

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>4</b>
2.1	Nickelspezies in biologischen Proben	4
2.2	Induktiv-gekoppeltes-Plasma / Massenspektrometrie (ICP-MS)	9
2.2.1	Zerstäuber für chromatographische Trennverfahren	10
2.2.2	HPLC / ICP-MS Kopplung	11
2.2.2.1	Reversed-Phase-Chromatographie gekoppelt mit der ICP-MS	11
2.2.2.2	Ionenpaar-Chromatographie gekoppelt mit der ICP-MS	12
2.2.2.3	Ionenaustausch-Chromatographie gekoppelt mit der ICP-MS	13
2.2.2.4	Größenausschluss-Chromatographie gekoppelt mit der ICP-MS	14
2.2.3	Kapillarelektrophorese gekoppelt mit der ICP-MS	15
<b>3</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>Analysenverfahren</b>	<b>21</b>
4.1	Probenmaterial	21
4.2	Probenvorbereitung	23
4.3	Eingesetzte Kopplungstechniken	24
4.3.1	CE / ICP-MS Kopplung	26
4.3.2	SEC-Chromatographie mit UV-Detektion	28
4.3.3	SEC / ICP-MS Kopplung	29
4.4	Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TXRF)	31
4.5	Gesamtproteinbestimmung nach Biuret-Lowry	31
<b>5</b>	<b>Optimierung der Analysemethoden</b>	<b>32</b>
5.1	Reduzierung von Nickelkontaminationen	32
5.1.1	Reinigung der Gefäße	32
5.1.2	Reinigung der Chemikalien	33
5.1.3	Reduzierung der Nickelkontamination durch apparative Veränderungen	35
5.2	Optimierung der CE-Trennbedingungen mithilfe eines gemischten Metallothionein-Standards	36
5.2.1	Optimierung der Kapillarentemperatur	38
5.2.2	Optimierung der Kapillarenlänge	39
5.2.3	Optimierung des Innendurchmessers der Kapillare	40
5.2.4	Optimierung der Konzentration des Puffers	41

5.2.5	Optimierung des pH-Wertes des Puffers _____	42
5.2.6	Optimierte Messparameter für die CE / ICP-MS Kopplung _____	44
<b>5.3</b>	<b>Vergleich unterschiedlicher Cytosolherstellungsverfahren _____</b>	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Optimierung der Probenvorbereitung _____</b>	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Trennbedingungen der SEC-Trennung _____</b>	<b>51</b>
5.5.1	Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Cytosols während der SEC-Trennung _____	51
5.5.2	Einfluss eines Antioxidants auf die SEC-Trennung _____	52
5.5.3	Zusammenfassung der Trennbedingungen der SEC / ICP-MS Kopplung ____	53
<b>6</b>	<b><i>Nickelspeziesanalyse im Cytosol kolorektaler Human- gewebeproben</i> _____</b>	<b>54</b>
<b>6.1</b>	<b>Bestimmung der Gesamtnickelgehalte im Cytosol mithilfe der TXRF</b>	<b>54</b>
6.1.1	Diskussion der Ergebnisse _____	56
<b>6.2</b>	<b>Gesamtproteinbestimmung der Cytosole der Proben 1-5 _____</b>	<b>57</b>
6.2.1	Diskussion der Ergebnisse _____	57
<b>6.3</b>	<b>Nickelspeziesanalyse mithilfe der CE / ICP-MS Kopplung _____</b>	<b>58</b>
6.3.1	Auswertung und Aussage der Speziesanalyse _____	60
<b>6.4</b>	<b>Nickelspeziesanalyse mithilfe der SEC / ICP-MS Kopplung _____</b>	<b>67</b>
6.4.1	SEC mit UV-Detektion _____	67
6.4.1.1	Ergebnis und Diskussion _____	68
6.4.2	Nickelspeziesanalyse mithilfe der SEC / ICP-MS Kopplung _____	
6.4.2.1	Auswertungen und Aussagen der Nickelspeziesanalyse _____	69
6.4.2.2	Fraktionierung mittels SEC und anschließende Speziesanalyse mithilfe der CE / ICP-MS Kopplung _____	75
6.4.2.3	Ergebnisse und Diskussion der Fraktionierung _____	76
6.4.2.4	Semiquantitative Nickelspeziesanalyse _____	76
<b>6.5</b>	<b>Verdrängungsreaktionen der Ni<sup>2+</sup>- durch Zn<sup>2+</sup>-Ionen _____</b>	<b>79</b>
6.5.1	Durchführung der Verdrängungsreaktion _____	79
6.5.2	Ergebnisse und Diskussion _____	80
<b>7</b>	<b><i>Zusammenfassung</i> _____</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b><i>Ausblick</i> _____</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i> _____</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b><i>Anhang</i> _____</b>	<b>101</b>
10.1	Geräteliste _____	101

<b>10.2</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>102</b>
<b>10.3</b>	<b>Verwendete Abkürzungen</b>	<b>103</b>
<b>10.4</b>	<b>Experimentelles</b>	<b>105</b>
<b>10.5</b>	<b>Optimierung</b>	<b>106</b>
10.5.1	Cytosolherstellung mit dem Potter Eveljhem Homogenisator	106
10.5.2	Cytosolherstellung mit dem Ultraschalldesintegrator	106
<b>10.6</b>	<b>Optimierung der Cytosolherstellung</b>	<b>108</b>
<b>10.7</b>	<b>TXRF Messungen</b>	<b>109</b>
<b>10.8</b>	<b>Gesamtproteinbestimmung</b>	<b>111</b>
<b>10.9</b>	<b>Berechnung statistischer Größen für die CE / ICP-MS Kopplung</b>	<b>112</b>
<b>10.10</b>	<b>Nickelspeziesanalyse mithilfe der CE / ICP-MS (Probe 1-2 und 10-15)</b>	<b>113</b>
10.10.1	Nickel/Kupfer Korrelation bei der CE / ICP-MS	120
<b>10.11</b>	<b>Berechnung statistischer Größen für die SEC / ICP-MS Kopplung</b>	<b>128</b>
<b>10.12</b>	<b>Nickelspeziesanalyse mit Hilfe der SEC / ICP-MS Kopplung</b>	<b>129</b>
10.12.1	Nickel/Kupfer Korrelation bei der SEC / ICP-MS	131

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Dosis-Wirkungs-Prinzip	1
Abbildung 4.1-1:	Entnahmestellen der Gewebeproben	22
Abbildung 4.2-1:	Potter-Eveljhem-Homogenisator (links), Ultraschalldesintegrator (rechts)	23
Abbildung 4.3-1:	Schematischer Aufbau eines Sektorfeld-Massenspektrometers	25
Abbildung 4.3-2:	Shield Torch System	25
Abbildung 4.3-3:	Schema der CE / ICP-MS Kopplung	26
Abbildung 4.3-4:	Schematischer Aufbau des Interface für die CE / ICP-MS Kopplung	27
Abbildung 4.3-5:	Verwendetes Interface	28
Abbildung 4.3-6:	Schematischer Aufbau einer SEC mit einem UV-Detektor	29
Abbildung 4.3-7:	Schematischer Aufbau einer SEC / ICP-MS Kopplung	30
Abbildung 4.3-8:	Kopplung SEC mit ICP-MS (A), Sprühkammer (B)	30
Abbildung 5.1-1:	Dampfreinigungsapparatur zur Reinigung der PFA-Gefäße	33
Abbildung 5.1-2:	Aufbau des Conensystems eines ICP-MS	35
Abbildung 5.1-3:	Gegenüberstