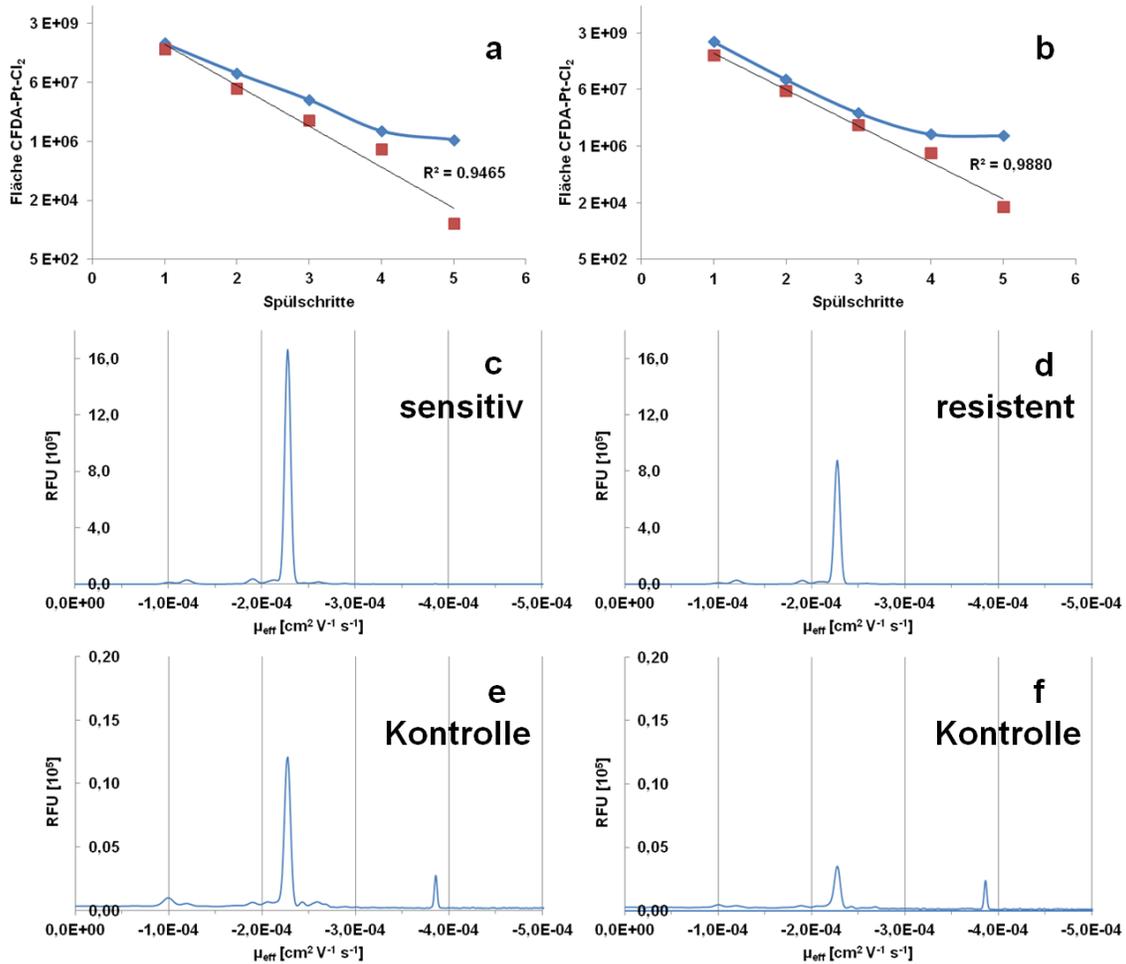


Abbildung 4.35: Kontaminationskontrolle für die a) sensitive Zelllinie und b) resistente Zelllinie: Auftragung der Flächen von CF-Pt-Cl₂ gegen die Anzahl der Spülschritte; Spülschritt 1 entspricht dem Medium nach der Behandlung, Schritt 2 bis 4 dem Spülen mit PBS, Schritt 5 der Zellyse. Elektropherogramme (CE-LIF) der Zelllysate der mit CFDA-Pt-Cl₂ behandelten c) sensitiven und d) resistenten Zellen. Elektropherogramme (CE-LIF) der Zelllysate der unbehandelten (Kontrollen) aber mit behandeltem Medium überschichteten (30 s) e) sensitiven und f) resistenten Zellen.

Ginge der Gehalt an CF-Pt-Cl₂ nur auf Verdünnung und Verteilung in der Spülflüssigkeit zurück, so müssten die fünf Punkte der jeweiligen Spülschritte auf einer Geraden liegen. Für die beiden Kontrollexperimente ist dies unter Beachtung einer gewissen

Schwankungsbreite auch festzustellen ($R^2 = 0,9465$ und $R^2 = 0,9880$). Für die behandelten Zellen zeigte sich, dass der Gehalt an CF-Pt-Cl₂ im letzten Schritt größer ist als bei einer reinen Verdünnung und Verteilung in der Spülflüssigkeit (Lysepuffer) zu erwarten wäre. Der durch Kontaminationen der Probe während der Zelllyse entstehende Fehler liegt für CF-Pt-Cl₂ bei unter einem Prozent (0,7 % bei der sensitiven und 0,4 bei der resistenten Zelllinie). Mit diesem Versuch konnte verdeutlicht werden, dass bei sauberen zellkulturtechnischen Arbeiten keine signifikante systematische Verunreinigung der Probe durch das behandelte Zellkulturmedium zu erwarten ist.

4.6.6 Optimierter Arbeitsablauf

Nach Berücksichtigung aller beschriebenen Untersuchungen wurde folgender Ablauf für Probengenerierung und -aufarbeitung etabliert:

1. Behandlung der Zellen mit aufgereinigtem CFDA-Pt-Cl₂ (25 mM) in unsupplementiertem Zellkulturmedium für zwei Stunden
2. Zelllyse mit Ultraschall auf Eis in Natriumphosphatpuffer (pH 7,4): 15 mM Phosphat, 10 mM Natriumchlorid und Proteaseinhibitoren
3. Proteinfällung mit eiskaltem Ethanol
4. CE-LIF: 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) mit kurzer Analysenzeit (unter 5 Minuten)
5. CE-MS: Ammoniumcarbonat (pH 7,4)

Die gesamte Probengewinnung und -aufarbeitung wurde so modifiziert, dass alle Bestandteile der Puffer und Arbeitslösungen auf ein nötiges Minimum reduziert werden konnten. Überprüft wurde die Probenaufarbeitung mittels CF-Pt-Komplexen. Diese wurden der gesamten Probenaufarbeitung unterworfen (Abbildung 4.36)

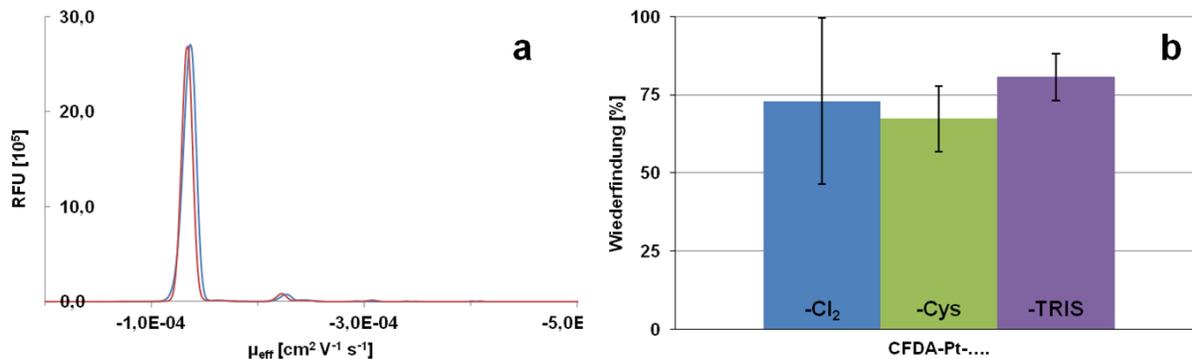


Abbildung 4.36: Elektropherogramm (a) von CF-Pt-Met vor und nach Durchführung der gesamten Probenaufbereitung inklusive der Zellyse. Prozentuale Wiederfindung (b) nach Durchführung der Proteinfällung für CF-Pt-Cl₂, CF-Pt-Cystein und CF-Pt-TRIS aus drei unabhängigen Versuchen.

Für die Zellyse wurden die Komplexe in Lysepuffer gelöst und entsprechend behandelt. Die prozentualen Wiederfindungsraten sind in Abbildung 4.36 dargestellt. Die Verlustraten liegen dabei um die 25 % mit einer etwas erhöhten Streuung für den instabileren Dichlorokomplex. Die Auswertung eines technischen Replikates zeigte eine gute Reproduzierbarkeit bezüglich der Flächen und der Mobilitäten (Tabelle 4.5) (Abbildung 4.37). Hierfür wurde eine Probe (entsprechend nur eine Zellyse) dreimal nach dem optimiertem Arbeitsablauf aufgearbeitet und mit CE-LIF analysiert.

Tabelle 4.5: Übersicht von Komplexen mit Mobilitäten und Massen

	Fläche [10 ⁴]	μ _{eff} [10 ⁻⁴ cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]
Peak 1	2,3 ± 8,0 %	-1,01 ± 1,3 %
Peak 2	7,4 ± 9,5 %	-1,21 ± 0,4 %
Peak 3	3,7 ± 15,3 %	-1,97 ± 0,7 %
Peak 4	4,8 ± 7,0 %	-2,10 ± 0,6 %
Peak 5	67,6 ± 6,5 %	-2,31 ± 0,4 %
Peak 6	1,9 ± 12,2 %	-2,64 ± 0,5 %
Peak 7	0,5 ± 7,5 %	-3,90 ± 0,2 %

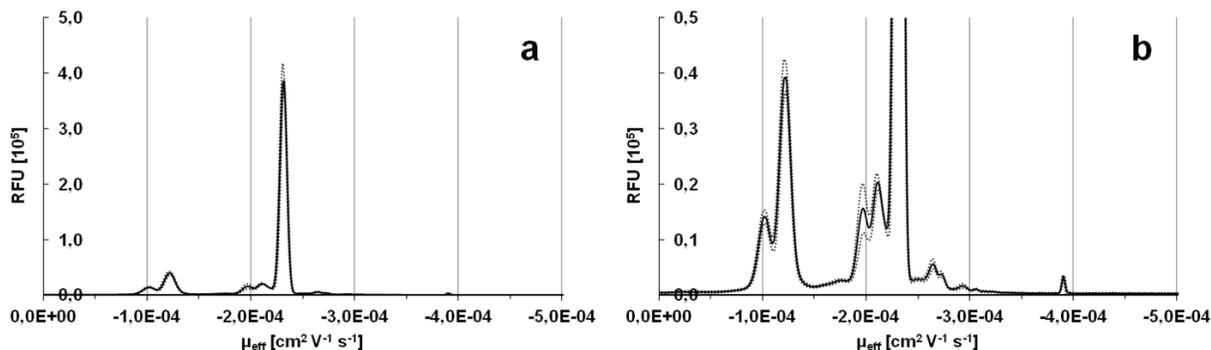


Abbildung 4.37: Technisches Replikat (n=3): Elektropherogramme (CE-LIF) eines Zelllysates der mit CFDA-Pt-Cl₂ behandelten sensitiven Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert (schwarz) plus/minus einer Standardabweichung (gestrichelt) von drei verschiedenen Aufarbeitungen einer Probe.

In keinen untersuchten Proben wurden Hinweise auf Addukte mit Phosphat gefunden. Weder konnten mit CE-MS entsprechende Massen detektiert werden noch mittels CE-LIF vergleichbare Mobilitäten ermittelt werden.

4.7 Zellkulturversuche mit CFDA-Pt-Cl₂

4.7.1 CF-Pt-Cl₂ im Cytosol

Nach Optimierung der Probenvorbereitung und der analytischen Nachweismethoden folgte die Untersuchung der Verteilung von CF-Pt in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols von Zellen der Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ziellinie. In Abbildung 4.38 sind die Ergebnisse für beide Zelllinien (a: sensitiv; b: resistent) dargestellt. Die gezeigten Elektropherogramme (CE-LIF) entsprechen dem Mittelwert (schwarz) aus drei unabhängigen biologischen Versuchen und der einfachen Standardabweichung (gestrichelt). Für die bessere Veranschaulichung der Verbindungen mit niedriger Fluoreszenzintensität erfolgt auch die Darstellung mit vergrößerter Y-Achse (c: sensitiv, d: resistent).

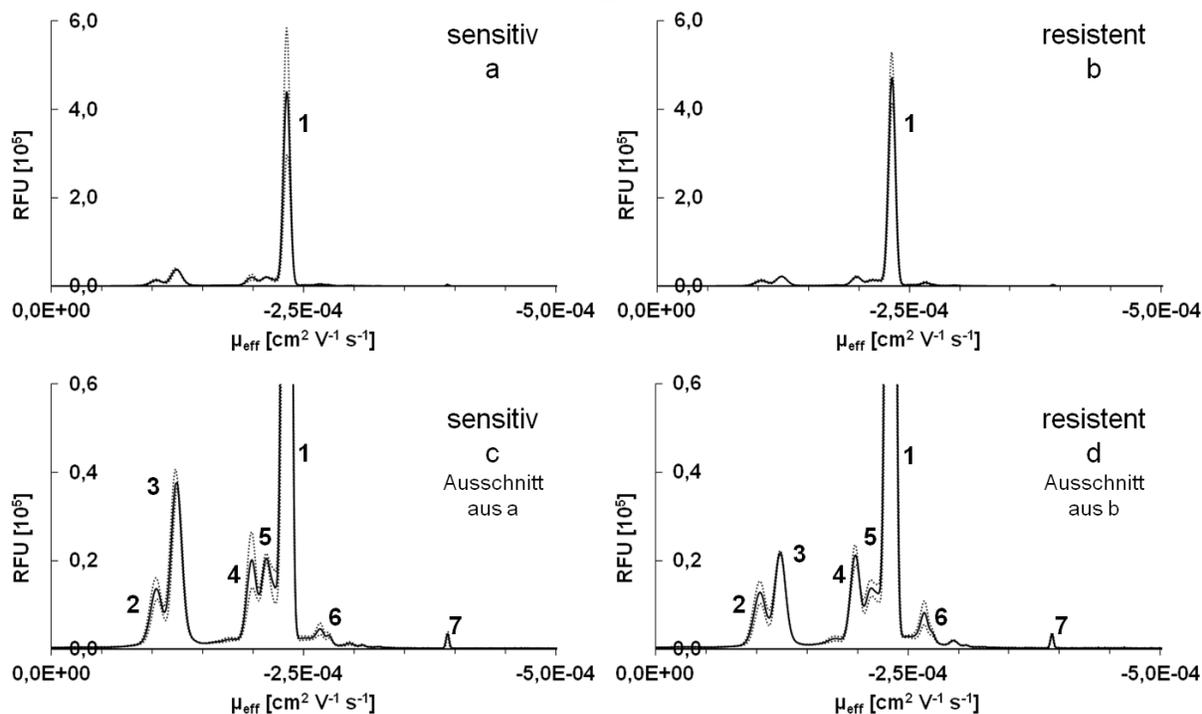


Abbildung 4.38: Elektropherogramme (CE-LIF) der niedermolekularen cytosolischen Fraktion von Zelllysaten, gewonnen aus einer mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 μM) behandelten Cisplatin-sensitiven Zelllinie (a und c) und einer Cisplatin-resistenten Zelllinie (b und d). Dargestellt ist der Mittelwert (schwarz) plus/minus einer Standardabweichung (gestrichelt) von drei unabhängigen biologischen Proben.

Die Elektropherogramme zeigen den Nachweis von sieben fluoreszierenden Verbindungen mit negativer Gesamtladung, die jeweils in beiden Zelllinien zu finden sind, mit effektiven Mobilitäten von $-1,04$ bis $-3,92 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In Tabelle 4.6 sind die Mobilitäten der sieben Verbindungen zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um die Mittelwerte ($n=10$) aus vier verschiedenen Versuchsreihen. Jeweils fünf Werte stammen aus Ergebnissen der sensitiven bzw. der resistenten Zelllinie.

Tabelle 4.6: Übersicht der fluoreszierenden Verbindungen im Zelllysate mit Mobilitäten: Die Mobilitäten sind Mittelwerte aus jeweils fünf Messwerten für die resistente und die sensitive Zelllinie aus vier verschiedenen Versuchsreihen.

Peak	$\mu_{\text{eff}} [10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]$
Spezies 1	$-2,33 \pm 0,03$
Spezies 2	$-1,04 \pm 0,03$
Spezies 3	$-1,26 \pm 0,06$
Spezies 4	$-1,99 \pm 0,04$
Spezies 5	$-2,14 \pm 0,04$
Spezies 6	$-2,66 \pm 0,03$
Spezies 7	$-3,92 \pm 0,03$

Qualitativ zeigte sich in beiden Zelllinien ein ähnliches Bild: eine Hauptkomponente (Spezies 1) und mehrere Nebenkomponten (Spezies 2 bis 7). Durch eine Cut-off Filtration konnte festgestellt werden, dass das Molekulargewicht aller sieben Verbindungen unterhalb von 3 kDa liegt. Die negative Nettoladung der Verbindungen ist primär auf die Fluoreszenzstruktur zurückzuführen, die bei einem pH-Wert von 7,4 zweifach negativ geladen ist.

Auf die Hauptkomponente (Spezies 1) entfallen ca. 75 % der nachgewiesenen Fluoreszenz. Die effektive Mobilität von $-2,33 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ stimmt gut mit der Mobilität für CF-Pt-Cl₂ ($-2,36 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) überein. Mittels CE-MS konnte dieser Peak direkt aus dem Zelllysate auch als Dichlorokomplex ($m/z: 713,1$) identifiziert werden.

Für die Spezies 2 bis 7 war dieser direkte Nachweis aus dem Zellysate nicht möglich. Das Auftreten dieser Verbindungen lag unterhalb der Nachweisgrenzen der entwickelten CE-MS-Methoden. Aufgrund der durch CE-LIF ermittelten Mobilitäten lassen sich jedoch mögliche Zuordnungen treffen.

Bei Spezies 2 ($-1,04 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) könnte es sich um mehrere verschiedene Komplexe handeln, die kapillarelektrophoretisch nicht voneinander zu unterscheiden sind. Die Komplexe von CF-Pt mit Methionin ($-1,02 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Glutamin ($-1,03 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Histidin ($-1,00 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und Glycin ($-1,11 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) weisen sehr ähnliche effektive Mobilitäten auf. Darüber hinaus ist zu erwarten, dass Komplexe mit weiteren biologischen Molekülen möglich sind, die ebenfalls vergleichbare Mobilitäten aufweisen.

Spezies 3 ($-1,26 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entspricht dem Fluoreszenzrest ohne Platin ($-1,26 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die Mobilitäten stimmen sehr gut überein. Die Bildung deutet auf die (in der Literatur beschriebene) Reaktion mit der freien Thiolgruppe (z.B. Glutathion) hin - analog zu den oben beschriebenen Modellversuchen. Bezüglich der Probenstabilität ist für diese Spezies eine deutliche Zunahme mit der Lagerungszeit zu beobachten. Nach mehrmonatiger Lagerung entfallen 90 % der Fluoreszenz auf diese Spezies. Dies ist zum einen auf eine weitere Reaktion mit potentiellen Liganden und zum anderen auch auf eine Zersetzung labilerer Komplexe zurückzuführen.

Für Spezies 4 ($-1,99 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und 5 ($2,14 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lassen sich verschiedene Komplexe unter anderem mit Cystein ($-2,10 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Cysteinsäure ($-2,05 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) oder Glutaminsäure ($-2,00 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zuordnen. Wird die Probe bei 37°C für eine Stunde erwärmt, ist eine Zunahme von Spezies 4 unter Abnahme des Dichlorokomplexes zu beobachten. Ein gleiches Verhalten zeigt der Dichlorokomplex auch in reinem Zellysepuffer, ohne zelluläre Bestandteile. Dies bekräftigt die Vermutung, dass es sich bei Spezies 4 um das erste

Hydrolyseprodukt (Austausch eines Chloro-Liganden gegen ein Wassermolekül) handelt.

Spezies 6 ($-2,66 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entspricht dem zu erwartenden Komplex mit Glutathion ($-2,68 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und steht in Verbindung mit Spezies 2.

Spezies 7 ($-3,92 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) steht nicht im Zusammenhang mit CF-Pt-Cl₂. Auch in unbehandelten Kontrollen lässt sich diese Verbindung detektieren (Abbildung 4.39).

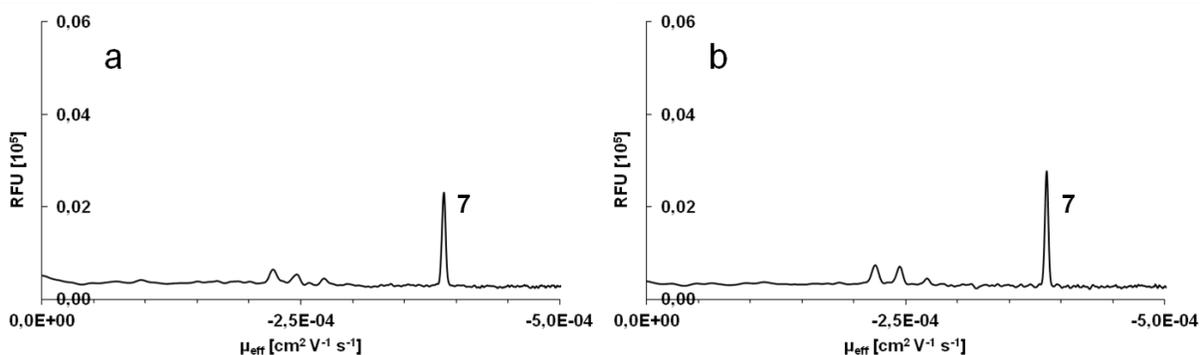


Abbildung 4.39: Elektropherogramme (CE-LIF) der niedermolekularen cytosolischen Fraktion von Zelllysaten, gewonnen aus unbehandelten Zellen einer Cisplatin-sensitiven Zelllinie (a) und einer Cisplatin-resistenten Zelllinie (b).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der überwiegende Teil der Fluoreszenz in der niedermolekularen Fraktion nach zweistündiger Behandlungszeit auf die (deacetylierte) Ausgangsverbindung CF-Pt-Cl₂ zurückzuführen ist. Das Platinzentrum bleibt unverändert. Eine Metabolisierung bzw. Hydrolyse des Dichlorokomplexes ist nur teilweise zu beobachten. Dies gilt sowohl für die Cisplatin-resistente als auch für die sensitive Zelllinie.

4.7.2 Vergleich beider Zelllinien

In Hinblick auf die Resistenzentwicklung war insbesondere der Vergleich beider Zelllinien bezüglich der Verteilung von CF-Pt-Komplexen im Cytoplasma interessant und sollte Anhaltspunkte für deren Ursachen geben.

In den Zellen beider Zelllinien wurden in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols die gleichen fluoreszierenden Spezies nachgewiesen. Keine dieser Spezies war nur in der resistenten oder in der sensitiven Zelllinie zu finden. Bezüglich der Gehalte der einzelnen Spezies in den Zellen der beiden Zelllinien konnten jedoch Unterschiede festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass (bei Normierung auf den Proteingehalt) in den sensitiven Zellen der Gehalt an CF-Pt-Cl₂ in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols höher ist als bei den Zellen der resistenten Zelllinie (Abbildung 4.40). Dies legt Unterschiede in der Aufnahme oder Ausschleusung bzw. bei beiden Prozessen nahe.

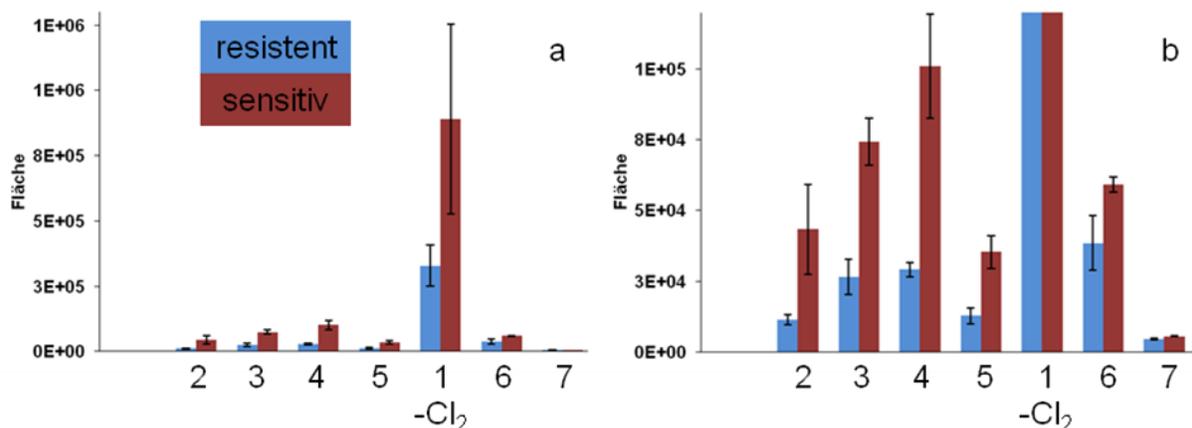


Abbildung 4.40: a) Vergleich, der in beiden Zelllinien (Cisplatin-sensitiven Zellen (rot) und Cisplatin-resistenten Zellen (blau)) nach Behandlung mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 µM für zwei Stunden) nachgewiesenen fluoreszierenden Verbindungen in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols. Die Proteine wurden direkt im Anschluss an die Zelllyse ausgefällt. Dargestellt sind die Mittelwerte plus/minus einer Standardabweichung der sieben nachgewiesenen fluoreszierenden Verbindungen von je drei unabhängigen biologischen Proben. b) Ausschnitt aus a mit vergrößerter y-Achse

Auch von Spezies 2 bis 6 lässt sich in den Zellen der sensitiven Zelllinie ein höherer Gehalt normiert auf den Proteingehalt nachweisen. Das Verhältnis der Peaks zueinander ist in beiden Zelllinien sehr ähnlich. Dies zeigt, dass in den sensitiven wie auch in den resistenten Zellen vergleichbare Hydrolyse- und Metabolisierungsprozesse des CF(DA)-Pt-Cl₂ ablaufen. Wie bereits beschrieben, geht Spezies 7 nicht auf CF-Pt-Komplexe zurück. In beiden Zelllinien finden sich vergleichbare Gehalte. Die Streuung ist auch wesentlich geringer als für die übrigen fluoreszierenden Spezies.

In der niedermolekularen Fraktion des Zelllysates beider Zelllinien findet sich nur ein geringer Anteil an Metaboliten, z.B. mit Glutathion. Eine Erklärung liegt in der Kinetik der Platinkomplexe. Die Reaktion ist zu langsam, um innerhalb der zweistündigen Behandlung eine höhere Menge Metabolite zu bilden. Des Weiteren können die Metabolite weiter prozessiert worden sein und sich nach Reaktion mit den Proteinen in der hochmolekularen Fraktion befinden, wie für den Dichlorokomplex gezeigt. Den Einfluss der Proteine in der Probe auf die nachgewiesenen fluoreszierenden Verbindungen sind in Abbildung 4.41 dargestellt.

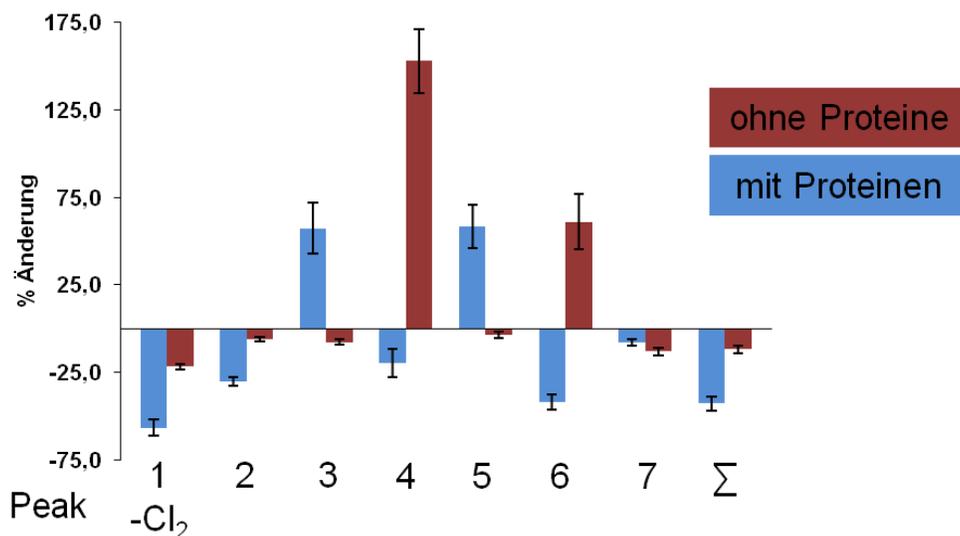


Abbildung 4.41: Prozentuale Änderungen der sieben nachgewiesenen fluoreszierenden Peaks in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols (sensitive Zelllinie) bei Lagerung der Probe mit und ohne Proteine für 16 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte plus/minus einer Standardabweichung von vier unabhängigen biologischen Proben

Es zeigt die relativen Veränderungen der einzelnen Peaks bei Lagerung der Probe mit und ohne Proteine. Bei Lagerung mit den Proteinen nimmt der Fluoreszenzrest ohne Platin (Peak 3) zu. Dies war auch bei der Probenlagerung bei -80°C zu beobachten. Die Gesamtfluoreszenz nimmt, in beiden Fällen, mit dem Dichlorokomplex ab. Werden die Proteine aus der Probe entfernt, kann eine Zunahme der GSH-Addukte (Spezies 5) und des ersten Hydrolyseproduktes (Spezies 4) beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse sind auch durch Kasherman et al. beschrieben, die erst bei Inkubation der niedermolekularen Fraktion eines Zellextraktes (< 3 kDa) mit Cisplatin, Addukte von Platin und Glutathion nachweisen konnten [32].

Eine weitere Möglichkeit, wie die CF-Platinkomplexe der niedermolekularen Fraktion des Cytosols entzogen werden können ist, dass diese aus der Zelle ausgeschleust und ins Zellkulturmedium abgegeben werden.

4.7.3 Efflux von CF-Pt-Komplexen

Nach der Aufnahme des Dichlorokomplexes in die Zellen finden zum einen Hydrolyse- und Metabolisierungsprozesse, inklusive Bindung an Proteine und DNS, statt. Darüber hinaus können die gebildeten Hydrolyseprodukte und Metabolite auch aus den Zellen ins Zellkulturmedium abgegeben werden. Abbildung 4.42 zeigt die Elektropherogramme der Zelllysate der mit CFDA-Pt-Cl₂ behandelten sensitiven und resistenten Zellen mit den Elektropherogrammen der zugehörigen Zellkulturmedien nach der Behandlung.

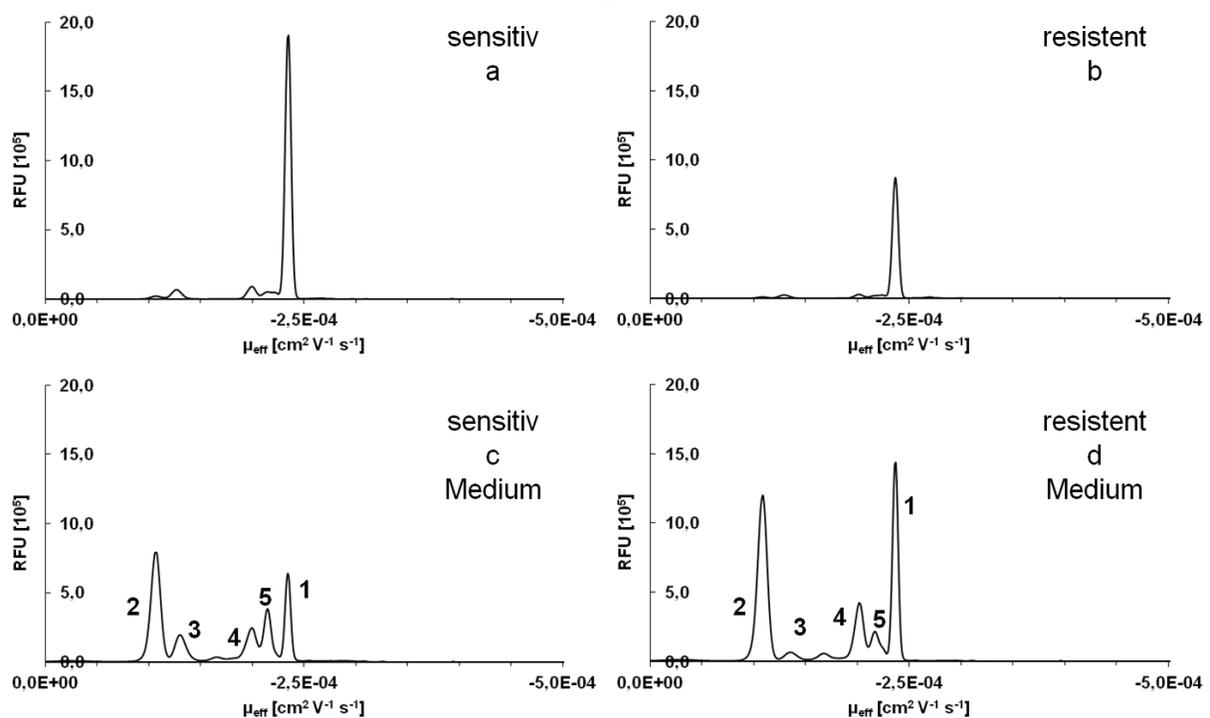


Abbildung 4.42: Elektropherogramme (CE-LIF) der niedermolekularen cytosolischen Fraktion von Zelllysaten, gewonnen aus einer mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 μM) behandelten Cisplatin-sensitiven Zelllinie (a) und einer Cisplatin-resistenten Zelllinie (b) mit den Elektropherogramme (CE-LIF) der zugehörigen Zellkulturmedien (c und d) nach zweistündiger Behandlung.

In den Zellkulturmedien lassen sich Spezies 1 bis 5 nachweisen. Die Mobilitäten dieser Peaks stimmen mit denen in den Zelllysaten überein. Zusätzlich konnte ein weitere Spezies (8; $\mu_{\text{eff}} = 0,25 \pm 0,01 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) detektiert werden.

Spezies 1 wurde als Dichlorokomplex und Spezies 2 als 1:1-Komplex mit Methionin (m/z : 790,2) identifiziert. Wie bereits beschrieben, lassen sich für Spezies 2 auch weitere CF-Pt-Komplexe mit gleichen Mobilitäten zuordnen. In der Fluoreszenzdetektion erscheinen diese als ein Peak. In der massenspektrometrischen Detektion können diese aber unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Bei Inkubationsversuchen von CFDA-Pt-Cl₂ im Zellkulturmedium ohne Zellen, konnte auch der Komplex mit Glutamin mit der gleichen Mobilität nachgewiesen werden.

Abbildung 4.43 zeigt die detektierte fluoreszierenden Spezies im Zellkulturmedium nach der zweistündigen Behandlung der Zellen mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 μ M) und nach zweistündiger Inkubation von CFDA-Pt-Cl₂ (50 μ M) im Zellkulturmedium ohne Zellen bei gleichen Bedingungen (37°C und 5 % CO₂).

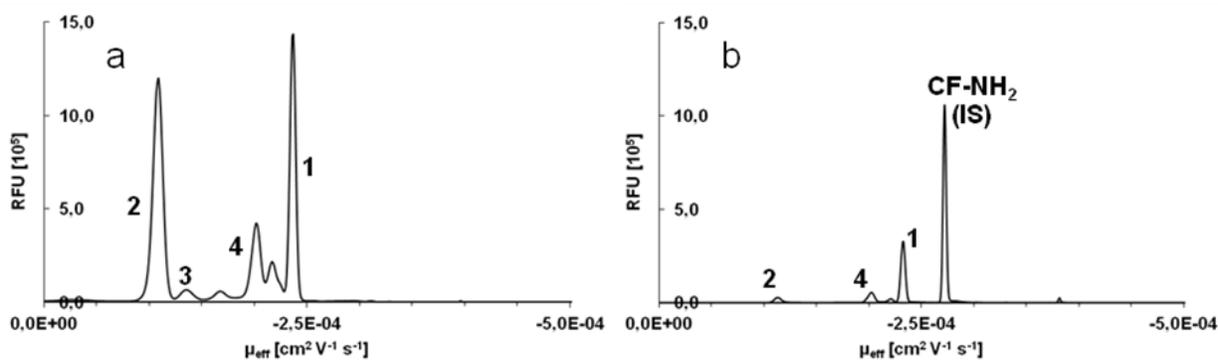


Abbildung 4.43: Elektropherogramme (CE-LIF) des Zellkulturmediums nach zweistündiger Behandlung mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 μ M) von Zellen einer Cisplatin-resistenten Zelllinie a) und nach zweistündiger Inkubation mit CFDA-Pt-Cl₂ (50 μ M) ohne Zellen. Bedingungen für beide: 37°C und 5 % CO₂.

Auffällig ist, dass die Gesamtfluoreszenz im Zellkulturmedium nach der Behandlung der Zellen wesentlich höher ist als bei der Inkubation des CFDA-Pt-Cl₂ im Zellkulturmedium ohne Zellen. Die Deacetylierung läuft mit den Zellen schneller ab. Dies deutet darauf hin, dass das CFDA-Pt-Cl₂ in die Zellen aufgenommen wird. Dort erfolgt die enzymatische Deacetylierung und der deacetylierte Dichlorokomplex wird wieder aus

der Zelle ins Medium abgegeben. Fehlen die Zellen, läuft die Deacetylierung rein chemisch und entsprechend langsamer ab.

Vergleichbares war auch für Spezies 2 zu beobachten. Der Gehalt von Spezies 2 im Zellkulturmedium (bei der Behandlung der Zellen mit CFDA-Pt-Cl₂) geht nicht nur auf die Reaktion des CF(DA)-Pt-Cl₂ mit Bestandteilen des Zellkulturmediums (Methionin, Glutamin) zurück, sondern auch auf ausgeschleuste Metabolite von CF-Pt-Cl₂ aus den Zellen.

Darüber hinaus lässt sich Spezies 3 (Fluoreszenzrest ohne Platin) nur im Zellkulturmedium mit Zellen finden. Bei der Inkubation im Zellkulturmedium ohne Zellen ist diese Spezies, auch nach mehr als 24 Stunden Inkubation nicht zu finden. Das Vorhandensein des Fluoreszenzrestes ohne Platin in Gegenwart von Zellen deutet auf die Reaktion des Dichlorokomplexes mit der freien Thiolgruppe oder anderen reaktiven Gruppen hin und zeigt eine Metabolisierung des CF-Pt-Cl₂ durch die Zellen auf.

Diese Versuche konnten zeigen, dass CF-Pt-Cl₂ in die Zelle aufgenommen wird und intrazellulär gebildete Metabolite ins Medium abgegeben werden. Ob diese Abgabe aktiv oder passiv durch Diffusion durch die Zellmembran erfolgt, ist nicht eindeutig. Das unterschiedliche Verhältnis der Peaks zueinander im Zellysate bzw. im Zellkulturmedium sprechen gegen eine reine Diffusion. In der niedermolekularen Fraktion des Cytosols entfallen ca. 90 % der Fluoreszenz auf den Dichlorokomplex, im Zellkulturmedium nur ca. 30 %. Spezies 2 ist wiederum im Zellkulturmedium wesentlich ausgeprägter als in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols. Insbesondere die Deacetylierung des Fluoreszenzrestes und die damit einhergehende zusätzliche zweifach negative Ladung haben einen negativen Einfluss auf die Fähigkeit zur Diffusion durch die Zellmembran. Für die Reaktionen am Platinzentrum spielt der Grad der Deacetylierung keine Rolle.

4.7.4 Zeitlicher Verlauf der Verteilung von CF-Pt-Komplexen im Cytosol

Um den Zellen mehr Zeit für die Metabolisierung der CFDA-Pt-Cl₂ zu geben und der verzögerten Kinetik des Platins Rechnung zu tragen, wurden Zellen der sensitiven und resistenten Zelllinie wie beschrieben für zwei Stunden mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 µM) behandelt. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und frisches Medium ohne CFDA-Pt-Cl₂ zugegeben. Anschließend wurden je zwei Ansätze der sensitiven und der resistenten Zellen für 45 Minuten bzw. für eine, vier und zwölf Stunden weiterkultiviert. Im Anschluss erfolgte die Zellyse und Probenaufarbeitung.

Die Versuche zeigten, dass bereits nach 45 Minuten der Gehalt des Dichlorokomplexes in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols in den Zellen beider Zelllinien stark abnimmt aber auch nach zwölf Stunden immer noch nachweisbar ist (Abbildung 4.44). Über den untersuchten Zeitraum von 12 Stunden war eine exponentielle Abnahme für den Dichlorokomplex zu beobachten.

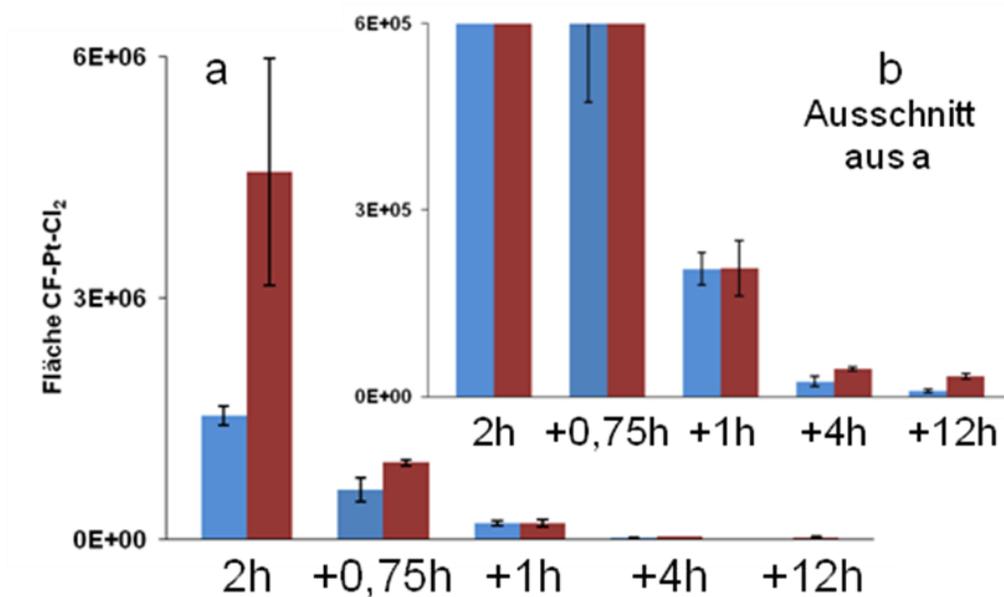


Abbildung 4.44: Vergleich des Gehaltes an CF-Pt-Cl₂ in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols einer Cisplatin-resistenten Zellen (blau) und Cisplatin-sensitiven Zellen (rot) nach einer zweistündigen Behandlung mit CFDA-Pt-Cl₂ und einer anschließenden Kultivierung der Zellen ohne CFDA-Pt-Cl₂ für 45 Minuten, eine, zwei, vier und zwölf Stunden.

Dies gilt auch für alle anderen fluoreszierenden Platinspezies und somit auch für die Gesamtfluoreszenz (Summe aller fluoreszierenden Spezies) in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols. Nur für Spezies 3 (Fluoreszenzrest ohne Platin) konnte eine Zunahme um den Faktor $1,7 \pm 0,3$ für die sensitive Zelllinie und den Faktor $2,0 \pm 0,1$ für die resistente Zelllinie festgestellt werden.

Auch nach anschließender vierstündiger Kulturdauer konnten keine neuen, bisher nicht detektierten, Metabolite des CF-Pt-Cl₂ in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols in den Zellen beider Zelllinien gefunden werden (Abbildung 4.45). Auch eine vermehrte Bildung des Komplexes mit Glutathion konnte nicht beobachtet werden. Die dominierende fluoreszierende Verbindung nach vier Stunden ist Spezies 3 - der Fluoreszenzrest ohne Platin. Auf diesen entfallen rund 61 % der Fluoreszenz in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols der Cisplatin-sensitiven Zellen und rund 48 % in den Cisplatin-resistenten Zellen.

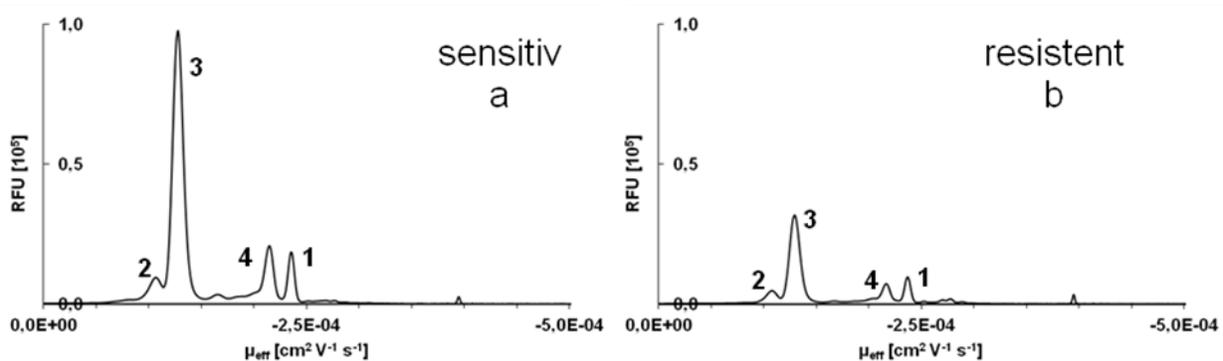


Abbildung 4.45: Elektropherogramme (CE-LIF) der niedermolekularen cytosolischen Fraktion von Zelllysaten, gewonnen aus einer mit CFDA-Pt-Cl₂ (25 μM) behandelten Cisplatin-sensitiven Zelllinie a) und einer Cisplatin-resistenten Zelllinie b). Die Behandlung erfolgte für zwei Stunden. Anschließend wurde das Zellkulturmedium gegen frisches, ohne CFDA-Pt-Cl₂, ausgetauscht. Die Zellyse erfolgte nach weiteren vier Stunden.

Zusammenfassend haben die Versuche zum zeitlichen Verlauf der Verteilung von CF-Pt-Komplexen in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols gezeigt, dass die in der zweistündigen Behandlungsphase mit CFDA-Pt-Cl₂ aufgenommenen bzw. durch

Metabolisierung oder Hydrolyse entstehenden CF-Platinkomplexe relativ schnell der niedermolekularen Fraktion des Cytosols wieder entzogen werden. Dies kann durch Ausschleusung aus den Zellen und Abgabe in das Zellkulturmedium erklärt werden oder aber die CF-Pt-Komplexe befinden sich in der hochmolekularen Fraktion des Cytosols.

Die Zunahme des Fluoreszenzrestes ohne Platin deutet auf eine fortschreitende Metabolisierung der CF-Pt-Komplexe und einem damit verbundenen Abgang des Fluoreszenzrestes, entsprechend der in Kapitel 4.5 beschriebenen Reaktion mit der Thiolgruppe oder weiteren reaktiven Gruppen, hin.

4.7.5 Zusammenfassung der Zellkulturversuche mit CFDA-Pt-Cl₂

Die Behandlung von Zellen der Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinie mit CFDA-Pt-Cl₂ zeigte, dass nach zwei Stunden der CF-Dichlorokomplex als (deacetylierte) Ausgangsverbindung die dominierende fluoreszierende Platinspezies (74,2 % ± 6,9 % für die sensitive Zelllinie und bei 71,0 % ± 5,9 % für die resistente Zelllinie) in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols ist. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Herman et. al mittels LC-ICP/MS für Cisplatin. Bei der Inkubation von Zelllysaten (ohne die Kernfraktion) zweier verschiedener Zelllinien mit Cisplatin entfielen nach zwei Stunden 47 % bzw. 53 % des Platins auf den nicht hydrolysierten bzw. metabolisierten Dichlorokomplex [155, 156]. Weiterhin konnten 40 % bzw. 28 % des Platins mit der hochmolekularen Fraktion assoziiert werden und nur 13 % bzw. 20 % des Platins wurden, als nicht genauer bestimmte Metabolite, in der niedermolekularen Fraktion lokalisiert. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass CF(DA)-Pt-Cl₂ und Cisplatin ein vergleichbares Verhalten im Cytosol aufweisen.

Für die Behandlung mit CFDA-Pt-Cl₂ lag der Anteil an hydrolysiertem bzw. metabolisiertem Dichlorokomplex in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols bei 15,3 % ± 2,7 % für die sensitive Zelllinie und bei 18,4 % ± 4,2 % für die resistente Zelllinie. Dieser Anteil an metabolisiertem CFDA-Pt-Cl₂ verteilt sich auf vier

verschiedene Spezies (2,2 % bis 6,9 %), die jeweils in beiden Zelllinien nachgewiesen wurden aber nicht direkt mittels CE-MS identifiziert werden konnten. Aufgrund der durch CE-LIF ermittelten Mobilitäten lassen sich jedoch mögliche Zuordnungen zu den in Modelversuchen untersuchten CF-Pt-Komplexen treffen.

Hinweise auf die durch die Hydrolyse (intrazelluläre Aktivierung von Cisplatin [17, 18, 19]) zurückgehenden Aqua-Komplexe des CF-Pt ($\mu_{\text{eff}}: 1,63 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) konnten nicht gefunden werden. Die Aqua-/Hydroxo-Komplexe des Cisplatins sind in Modellexperimenten gut untersucht [27, 157] und werden als die eigentlich pharmakologisch wirksame Spezies beschrieben, da der Dichlorokomplex nicht direkt mit den DNS-Basen reagiert [144, 158]. Ursächlich für das Fehlen dieser wichtigen Platinspezies im Cytosol könnte deren hohe Reaktivität sein. D.h. schon kurze Zeit nach der Bildung der Aqua-/Hydroxo-Komplexe reagieren diese mit intrazellulären Nukleophilen. Somit können auch keine nachweisbaren Gehalte gebildet werden. Dementsprechend konnten auch Gibson et al. bei der Inkubation von Zellextrakten, der auch in dieser Arbeit verwendeten resistenten und sensitiven Zelllinien, mit Cisplatin keine Aqua- bzw. Hydroxo-Komplexe nachweisen [52].

Als ein wichtiger intrazellulärer Bindungspartner wurde Glutathion beschrieben und in vielen Modellversuchen hinsichtlich der Komplexbildung mit Cisplatin untersucht [29, 142, 143]. Bezüglich der tatsächlichen intrazellulären Bindung von Glutathion an Cisplatin wird über unterschiedliche Ergebnisse berichtet. Ishikawa et al. konnten zeigen das nach 12 Stunden rund 60 % des intrazellulären Platins als Komplex mit zwei Glutathion-Molekülen vorliegt [130]. Kasherman et. al konnten hingegen bei der Inkubation eines Zellextraktes mit Cisplatin keine Addukte mit Glutathion finden. Rund zwei Drittel der gefundenen Platinaddukte hatten dabei ein Molekulargewicht über 3 kDa. Erst bei der Inkubation der niedermolekularen Fraktion des Zellextraktes (< 3 kDa), konnten Addukte von Platin und Glutathion nachgewiesen werden [32]. Die Behandlung von Zellen der Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinie mit CFDA-Pt-Cl₂ zeigte, dass nach zwei Stunden 3,4 % des CF-Pt in der niedermolekularen

Fraktion der sensitiven Zellen als Komplex mit Glutathion vorliegt. In den resistenten Zellen beträgt dieser Anteil 6,4 %. Da die Reaktion von CFDA-Pt-Cl₂ mit Glutathion zu einem Abgang des Fluoreszenzrestes führt (siehe Kapitel 4.5.1), dürfte der tatsächliche Anteil etwas größer ausfallen. Unter der Annahme, dass der Fluoreszenzrest ohne Platin nur auf die Reaktion mit Glutathion zurück geht, läge der Anteil von CF-Pt als Komplex mit Glutathion bei 8,9 % ± 1,2 % in den sensitiven Zellen bzw. 12,1 % ± 2,6 %. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Fluoreszenzrest ohne Platin auch auf die Reaktion mit anderen reaktiven Gruppen zurück geht, stellen diese Werte nur ein mögliches Maximum dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass Platinaddukte mit Glutathion, wie beschrieben und in Hinsicht auf die intrazelluläre Konzentration von Glutathion auch zu erwarten, nachweisbar sind, aber nicht den überwiegenden Teil der Platinspezies in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols ausmachen.

Konkrete Hinweise auf Komplexe des CF-Pt mit möglichen Abbauprodukten des Glutathion konnten nicht gefunden werden. Intrazellulär können die Glutathionkonjugate weiter metabolisiert werden. Nach Abspaltung des Glutamats und der anschließenden Abspaltung des Glycins wird das Stickstoffatom in α -Aminoposition des zurückbleibenden Cysteins acetyliert [159]. Insbesondere N-Acetylcystein zeigte jedoch bei der Reaktion mit CFDA-Pt-Cl₂ eine hohe Reaktivität und in der Folge einen fast vollständigen Abgang des Fluoreszenzrestes (Kapitel 4.5.1). Darüber hinaus ist für Cysteinglycin eine zehnfach höhere Affinität zum Cisplatin berichtet worden als für Glutathion [160].

Auch wenn den Zellen mehr Zeit für die Metabolisierung (über die zweistündiger Behandlungszeit hinaus) gegeben wurde, konnten keine weiteren (neuen) CF-Pt-Metabolite nachgewiesen werden. Der Gehalt des Dichlorokomplexes in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols in den Zellen beider Zelllinien sank bereits nach 45 Minuten stark ab, war aber auch nach zwölf Stunden immer noch nachweisbar.

Eine Frage, die auch nach einer mehr als 30-jährigen Anwendung von Cisplatin als Chemotherapeutikum noch nicht befriedigend beantwortet ist, lautet: Wie gelangt das Platin durch das Cytosol, mit einer Vielzahl von potentiellen Bindungspartnern, an den postulierten Wirkort im Zellkern [39]? Ausgehend von der beschriebenen (auch zeitlichen) Verteilung der CF-Pt-Komplexe in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols wäre eine mögliche Erklärung, dass das Platin als Dichlorokomplex in den Zellkern gelangt und erst dort die Hydrolyse stattfindet. Die Hydrolyseprodukte sind im Cytosol nicht nachweisbar [52], der Dichlorokomplex jedoch bis zu mehreren Stunden nach Ende der Behandlung [156]. Nicht auszuschließen ist aber auch, dass Platinaddukte mit cytosolischen Bestandteilen in den Zellkern gelangen und es dort zu einem erneuten Ligandenaustausch mit der Bildung von Platin-DNS-Addukten kommt.

Eine weitere Frage ist die nach dem Verbleib des intrazellulären Platins. Zayeda et al. konnten zeigen, dass nur rund 9 % des intrazellulären Platins im Zellkern nachzuweisen ist und die überwiegende Mehrheit des intrazellulären Platins (rund 70 %) im Cytosol zu finden ist [28]. Die Versuche mit CFDA-Pt-Cl₂ führten zu dem Ergebnis, dass sich in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols nur wenige CF-Pt-Metabolite finden und der anfänglich hohe Gehalt des Dichlorokomplexes bereits nach 45 Minuten stark abnimmt. Im Zusammenhang mit der Probenstabilität (Kapitel 4.6.3) konnte insbesondere für den Dichlorokomplex eine hohe Affinität zu den Proteinen festgestellt werden.

Durch Arbeiten eines Kooperationspartners konnte, unter Verwendung derselben Zelllinien und identisch aufgereinigtem CFDA-Pt-Cl₂, die Bindung von CF-Pt an cytosolische Proteine beobachtet werden. Mittels 2D-Gelelektrophorese wurde in der hochmolekularen Fraktion des Cytosols eine Vielzahl fluoreszierender Signale detektiert. Die intensivsten Signale lagen zwischen 50 und 75 kDa [154]. Eine Identifizierung mit ESI-MS/MS erfolgte für die folgenden Proteine: PDIA1, PDIA3, PDIA6 und GRP78.

Auch für Cisplatin wird über die Bindung an Proteine berichtet. In Proteinen stellen die zahlreichen schwefel-, sauerstoff- und stickstoffhaltigen Gruppen geeignete Liganden für Platinspezies dar. Die Bildung von Chelatkomplexen kann eine Stabilisierung der Addukte unterstützen [12, 153]. Die Komplexbildung von Cisplatin ist für eine Vielzahl verschiedener Proteine beschrieben, unter anderem für Serum-Albumin [161], Ubiquitin [162], Transferrin [163] und Cytochrom C [164]. Neben der Komplexbildung von Platin durch Proteine ist auch die Abspaltung einzelner Peptide aus Proteinen durch Platinspezies beschrieben [138, 165].

Zusätzlich zu diesen einfachen Modellversuchen konnten Kasherman et. al bei der Inkubation eines Zellextraktes mit Cisplatin zeigen, dass rund zwei Drittel der gefundenen Platinaddukte ein Molekulargewicht über 3 kDa besitzen [32]. Ebenfalls bei der Inkubation eines Zellextraktes mit Cisplatin konnten Hermann et al. nach zwei Stunden 40 % des Platins in der hochmolekularen Fraktion nachweisen [156].

Diese Ergebnisse betonen zum einen die Bedeutung der Proteine als intrazelluläre Bindungspartner des Platins und liefern zum anderen eine mögliche Erklärung für den Verbleib des CF-Pt-Cl₂, das nach Bindung an die Proteine nicht mehr in der niedermolekularen Fraktion nachzuweisen ist. Die Proteine stellen somit wichtige intrazelluläre Bindungspartner dar, die ggf. zur Entstehung von Resistenzen beitragen oder auch Ursache für die zum Teil schweren Nebenwirkungen der Platinkomplexe sind. Auf die pharmakologisch wichtige Bindung an die DNS haben die Proteine eine negative Auswirkung, indem den Gehalt an freiem Cisplatin verringern. Darüber hinaus konnte aber auch eine Abgabe von intrazellulären CF-Pt-Metaboliten an das Zellkulturmedium nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der Verteilung von CF-Pt-Komplexen in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols der Cisplatin-sensitiven und der Cisplatin-resistenten Zelllinie konnten keine Hinweise auf unterschiedliche Hydrolyse- oder Metabolisierungsreaktionen gefunden werden. Für beide Zelllinien konnten die gleichen Metabolite nachgewiesen

werden. Bei Normierung auf den Proteingehalt konnte in den sensitiven Zellen ein signifikant höherer Gehalt an CF-Pt-Cl₂ nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis auf Unterschiede hinsichtlich des Influx bzw. Efflux des Dichlorokomplexes. Für Cisplatin konnte die verminderte Expression des Kupfertransportes CTR 1, der auch eine Rolle bei der Aufnahme von Cisplatin spielt, mit einer geringeren intrazellulären Konzentration von Cisplatin und einer verminderten Platinierung der DNS assoziiert werden [166].

Wie die beschriebenen Ergebnisse zeigen, bieten das Modell CFDA-Pt-Cl₂ als fluoreszierendes Cisplatin-Analogon eine sehr gute Möglichkeit das Verhalten von Cisplatin im Cytosol zu untersuchen. Ein wesentlicher Vorteil des CFDA-Pt-Cl₂ ist die Möglichkeit die gebildeten Metabolite über deren Fluoreszenz zu detektieren. Dies erlaubt somit einen sensitiven Nachweis [74, 75]. Die Komplex- bzw. Bindungsverhältnisse im CFDA-Pt-Cl₂ und Cisplatin sind vergleichbar aber nicht identisch, da der Fluoreszenzrest im CFDA-Pt-Cl₂ über zwei Aminogruppen als Chelatligand gebunden ist und damit eine Stabilisierung erfährt. Trotzdem kann es bei der Reaktion mit sehr reaktiven Liganden zu einem Abgang des Fluoreszenzliganden und somit zum Verlust der Fluoreszenzstruktur kommen. Dies stellt einen wichtigen Nachteil des Modell CFDA-Pt-Cl₂.

Das in Kapitel 4.5.2 vorgestellte fluoreszierende Oxaliplatin-Analogon CFDA-OxPt (Abbildung 4.24) ist in Bezug auf den Fluoreszenzrest ein besser geeignetes Analogon als CFDA-Pt-Cl₂ für Cisplatin, da im Oxaliplatin der 1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand ebenfalls einen zweizähligen Liganden darstellt. Ein Abgang des Fluoreszenzrestes war auch bei der Reaktion mit reaktiven Liganden nur marginal zu beobachten. Ein Einsatz von CFDA-OxPt im entwickelten optimierten Arbeitsablauf könnte somit weitere wertvolle Hinweise über das Verhalten von Platin im Cytosol liefern.

4.8 Einfluss von Cisplatin auf das Redoxverhalten schwefelhaltiger Liganden

Die Schwierigkeit der Identifizierung relevanter intrazellulärer Platinspezies geht zum einen auf die zum Teil hohen Reaktivitäten und die komplexe Koordinationschemie der Platinspezies und zum anderen auf die Gegenwart einer Vielzahl möglicher nieder- und hochmolekularer Liganden zurück. Darüber hinaus sind Platinspezies aber auch redox-aktiv. Im Cisplatin befindet sich das Platin in der Oxidationsstufe II und kann zum Platin(IV) oxidiert werden [167]. Von Bedeutung ist aber auch die Reduktion von Platin(IV)-Prodrugs zum tatsächlich zytotoxisch wirksamen Platin(II) [168, 169]. Insbesondere schwefelhaltige Verbindungen können hier nicht nur als Liganden, sondern auch als Redoxpartner zu einer Vielfalt von intrazellulären Platinspezies beitragen. In diesem Zusammenhang ist vor allem Glutathion, aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration, ein wichtiges Beispiel und stellt mit seiner Thiolgruppe einen guten Liganden für Platin dar. Darüber hinaus kann es aber auch, unter Bildung des Dimers (GSSG), oxidiert werden und somit stabilisierend auf Platin(II)-Spezies wirken.

Anlehnend an dieses Beispiel, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Redoxchemie des Schwefels, insbesondere in Gegenwart von redox-aktiven Metallspezies sehr komplex sein kann [103, 104, 106]. Die Oxidation der Thiolgruppe läuft dabei nicht direkt ab und führt nicht ausschließlich zum Disulfid sondern kann auch die Bildung von Sulfen-, Sulfin- und Sulfonsäure bzw. Thiosulfinaten, Thiosulfonaten, Sulfenamiden und anderen Spezies zur Folge haben [105]. Viele dieser Spezies sind sehr labil, kurzlebig und stellen Intermediate dar, spielen aber trotzdem eine wichtige biochemische Rolle. Darüber hinaus könnten Thiol-Disulfid-Paare auch eine Funktion als molekulare Schalter haben, insbesondere in Gegenwart von redox-aktiven Metallspezies [170, 171].

Berücksichtigt man diese Ergebnisse, so ist die Metabolisierung von Cisplatin vermutlich komplexer als bereits erwartet und könnte auch über instabile Komplexe mit (labilen) Zwischenstufen der Thioloxydation laufen. Dies macht analytische Konzepte nötig, um auch kurzlebige, labile Zwischenprodukte zu erfassen.

Die direkte Verbindung von Elektrochemie und Massenspektrometrie ist eine einfach aufgebaute und robuste Methodik und liefert zwei verschiedene Arten von Messergebnissen. Zum einen können elektrochemische Daten gewonnen werden, d.h. Spannung und Stromstärke als Funktion der Zeit geben Aufschluss über die an der Arbeitselektrode ablaufenden elektrochemischen Reaktionen. Zum anderen können durch den hydrodynamischen Transport der Reaktionslösung aus der elektrochemischen Zelle in das Massenspektrometer auch kontinuierlich die gebildeten Produkte identifiziert werden. Elektrochemische und massenspektrometrische Daten zusammen ermöglichen einen vielseitigen Einblick in die ablaufenden Redoxprozesse.

Um den Einfluss von Cisplatin auf das Redoxverhalten von Cystein, N-Acetylcystein, Glutathion und Methionin zu untersuchen, wurden die vier schwefelhaltigen Verbindungen (10 μM) in Gegenwart und Abwesenheit von Cisplatin elektrochemisch oxidiert, indem das Potential mit einer Scanrate von $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ zwischen 0 V und 1,5 V (und zurück auf 0 V) variiert wurde. Alle vier ausgewählten Substanzen sind als Bindungspartner des Cisplatins beschrieben. Glutathion ist eine wichtige Möglichkeit der intrazellulären Inaktivierung von Cisplatin [30, 31]. Die Bindung an Methionin und Cystein spielt insbesondere in Proteinen eine bedeutende Rolle [35, 33]. N-Acetylcystein stellt zum einen ein Abbauprodukt des Glutathion dar und wird zum anderen, bei gleichzeitiger Applikation mit Cisplatin, mit einem protektiven Effekt bezüglich der Nebenwirkungen von Cisplatin assoziiert [146, 172].

In Abbildung 4.46 sind die aus diesen Messungen hervorgegangenen zyklischen Voltammogramme der vier Verbindungen in Abwesenheit von Cisplatin (durchgezogene Linie) und in Anwesenheit von Cisplatin (gestrichelte Linie) dargestellt. Daraus ist zu

erkennen, dass der Beginn der Oxidation für die drei Thiole, zwischen 600 und 700 mV, in einem ähnlichen Spannungsbereich liegt. Die Oxidation von Methionin beginnt erst bei einer Spannung von über 900 mV und zeigt damit, dass der Thioether schwerer zu oxidieren ist, als die Thiolgruppe [103].

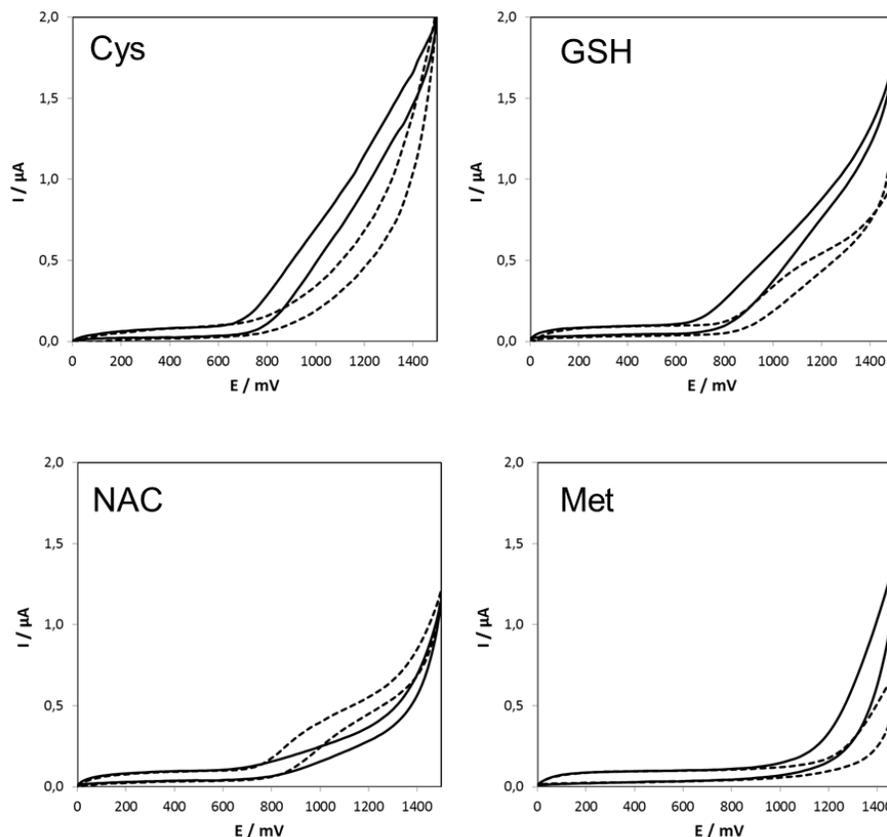


Abbildung 4.46: Zyklische Voltammogramme der vier untersuchten Liganden in Gegenwart und Abwesenheit von Cisplatin: Die durchgezogenen Linien zeigen den reinen Liganden (10 μM) und die gestrichelten Linien den Liganden (10 μM) plus Cisplatin (5 μM). NAC: N-Acetylcystein, GSH: Glutathion, Met: Methionin. Scan Rate: 20 mV s^{-1} , Flussrate: 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Weiterhin ist zu erkennen, dass der maximale Oxidationsstrom (I_{max} bei 1,5 V) für die drei Thiole deutlich unterschiedlich ist und von 2 μA für Cystein über 1,7 μA für Glutathion auf 1,2 μA für N-Acetylcystein abnimmt. Diese Beobachtung deckt sich mit den beschriebenen Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation über Wasserstoffperoxid der drei Thiole: 2,9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Cystein, 0,9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Glutathion und

$0,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für N-Acetylcystein [105]. Der Reaktivitätsunterschied der Thiole geht auf die unterschiedlichen pK_s -Werte zurück (8,3 für Cystein, 8,8 für Glutathion und 9,5 für N-Acetylcystein [105]) und den resultierenden verschiedenen Anteilen an freiem Thiolat bei pH 7,4 als Ausgangspunkt für die Oxidation [173]. Die geschilderten Beobachtungen waren zu erwarten und stimmen mit der Literatur überein.

Die Gegenwart von Cisplatin beeinflusst die Oxidation bei allen vier untersuchten Verbindungen. Für Cystein, Glutathion und Methionin ist dabei eine Abnahme des Oxidationsstroms zu beobachten und lässt sich durch eine Bindung zwischen Platin und Schwefel erklären, in dessen Folge die Reaktivität des Schwefels abnimmt. Für N-Acetylcystein ist jedoch eine Zunahme des Oxidationsstroms in Gegenwart von Cisplatin zu beobachten. Dies steht im Kontrast zu den oben beschriebenen Geschwindigkeitskonstanten bezüglich der Oxidation über Wasserstoffperoxid, aus denen hervorgeht, dass die Thiolgruppe im N-Acetylcystein am wenigsten oxidationsfreudig ist. Eine Erklärung hierfür könnte in einer, im Vergleich zu Glutathion und Cystein, unterschiedlichen Wechselwirkung der Thiolgruppe mit dem Platin liegen bzw. in einem unterschiedlichen kinetischen Verlauf. Bei der Reaktion von CFDA-Pt-Cl₂ mit diesen drei Verbindungen zeigte sich N-Acetylcystein als am reaktivsten. Dabei war neben dem Abgang der Chloroliganden auch ein Abgang des Fluoreszenzrestes, der über zwei Aminogruppen an das Platin gebunden ist, zu beobachten.

Der Einfluss von Cisplatin auf die Oxidation der vier schwefelhaltigen Verbindungen zeigte sich nicht nur in den elektrochemischen Messergebnissen, sondern auch in Quantität der gebildeten Oxidationsprodukte. Abbildung 4.47a und b zeigen den Vergleich der maximalen Intensitäten der gebildeten Oxidationsprodukte der vier Verbindungen (10 μM) in Gegenwart und Abwesenheit von Cisplatin (5 μM). Die gezeigten maximalen Intensitäten der verschiedenen Intermediate stellen die Mittelwerte aus drei verschiedenen Messungen dar. Zusätzlich sind auch die jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.

Aus Abbildung 4.47a und b ist zu erkennen, dass die schrittweise Oxidation der Thiole im Cystein und Glutathion zu der entsprechenden Sulfen-, Sulfin- und Sulfonsäure durch die Anwesenheit von Cisplatin vermindert wird. Für N-Acetylcystein dagegen ist die Bildung dieser drei Spezies stark erhöht.

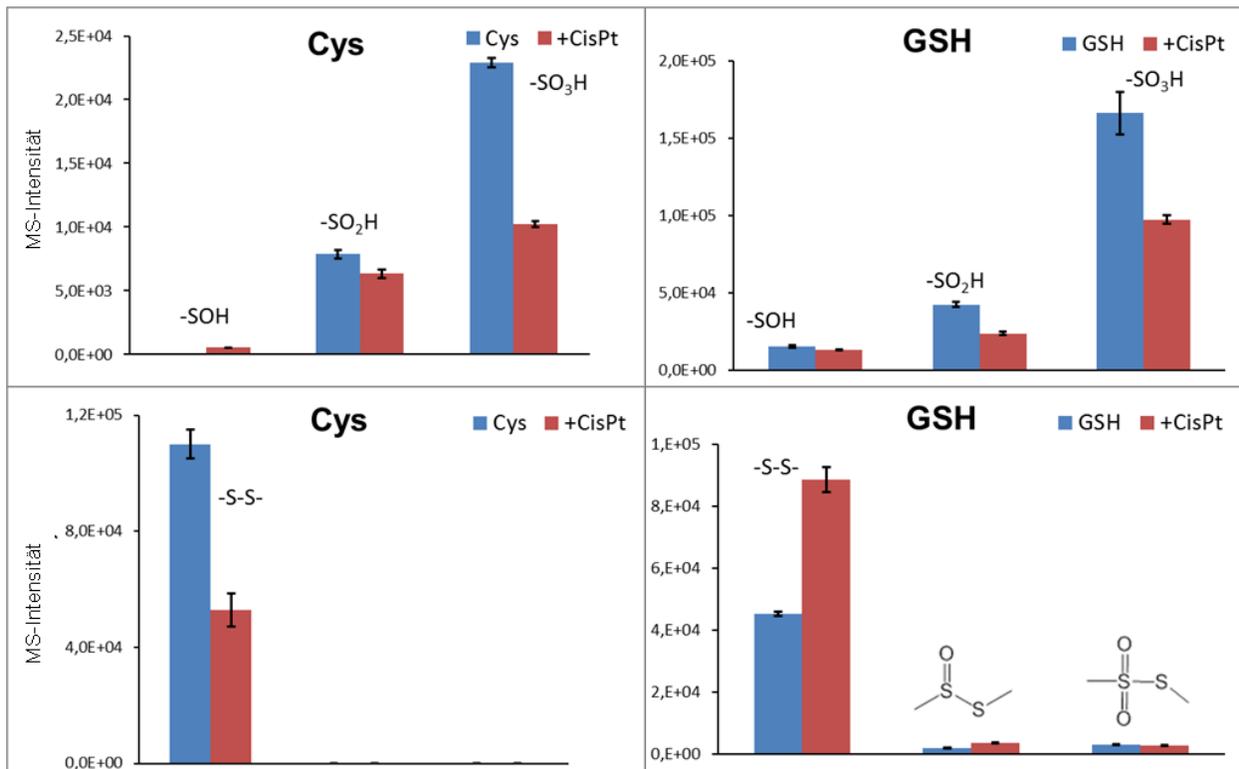


Abbildung 4.47a: Maximale Intensitäten der elektrochemisch gebildeten Metaboliten von Cystein (Cys) und Glutathion (GSH) in Abwesenheit (blau) und Gegenwart (rot) von Cisplatin (CisPt)

Auch der Einfluss von Cisplatin auf die Bildung der Disulfide und der daraus hervorgehenden Thiosulfinate und Thiosulfonate ist nicht für alle Verbindungen gleich. Für Glutathion ist eine vermehrte Bildung des Disulfids (GSSG) zu beobachten, wohingegen für Cystein und N-Acetylcystein eine verringerte Bildung in Gegenwart von Cisplatin zu verzeichnen ist. Für Methionin nimmt die Bildung aller Oxidationsprodukte in Gegenwart von Cisplatin ab.

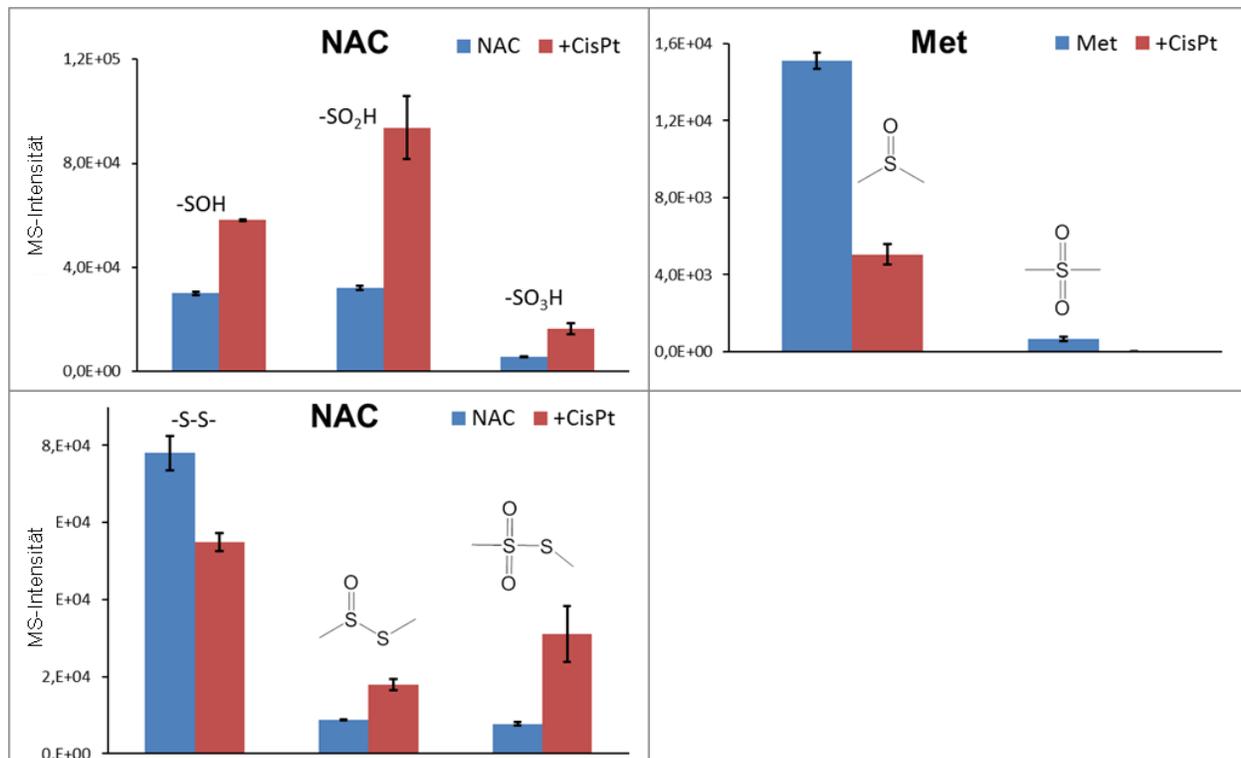


Abbildung 4.47b: Maximale Intensitäten der elektrochemisch gebildeten Metaboliten von N-Acetylcystein (NAC) und Methionin (Met) in Abwesenheit (blau) und Gegenwart (rot) von Cisplatin (CisPt)

Die Bildung der Thiosulfinate bzw. der Thiosulfonate war am stärksten bei N-Acetylcystein gefolgt von Glutathion zu beobachten. Für Cystein war keine Bildung zu erkennen. Dies entspricht der umgedrehten Reihenfolge der oben beschriebenen Reaktivitäten der drei Thiole und war so nicht erwartet. Zu beachten ist bezüglich der Bildung der Thiosulfinate, dass diese nicht nur über die weitere Oxidation der Disulfide abläuft sondern auch über die Reaktion von zwei Sulfensäuremolekülen [105]:



Diese Reaktion läuft aber nur dann begünstigt ab, wenn die Sulfensäure nicht zu reaktiv ist und somit ausreichend Sulfensäure als Edukt vorhanden ist. Für N-Acetylcystein scheint dies der Fall zu sein. Durch die Gegenwart von Cisplatin wird die Bildung der Thiosulfinate bzw. der Thiosulfonate für N-Acetylcystein noch verstärkt. Dies könnte auf

eine Stabilisierung (durch Komplexierung) der Sulfensäure oder der Thiosulfinate bzw. der Thiosulfonate durch das Platin zurückgehen. Entsprechende Addukte wurden nicht detektiert. Die erhöhte Bildung aller Oxidationsprodukte des N-Acetylcysteins durch Cisplatin erklärt somit auch den höheren Oxidationsstrom bei N-Acetylcystein in Gegenwart von Cisplatin (Abbildung 4.46).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Cisplatin einen signifikanten Einfluss auf die Oxidation aller vier untersuchten schwefelhaltigen Verbindungen hat. Die gefundenen Unterschiede waren nicht nur quantitative Effekte sondern deuten auch daraufhin, dass die Wechselwirkung mit Cisplatin die Oxidation der vier Verbindungen in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Unterschied der Reaktivität der drei Thiole nur eine Zehnerpotenz beträgt und der Unterschied für Thiolgruppen in Proteinen sich aber über acht Zehnerpotenzen erstreckt [105], ist zu erwarten, dass der Einfluss von Cisplatin auf die Oxidation von Proteinen noch stärker ausgeprägt ist.

5. Zusammenfassung

Platinhaltige Zytostatika, wie z. B. Cisplatin, werden *in vivo* durch eine Reihe von (bio-) chemischen Reaktionen verändert und metabolisiert. Die wichtigsten Prozesse dabei sind die intrazelluläre Hydrolyse und die Reaktion mit kleineren Nukleophilen oder Proteinen. Bezüglich des Verhaltens von Platinkomplexen im Cytosol sind einige Fragen weiterhin nur unbefriedigend geklärt, insbesondere hinsichtlich der Art und Bedeutung von Addukten des Platins mit intrazellulären Bindungspartnern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Cisplatinanalogons CFDA-Pt-Cl₂ das Verhalten von Platinkomplexen im niedermolekularen Bereich des Cytosols einer Cisplatin-sensitiven und einer Cisplatin-resistenten Krebszelllinie untersucht. Die hierfür entwickelten und optimierten kapillarelektrophoretischen Trennmethode erlauben es, niedermolekulare Platinspezies durch die Detektion der Fluoreszenz (CE-LIF) mit kurzen Analysenzeiten (unter fünf Minuten) empfindlich (pmol/L) und reproduzierbar nachzuweisen und zu quantifizieren und mittels Massenspektrometrie (CE-MS) zu identifizieren. Durch Kontroll- bzw. Modellversuche wurde die Reinheit des verwendeten CFDA-Pt-Cl₂ sowie die Stabilität und Integrität der Zellkulturproben sichergestellt, die gesamte Probenvorbereitung optimiert und aufgezeigt, dass CFDA-Pt-Cl₂ vergleichbare Komplexe, u.a. mit Glutathion, Cystein, Methionin, bildet wie Cisplatin. Die Behandlung von Zellen beider Zelllinien mit CFDA-Pt-Cl₂ zeigte, dass der Dichlorokomplex die dominierende Platinspezies (über 70 %) in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols ist. Eine Metabolisierung bzw. Hydrolyse des Dichlorokomplexes war nur teilweise und für beide Zelllinien in vergleichbarer Art und Weise zu beobachten. Unterschiede zwischen der Cisplatin-sensitiven und der Cisplatin-resistenten Krebszelllinie konnte bezüglich des Gehaltes an Platinspezies beobachtet werden. Bei Normierung auf den Proteingehalt konnte in den sensitiven Zellen ein höherer Gehalt an Platinspezies in der niedermolekularen Fraktion des Cytosols nachgewiesen werden als in den Zellen der resistenten Zelllinie.

6. Summary

Pt-based chemotherapeutic agents, such as cisplatin, are known to undergo several (bio-) chemical transformation steps after administration. Intracellular hydrolysis and ligand exchange or adduct formation with small nucleophiles and larger proteins are their most relevant reactions on the way to the final target (DNA), but there are still many open questions regarding the identity and pharmacological relevance of various proposed adducts and intermediates of cisplatin in the cytosol.

In the present work the cellular interactions of platinum complexes were studied by using the fluorescent cisplatin analogue CFDA-Pt-Cl₂. Cells of an ovarian cisplatin-sensitive cell line and its cisplatin-resistant variant were treated with CFDA-Pt-Cl₂ and the low molecular fraction of the cytosol were analyzed by capillary zone electrophoresis. The developed and optimized methods enable a very sensitive (pmol/L) and accurate analysis of low molecular mass Pt species, involving a fast CE-LIF detection within 5 min and identification by CE-MS. Control and further model experiments ensure the purity of the CFDA-Pt-Cl₂ as well as the stability and the integrity of the cell culture samples. The whole sample preparation was optimized and CFDA-Pt-Cl₂ was checked for forming similar adducts as Cisplatin.

After treating cells of both cell line with CFDA-Pt-Cl₂ the di-chloro complex represented the predominant platin compound (70 %) in the low molecular fraction of the cytosol. Hydrolysis, ligand exchange or adduct formation was only observed for the minor part and occurred in both cell lines in a similar manner. Differences between both cell lines appeared regarding the platin levels. Normalized to the protein content higher levels of platin compounds were observed in the low molecular fraction of the cytosol in cells of the cisplatin-sensitive cell line.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Rosenberg B, Renshaw E, Vancamp L, Hartwick J, Drobnik J: **Platinum-induced filamentous growth in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1967, 93(2):716-21.
- [2] Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ: **The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes.** *J Biol Chem* 1967; 25;242(6):1347-52
- [3] Rosenberg B: **Platinum complexes for the treatment of cancer.** *Interdiscip Sci Rev* 1978; 3:134-147
- [4] Kelland L: **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.** *Nat Rev Cancer* 2007; 7(8):573-84
- [5] Wong E, Giandomenico CM: **Current status of platinum-based antitumor drugs.** *Chem Rev* 1999; 8;99(9):2451-66
- [6] Klein AV, Hambley TW: **Platinum drug distribution in cancer cells and tumors.** *Chem Rev* 2009; 109(10):4911-20
- [7] Wang D, Lippard SJ: **Cellular processing of platinum anticancer drugs.** *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(4):307-20
- [8] Bukowska B, Gajek A, Marczak A: **Two drugs are better than one. A short history of combined therapy of ovarian cancer.** *Contemp Oncol* 2015; 19(5):350-3
- [9] Reedijk J: **Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design.** *Eur J Inorg Chem* 2009; 1303-1312
- [10] Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E: **Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review.** *Clin Cancer Res* 2000; 6(4):1205-18
- [11] Sooriyaarachchi M, Narendran A, Gailer J: **Comparative hydrolysis and plasma protein binding of cisplatin and carboplatin in human plasma in vitro.** *Metallomics* 2011; 3(1):49-55
- [12] Arnesano F, N Giovanni: **“Platinum on the road”: Interactions of antitumoral cisplatin with proteins.** *Pure Appl Chem* 2008; 80(12):2715–2725

- [13] Dasari S, Tchounwou PB: **Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action.** *Eur J Pharmacol* 2014; 5;740:364-78
- [14] Eljack ND, Ma HY, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ, Friedrich T, Clarke RJ: **Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin.** *Metallomics* 2014; 6(11):2126-33
- [15] Huang CP, Fofana M, Chan J, Chang CJ, Howell SB: **Copper transporter 2 regulates intracellular copper and sensitivity to cisplatin.** *Metallomics* 2014; 6(3):654-61
- [16] Gately DP, Howell SB: **Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review.** *Br J Cancer* 1993; 67(6):1171-6
- [17] Davies MS, Berners-Price SJ, Hambley TW: **Rates of platination of -AG- and -GA- containing double-stranded oligonucleotides: effect of chloride concentration.** *J Inorg Biochem* 2000; 79(1-4):167-72
- [18] Arnesano F, Natile G: **Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA.** *Coordination Chemistry Reviews* 2009; 253:2070–2081
- [19] Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM: **The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48:495-535
- [20] Yu F, Megyesi J, Price PM: **Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(1):F44-52
- [21] Centerwall CR, Tacka KA, Kerwood DJ, Goodisman J, Toms BB, Dubowy RL, Dabrowiak JC: **Modification and uptake of a cisplatin carbonato complex by Jurkat cells.** *Mol Pharmacol* 2006; 70(1):348-55
- [22] Tan CP, Lu YY, Ji LN, Mao ZW: **Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds.** *Metallomics* 2014; 6(5):978-95
- [23] Gibson D: **The mechanism of action of platinum anticancer agents: What do we really know about it?** *Dalton Trans* 2009; (48):10681-9

- [24] Ziehe M, Esteban-Fernández D, Hochkirch U, Thomale J, Linscheid MW: **On the complexity and dynamics of in vivo Cisplatin-DNA adduct formation using HPLC/ICP-MS.** *Metallomics* 2012; 4(10):1098-104
- [25] Eastman A: **The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes.** *Pharmacol Ther* 1987; 34(2):155-66
- [26] Long DF, Repta AJ: **Cisplatin: chemistry, distribution and biotransformation.** *Biopharm Drug Dispos* 1981; 2(1):1-16
- [27] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM: **Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity.** *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7(1):3-18
- [28] Zayeda A, Shoeiba T, Taylor SE, Jones GDD, Thomas AL, Wood JP, Reid HJ, Sharpa BL: **Determination of Pt-DNA adducts and the sub-cellular distribution of Pt in human cancer cell lines and the leukocytes of cancer patients, following mono- or combination treatments, by inductively-coupled plasma mass spectrometry.** *International Journal of Mass Spectrometry* 2007; 307(1-3):70-78
- [29] Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG: **Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds.** *Cancer Res* 1992; 52(24):6885-9
- [30] Ishikawa T, Ali-Osman F: **Glutathione-associated cis-diamminedichloro-platinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells.** *J Biol Chem* 1993; 268:20116-25
- [31] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF: **The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.** *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8):1499-503
- [32] Kasherman Y, Sturup S, Gibson D: **Is glutathione the major cellular target of cisplatin? study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts.** *J Med Chem* 2009; 52:4319-28

- [33] Hagrman D, Goodisman J, Dabrowiak JC, Souid AK: **Kinetic study on the reaction of cisplatin with metallothionein.** *Drug Metab Dispos* 2003; 31(7):916-23
- [34] Brauckmann C, Wehe CA, Kieshauer M, Lanvers-Kaminsky C, Sperling M, Karst U: **The interaction of platinum-based drugs with native biologically relevant proteins.** *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(6):1855-64
- [35] Sze CM, Khairallah GN, Xiao Z, Donnelly PS, O'Hair RA, Wedd AG: **Interaction of cisplatin and analogues with a Met-rich protein site.** *J Biol Inorg Chem* 2009; 14(2):163-5
- [36] Heudi O, Cailleux A, Allain P: **Kinetic studies of the reactivity between cisplatin and its monoquo species with L-methionine.** *J Inorg Biochem* 1998; 71:61-69
- [37] el-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton AM: **Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques.** *J Inorg Biochem* 1999; 77(1-2):13-21
- [38] Miao R, Yang G, Miao Y, Mei Y, Hong J, Zhao C, Zhu L: **Interactions of platinum(II) complexes with sulfur-containing peptides studied by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19(8):1031-40
- [39] Reedijk J: **Why does Cisplatin reach Guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell?** *Chem Rev* 1999; 99(9):2499-510
- [40] Jacobsen C, Honecker F: **Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms.** *Andrology* 2015; 3(1):111-21
- [41] Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G: **Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future.** *Cell Death Dis* 2014; 5:e1257
- [42] Lu HP, Chao CC: **Cancer cells acquire resistance to anticancer drugs: an update.** *Biomed J* 2012; 35(6):464-72

- [43] Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y: **Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53(1):3-11
- [44] Safaei R: **Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs.** *Cancer Lett* 2006; 8;234(1):34-9
- [45] Garmann D, Warnecke A, Kalayda GV, Kratz F, Jaehde U: **Cellular accumulation and cytotoxicity of macromolecular platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells.** *J Control Release* 2008; 21;131(2):100-6
- [46] Chen G, Hutter KJ, Zeller WJ: **Positive correlation between cellular glutathione and acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells.** *Cell Biol Toxicol* 1995; 11:273-81
- [47] Still BM, Kumar PGA, Aldrich-Wrighta JR, Price W: **¹⁹⁵Pt NMR - theory and application.** *Chem Soc Rev* 2007; 36:665-686
- [48] Pregosin PS: **Platinum-195 nuclear magnetic resonance.** *Coord Chem Rev* 1982; 44(2):247–291
- [49] Wexselblatt E, Yavin E, Gibson D: **Cellular interactions of platinum drugs.** *Inorg Chim Acta* 2012; 393:75-83
- [50] Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ: **Cisplatin binding sites on human albumin.** *J Biol Chem* 1998; 273(24):14721-30
- [51] Berners-Price SJ, Corazza A, Guo Z, Barnham KJ, Sadler PJ, Ohyama Y, Leng M, Locker D: **Structural transitions of a GG-platinated DNA duplex induced by pH, temperature and box A of high-mobility-group protein 1.** *Eur J Biochem* 1997; 243(3):782-91
- [52] Gibson D: **The mechanism of action of platinum anticancer agents - what do we really know about it?** *Dalton Trans* 2009; (48):10681-9
- [53] Motzer RJ, Reed E, Perera F, Tang D, Shamkhani H, Poirier MC, Tsai WY, Parker RJ, Bosl GJ: **Platinum-DNA adducts assayed in leukocytes of patients with germ cell tumors measured by atomic absorbance spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay.** *Cancer* 1994; 73(11):2843-52

- [54] Verschraagen M, van der Born K, Zwijs TH, van der Vijgh WJ: **Simultaneous determination of intact cisplatin and its metabolite monohydrated cisplatin in human plasma.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 772(2):273-81
- [55] Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M, Borghi M, D'Illio S, Lugini L, Violante N, Azzarito T, Majorani C, Brambilla D, Fais S: **Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin.** *PLoS One* 2014; 9(2):e88193
- [56] Hostetter AA, Osborn MF, DeRose VJ: **RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*.** *ACS Chem Biol* 2012; 7(1):218-25
- [57] Balter L, Gibson D: **Mass spectrometric studies of the formation and reactivity of trans-[PtCl₂(Am)(piperidinopiperidine)] x HCl complexes with ubiquitin.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19(24):3666-72
- [58] Bosch ME, Sánchez AJ, Rojas FS, Ojeda CB: **Analytical methodologies for the determination of cisplatin.** *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47(3):451-9
- [59] Holleman AF, Wiberg E: **Lehrbuch der anorganischen Chemie.** 101. Auflage de Gruyter 1995
- [60] Harrington CF, Taylor A: **Analytical approaches to investigating metal-containing drugs.** *J Pharm Biomed Anal* 2015; 106:210-7
- [61] Bernareggi A, Torti L, Facino RM, Carini M, Depta G, Casetta B, Farrell N, Spadacini S, Ceserani R, Tognella S: **Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry. Evidence for their formation in vitro but not in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 669(2):247-63
- [62] Troujman H, Chottard JC: **Comparison between HPLC and capillary electrophoresis for the separation and identification of the platination products of oligonucleotides with cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ and [Pt(NH₃)₃(H₂O)]²⁺.** *Anal Biochem* 1997; 252(1):177-85

- [63] Hartinger CG, Timerbaev AR, Keppler BK: **Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: advances and future challenges.** *Electrophoresis* 2003; 24(12-13):2023-37
- [64] Grabmann G, Meier SM, Scaffidi-Domianello YY, Galanski M, Keppler BK, Hartinger CG: **Capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry studies on the behavior of anticancer cis- and trans-[dihalidobis(2-propanone oxime)platinum(II)] complexes in aqueous solutions.** *J Chromatogr A* 2012; 1267:156-61
- [65] Bytzek AK, Hartinger CG: **Capillary electrophoretic methods in the development of metal-based therapeutics and diagnostics: new methodology and applications.** *Electrophoresis* 2012; 33(4):622-34
- [66] Huang Z, Timerbaev AR, Keppler BK, Hirokawa T: **Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques.** *J Chromatogr A* 2006; 1106(1-2):75-9
- [67] Hartinger CG, Keppler BK: **CE in anticancer metallodrug research - an update.** *Electrophoresis* 2007; 28(19):3436-46
- [68] Klepárník K: **Recent advances in the combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: from element to single-cell analysis.** *Electrophoresis* 2013; 34(1):70-85
- [69] Ramautar R, Heemskerk AA, Hensbergen PJ, Deelder AM, Busnel JM, Mayboroda OA: **CE-MS for proteomics: Advances in interface development and application.** *J Proteomics* 2012; 75(13):3814-28
- [70] Wagner Z, Tábi T, Jakó T, Zachar G, Csillag A, Szökő E: **Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system.** *Anal Bioanal Chem* 2012; 404(8):2363-8
- [71] Lacroix M, Poinot V, Fournier C, Couderc F: **Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2005; 26(13):2608-21

- [72] Mikuš P, Veizerová L, Piešťanský J, Maráková K, Havránek E: **On-line coupled capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis in hydrodynamically closed separation system hyphenated with laser induced fluorescence detection.** *Electrophoresis* 2013; 34(8):1223-31
- [73] Sharma M, Jain R, Ionescu E, Slocum HK: **Capillary electrophoretic separation and laser-induced fluorescence detection of the major DNA adducts of cisplatin and carboplatin.** *Anal Biochem* 1995; 228(2):307-11
- [74] Jagodinsky JC, Sulima A, Cao Y, Poprawski JE, Blackman BN, Lloyd JR, Swenson RE, Gottesman MM, Hall MD: **Evaluation of fluorophore-tethered platinum complexes to monitor the fate of cisplatin analogs.** *J Biol Inorg Chem* 2015; 20(7):1081-95
- [75] Molenaar C, Teuben JM, Heetebrij RJ, Tanke HJ, Reedijk J: **New insights in the cellular processing of platinum antitumor compounds, using fluorophore-labeled platinum complexes and digital fluorescence microscopy.** *J Biol Inorg Chem* 2000; 5(5):655-6
- [76] Heiger D: **High performance capillary electrophoresis. An introduction.** *Agilent Technologies* 2000. 5968-9963E
- [77] Cole R B: **Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry.** *J Mass Spectrom* 2000; 35, 763-772
- [78] Enke CG: **A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes.** *Anal Chem* 1997; 69, 4885-4893
- [79] Zhou S, Cook KD: **A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2001; 12, 206-214
- [80] Taflin DC, Ward TL, Davis EJ: **Electrified droplet fission and the Rayleigh limit.** *Langmuir* 1989; 5, 376-384
- [81] Kebarle P: **A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry.** *J Mass Spectrom* 2000; 35, 804-817

- [82] Loscertales IG, Mora JFdI: **Experiments on the kinetics of field evaporation of small ions from droplets.** *J Chem Phys* 1995; 103, (12), 5041-5060
- [83] Bruins AP: **Mechanistic aspects of electrospray ionization.** *J Chromatogr A* 1998; 794, 345-357
- [84] Katayama H, Yoda YI, Asakawa N: **Electrophoretic mobility-assisted identification of proteins by nanoelectrospray capillary electrophoresis/mass spectrometry under methanolic conditions.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14, 1167-1178
- [85] Stark AK: **Dielektrisch behindertes Elektrospray - Charakterisierung und Optimierung.** *Dissertation* 2011, TU-Dortmund, Dortmund
- [86] Gilbert-López B, Geltenpoth H, Meyer C, Michels A, Hayen H, Molina-Díaz A, García-Reyes JF, Franzke J: **Performance of dielectric barrier discharge ionization mass spectrometry for pesticide testing: a comparison with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013; 27(3):419-29
- [87] Gilbert-López B, García-Reyes JF, Meyer C, Michels A, Franzke J, Molina-Díaz A, Hayen H: **Simultaneous testing of multiclass organic contaminants in food and environment by liquid chromatography/dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry.** *Analyst* 2012; 137(22):5403-10
- [88] Mann M, Hendrickson RC, Pandey A: **Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry.** *Annu Rev Biochem* 2001; 70(1):437–473
- [89] Schwartz JC, Senko MW, Syka JE: **A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2002; 13(6):659–669, 2002
- [90] Ohnesorge J, Sängler-van de Griend C, Wätzig H: **Quantification in capillary electrophoresis-mass spectrometry: long- and short-term variance components and their compensation using internal standards.** *Electrophoresis* 2005; 26, 2360-2375
- [91] Sun L, Zhu G, Yan X, Champion MM, Dovichi NJ: **Capillary zone electrophoresis for analysis of complex proteomes using an**

- electrokinetically pumped sheath flow nanospray interface.** *Proteomics* 2014; 14(4-5):622-8
- [92] Liu CC, Zhang J, Dovichi NJ: **A sheath-flow nanospray interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19(2):187-92
- [93] Whitt JT, Moini M: **Capillary electrophoresis to mass spectrometry interface using a porous junction.** *Anal Chem* 2003; 75(9):2188-91
- [94] Moini M: **Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip.** *Anal Chem* 2007; 79(11):4241-6
- [95] Moini M, Martinez B: **Ultrafast capillary electrophoresis/mass spectrometry with adjustable porous tip for a rapid analysis of protein digest in about a minute.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2014; 28(3):305-10
- [96] Schmitt-Kopplin P, Frommberger M: **Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications.** *Electrophoresis* 2003; 24, 3837-3867
- [97] Tang FPW, Leung, GNW, Wan TSM: **Analyses of quaternary ammonium drugs in horse urine by capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Electrophoresis* 2001; 22, 2201-2209
- [98] Mayer BX: **How to increase precision in capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2001; 907, 21-37
- [99] Jahn S, Karst U: **Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry--current state and future perspectives.** *J Chromatogr A* 2012; 1259:16-49
- [100] Jahn S, Lohmann W, Bomke S, Baumann A, Karst U: **A ferrocene-based reagent for the conjugation and quantification of reactive metabolites.** *Anal Bioanal Chem* 2012; 402(1):461-71
- [101] Jahn S, Baumann A, Roscher J, Hense K, Zazzeroni R, Karst U: **Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid**

- chromatography/mass spectrometry - a comparative study with liver cell microsomes.** *J Chromatogr A* 2011; 1218(51):9210-20
- [102] Telgmann L1, Faber H, Jahn S, Melles D, Simon H, Sperling M, Karst U: **Identification and quantification of potential metabolites of Gd-based contrast agents by electrochemistry/separations/mass spectrometry.** *J Chromatogr A.* 2012; 1240:147-55
- [103] Dickinson DA, Forman HJ: **Cellular glutathione and thiols metabolism.** *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1019
- [104] Couturier J, Chibani K, Jacquot JP, Rouhier N: **Cysteine-based redox regulation and signaling in plants.** *Frontiers Plant Sci* 2013; 4:105
- [105] Gupta V, Carroll KS: **Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime.** *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840:847
- [106] Reddie KG, Carroll KS: **Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation.** *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12:746
- [107] Finkel T.: **Signal transduction by reactive oxygen species.** *J Cell Biol* 2011; 194:7
- [108] Muhammad N, Guo Z: **Metal-based anticancer chemotherapeutic agents.** *Curr Opin Chem Biol* 2014; 19:144-53
- [109] Voigt W, Dietrich A, Schmoll HJ: **Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz Cisplatin und seine Analoga.** *Pharm Unserer Zeit* 2006; 35(2):134-43
- [110] Galanski M, Keppler BK: **Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven Tumorhemmende Metallverbindungen.** *Pharm Unserer Zeit* 2006; 35(2):118-23
- [111] Timerbaev AR, Foteeva LS, Rudnev AV, Abramski JK, Polec-Pawlac K, Hartinger CG, Jarosz M, Keppler BK: **Probing the stability of serum protein-ruthenium(III) drug adducts in the presence of extracellular reductants using CE.** *Electrophoresis* 2007, 28: 2235-40
- [112] Mikuš P, Veizerová L, Piešťanský J, Maráková K, Havránek E: **On-line coupled capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis in**

- hydrodynamically closed separation system hyphenated with laser induced fluorescence detection.** *Electrophoresis* 2013; 34(8):1223-31
- [113] Kalayda GV, Wagner CH, Buss I, Reedijk J, Jaehde U: **Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells.** *BMC Cancer* 2008; 8:175
- [114] Kalayda GV, Wagner CH, Jaehde U: **Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells.** *J Inorg Biochem* 2012; 116:1-10
- [115] Martin MM, Lindquist L: **The pH dependence of fluorescein fluorescence.** *J Luminescence* 1975; 10:381-390
- [116] Di Pasqua AJ, Centerwall CR, Kerwood DJ, Dabrowiak JC: **Formation of carbonato and hydroxo complexes in the reaction of platinum anticancer drugs with carbonate.** *Inorg Chem* 2009; 48(3):1192-7
- [117] Centerwall CR, Goodisman J, Kerwood DJ, Dabrowiak JC: **Cisplatin carbonato complexes. Implications for uptake, antitumor properties, and toxicity.** *J Am Chem Soc* 2005; 127(37):12768-9
- [118] Binter A, Goodisman J, Dabrowiak JC: **Formation of monofunctional cisplatin-DNA adducts in carbonate buffer.** *J Inorg Biochem* 2006; 100(7):1219-24
- [119] Heudi O, Mercier-Jobard S, Cailleux A, Allain P: **Mechanisms of reaction of L-methionine with carboplatin and oxaliplatin in different media: a comparison with cisplatin.** *Biopharm Drug Dispos* 1999; 20(2):107-16
- [120] Wood FE, Hunt CT, Balch AL: **^{195}Pt and ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of the binding of the cis- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ moiety to phosphate in aqueous solution.** *Inorg Chim Acta* 1982; 67:L19-L20
- [121] Grabmann G, Keppler BK, Hartinger CG: **A systematic capillary electrophoresis study on the effect of the buffer composition on the reactivity of the anticancer drug cisplatin to the DNA model 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP).** *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(20):6417-24
- [122] Griffiths JR: **Are cancer cells acidic?** *Br J Cancer* 1991; 64(3):425-7

- [123] Senyilmaz D, Teleman AA: **Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction.** *F1000Prime Rep* 2015; 2:7-41
- [124] Roos A, Boron WF: **Intracellular pH.** *Physiol Rev* 1981; 61(2):296-434
- [125] Gao F, Zhang Z, Fu X, Li W, Wang T, Liu H: **Analysis of phospholipids by NACE with on-line ESI-MS.** *Electrophoresis* 2007; 28(9):1418-25
- [126] Nalesso A, Viel G, Cecchetto G, Frison G, Ferrara SD: **Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS.** *Electrophoresis* 2010; 31(7):1227-33
- [127] Pantůčková P, Gebauer P, Bocek P, Krivánková L: **Electrolyte systems for on-line CE-MS: detection requirements and separation possibilities.** *Electrophoresis* 2009; 30(1):203-14
- [128] Hommerson P, Khan AM, de Jong GJ, Somsen GW: **Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: principles, design, and application.** *Mass Spectrom Rev* 2011; 30(6):1096-120
- [129] Bonvin G, Schappler J, Rudaz S: **Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry interfaces: fundamental concepts and technical developments.** *J Chromatogr A* 2012; 1267:17-31
- [130] Krenkova J, Foret F: **On-line CE/ESI/MS interfacing: recent developments and applications in proteomics.** *Proteomics* 2012; 12(19-20):2978-90
- [131] Hernández-Borges J, Neusüss C, Cifuentes A, Pelzing M: **On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules.** *Electrophoresis* 2004; 25(14):2257-81
- [132] Kašička V: **Recent developments in CE and CEC of peptides (2009-2011).** *Electrophoresis* 2012; 33(1):48-73
- [133] García-Campaña AM, Taverna M, Fabre H: **LIF detection of peptides and proteins in CE.** *Electrophoresis* 2007; 28(1-2):208-32
- [134] Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ: **CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012.** *Electrophoresis* 2013; 34(1):86-98

- [135] Warnke U, Rappel C, Meier H, Kloft C, Galanski M, Hartinger CG, Keppler BK, Jaehde U: **Analysis of platinum adducts with DNA nucleotides and nucleosides by capillary electrophoresis coupled to ESI-MS: indications of guanosine 5'-monophosphate O6-N7 chelation.** *Chembiochem* 2004; 5(11):1543-9
- [136] den Hartog JH, Altona C, Chottard JC, Girault JP, Lallemand JY, de Leeuw FA, Marcelis AT, Reedijk J: **Conformational analysis of the adduct cis-[Pt(NH₃)₂d(GpG)]⁺ in aqueous solution. A high field (500-300 MHz) nuclear magnetic resonance investigation.** *Nucleic Acids Res* 1982; 10(15):4715-30
- [137] Hohage O, Manka S, Sheldrick WS: **Downstream reaction of cisplatin with methionine-containing peptides: pH-dependent competition between hydrolytic cleavage and macrochelation.** *Inorg Chim Acta* 2009; 362:953-966
- [138] Manka S, Becker F, Hohage O, Sheldrick WS: **Cisplatin-mediated selective hydrolytic cleavage of methionine-containing peptides with neighboring serine or histidine residues.** *J Inorg Biochem* 2004; 98:1947-1956
- [139] Djuran MI, Dimitrijević DP, Milinković SU, Bugarčić ZD: **Reactions of platinum(II) complexes with sulfur- and histidine-containing peptides: a model for selective platination of peptides and proteins.** *Transit Met Chem* 2002; 27(2):155-158
- [140] Sooriyaarachchi M, Narendran A, Gailer J: **N-acetyl-L-cysteine modulates the metabolism of cisplatin in human plasma in vitro.** *Metallomics* 2013; 5(3):197-207
- [141] Hahn M, Kleine M, Sheldrick WS: **Interaction of cisplatin with methionine- and histidine-containing peptides: competition between backbone binding, macrochelation and peptide cleavage.** *J Biol Inorg Chem* 2001; 6(5-6):556-66
- [142] Dabrowiak JC, Goodisman J, Soud AK: **Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols.** *Drug Metab Dispos* 2002; 30(12):1378-84
- [143] Hagrman D, Goodisman J, Soud AK: **Kinetic study on the reactions of platinum drugs with glutathione.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308(2):658-66

- [144] Ott I, Gust R: **Besonderheiten anorganischer Zytostatika. Medizinische Chemie der Platinkomplexe.** *Pharm Unserer Zeit* 2006; 35: 124-133
- [145] Norman RE, Ranford JC, Sadler PJ: **Studies of platinum(II) methionine complexes: metabolites of cisplatin.** *Inorg Chem* 1992; 31(5):877–888
- [146] Sooriyaarachchi M, Narendran A, Gailer J: **N-acetyl-L-cysteine modulates the metabolism of cisplatin in human plasma in vitro.** *Metallomics* 2013; 5(3):197-207
- [147] Ishikawa T, Ali-Osman F: **Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance.** *J Biol Chem* 1993; 268(27):20116-25
- [148] Nagar R, Khan AR, Poonia A, Mishra PK, Singh S: **Metabolism of cisplatin in the organs of Rattus norvegicus: role of Glutathione S-transferase P1.** *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2015; 40(1):45-51
- [149] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth R, Schäfer-Korting M: **Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.** 9. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 2008
- [150] Tran MQ, Nygren Y, Lundin C, Naredi P, Björn E: **Evaluation of cell lysis methods for platinum metallomic studies of human malignant cells.** *Anal Biochem* 2010; 396(1):76-82
- [151] Osbourn DM, Weiss DJ, Lunte CE: **On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2000; 21(14):2768-79
- [152] Jennerwein M, Andrews PA: **Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II).** *Drug Metab Dispos* 1995; 23(2):178-84
- [153] Pinato O, Musetti C, Sissi C: **Pt-based drugs: the spotlight will be on proteins.** *Metallomics* 2014; 6(3):380-95
- [154] Kotz S, Kullmann M, Crone B, Kalayda GV, Jaehde U, Metzger S: **Combination of two-dimensional gel electrophoresis and a fluorescent carboxyfluorescein-diacetate-labeled cisplatin analogue allows the**

- identification of intracellular cisplatin-protein adducts.** *Electrophoresis* 2015; 36(21):2811-2819
- [155] Falta T, Heffeter P, Mohamed A, Berger W, Hanna S, Koellensperger G: **Quantitative determination of intact free cisplatin in cell models by LC-ICP-MS.** *J Anal At Spectrom* 2011; 26:109-115
- [156] Hermann G, Heffeter P, Falta T, Berger W, Hann S, Koellensperger G: **In vitro studies on cisplatin focusing on kinetic aspects of intracellular chemistry by LC-ICP-MS.** *Metallomics* 2013; 5(6):636-47
- [157] Michalke B: **Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs.** *J Trace Elem Med Biol* 2010; 24(2):69-77
- [158] Boulikas T, Vougiouka M: **Cisplatin and platinum drugs at the molecular level.** *Oncol Rep* 2003; 10(6):1663-82
- [159] Marquardt H, Schäfer S: **Lehrbuch der Toxikologie.** 2. Auflage *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 2004
- [160] Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, Pompella A, Wellman M, Galteau MM, Visvikis A: **Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase.** *Biochem Pharmacol* 2002; 64(2):207-16
- [161] Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ: **Cisplatin binding sites on human albumin.** *J Biol Chem* 1998; 273(24):14721-30
- [162] Peleg-Shulman T, Najajreh Y, Gibson D: **Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles.** *J Inorg Biochem.* 2002; 91(1):306-11
- [163] Cox MC, Barnham KJ, Frenkiel TA, Hoeschele JD, Mason AB, He QY, Woodworth RC, Sadler PJ: **Identification of platination sites on human serum transferrin using (13)C and (15)N NMR spectroscopy.** *J Biol Inorg Chem* 1999; 4(5):621-31
- [164] Casini A, Gabbiani C, Mastrobuoni G, Messori L, Moneti G, Pieraccini G: **Exploring metallodrug-protein interactions by ESI mass spectrometry: the**

- reaction of anticancer platinum drugs with horse heart cytochrome c.** *ChemMedChem* 2006; 1(4):413-7
- [165] Hohage O, Sheldrick WS: **Cisplatin mediates selective downstream hydrolytic cleavage of Met-(Gly)(n)-His segments (n=1,2) in methionine- and histidine-containing peptides: the role of ammine loss trans to the initial Pt-S(Met) anchor in facilitating amide hydrolysis.** *J Inorg Biochem* 2006; 100(9):1506-13
- [166] Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, Jaehde U: **Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells.** *Biochem Pharmacol* 2007; 73(2):298-307
- [167] Hall MD, Dillon CT, Zhang M, Beale P, Cai Z, Lai B, Stampfl AP, Hambley TW: **The cellular distribution and oxidation state of platinum(II) and platinum(IV) antitumour complexes in cancer cells.** *J Biol Inorg Chem* 2003; 8(7):726-32
- [168] Shi Y, Liu SA, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC: **Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin.** *J Inorg Biochem* 2012; 107(1):6-14
- [169] Lemma K, Berglund J, Farrell N, Elding LI: **Kinetics and mechanism for reduction of anticancer-active tetrachloroam(m)ine platinum(IV) compounds by glutathione.** *J Biol Inorg Chem* 2000; 5(3):300-6
- [170] Messens J, Collet JF: **Thiol-disulfide exchange in signaling: disulfide bonds as a switch.** *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(13):1594-6
- [171] Hopmann KH: **Full reaction mechanism of nitrile hydratase: a cyclic intermediate and an unexpected disulfide switch.** *Inorg Chem* 2014; 53(6):2760-2
- [172] Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, Peterson DR, Kraemer DF, Neuwelt EA: **Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62(2):235-41
- [173] Zeida A, Babbush R, Lebrero MC, Trujillo M, Radi R, Estrin DA: **Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the S_N2 paradigm.** *Chem Res Toxicol* 2012; 25(3):741-6

8. Danksagung

**Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2012 bis Juli 2015 im
Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS e.V. in Dortmund**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Albert Sickmann danken für die Betreuung dieser Arbeit und die Bereitschaft als Erstgutachter aufzutreten.

Herrn Dr. Günther Weber möchte ich herzlichst für die profunde Einführung in die Welt der Kapillarelektrophorese, die stete Ansprechbarkeit bei allen größeren oder kleineren Fragen und Problemen und die jederzeit offen stehende Tür danken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und für seine Unterstützung dieser Arbeit als Zweitgutachter.

Den Kooperationspartnern Dr. Sabine Metzger und Sandra Kotz aus Köln und Dr. Anya Kalayda und Maximilian Kullmann aus Bonn danke ich für die sehr gute Kooperation und den regen Austausch bei dem gemeinsamen DFG-Projekt.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des ISAS für die Hilfe bei der Bewältigung der alltäglichen Tücken des (Labor)alltags und die interdisziplinäre, interkulturelle und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich meiner Familie für vergangene und zukünftige Unterstützung danken.

Mein allergrößter Dank gilt Jana Bewersdorff, die mir in allen Lebenslagen zur Seite stand und stets mein Ruhepol war.

Vielen Dank!

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Name	Robert Otto Zabel
E-Mail	ro.zabel@gmx.de
Geburtstag	29.03.1982
Geburtsort	Berlin
Nationalität	deutsch

Schulbildung

08/1988 - 08/1994	Grundschule Alt-Karow (Berlin)
08/1994 - 06/2001	Bühring-Gymnasium (Berlin)
06/2001	Allgemeine Hochschulreife

Studium

03/2003 - 03/2007	Studium der Chemie an der Freien Universität (Berlin)
03/2007	Bachelor of Science in Chemie
04/2007 - 03/2009	Studium der Chemie an der Freien Universität (Berlin)
10/2008 - 01/2011	Studium der Toxikologie an der Charité (Berlin)
01/2011	Master of Science in Toxikologie

Promotion

02/2012 Beginn der Dissertation am Leibniz-Institut für Analytische
Wissenschaften - ISAS e.V. (Dortmund)

Berufstätigkeit

03/2008 - 05/2010 Werkstudent bei Atotech Deutschland GmbH, Abteilung
Forschung und Entwicklung Edelmetalle (Berlin)

02/2012 - 07/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Leibniz-Institut für
Analytische Wissenschaften - ISAS e.V. (Dortmund)

08/2015 - 02/2016 Mitarbeiter bei Lehmann&Voss&Co. KG, Servicegruppe
Sicherheit & Umweltschutz (Hamburg)

seit 04/2016 Mitarbeiter bei UMCO GmbH (Hamburg)

Hamburg, den 28.10.2018

9.2 Publikationen

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **Optimized sample preparation strategy for the analysis of low molecular mass adducts of a fluorescent cisplatin analogue in cancer cell lines by CE-dual-LIF.** *Electrophoresis* 2015; 36:509-517

Zabel R, Weber G: **Comparative study of the oxidation behavior of sulfur-containing amino acids and glutathione by electrochemistry-mass spectrometry in the presence and absence of cisplatin.** *Anal Bioanal Chem* 2016; 408(4):1237-47

9.3 Tagungsbeiträge

Kullmann M, Kotz S, Metzger S, Zabel R, Weber G, Jaehde U: **Optimization of cell lysis methods for cell fractionation and downstream analyses in A2780 human ovarian carcinoma cells.** Jahrestagung der Central European Society of Anticancer Drug Research (CESAR), 2012, Essen (Poster)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **CE mit Doppel-LIF-Detektion zur Untersuchung der Adduktbildung Pt-haltiger Antitumormittel in Krebszellen.** CE-Forum, 2012, Ahlen (Vortrag)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **Identification of intracellular reaction products of antineoplastic platinum complexes by capillary electrophoresis.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 2013, Halle/Saale (Poster)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **CE-LIF and CE-MS for investigating adduct formation and kinetics of Pt-based anti-cancer drugs.** CE-Forum, 2013, Jena (Vortrag)

Kullmann M, Kotz S, Metzger S, Zabel R, Weber G, Jaehde U: **Use of a fluorescent cisplatin analogue for identification of intracellular cisplatin binding partners.** Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 2013, Freiburg (Poster)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **CE-LIF and CE-MS for investigating adduct formation and kinetics of Pt-based anti-cancer drugs.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 2014, Hannover (Poster)

Weber G, Zabel R, Kalayda GV, Kullmann M, Jaehde U: **Untersuchung der Adduktbildungsreaktionen Pt-haltiger Wirkstoffe mittels CE-LIF und CE-MS.** Edelmetallforum, 2014, Ulm (Vortrag)

Zabel R, Weber G: **Capillary electrophoresis in cancer drug research.** Ph. D. Retreat der Leibniz-Gemeinschaft Sektion D, 2014, Berlin (Poster)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **CE-LIF and CE-MS for investigating adduct formation and kinetics of Pt-based anti-cancer drugs.** BNASS / TraceSpec Tandem Conference, 2014, Aberdeen (Poster)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **Identification of cytosolic low-molecular-mass adducts of a fluorescent cisplatin analogue by CE-LIF and CE-MS.** CE-Forum, 2014, Marburg (Vortrag)

Zabel R, Kullmann M, Kalayda GV, Jaehde U, Weber G: **Distribution and adduct formation of a fluorescent cisplatin analogue in the cytosol.** Jahrestagung der

Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 2015, Kiel (Poster)

Weber G, Zabel R: Cisplatin-induced changes in thiol reactivity: linking metal binding to redox chemistry. **International Biometals Symposium, 2016, Dresden (Vortrag)**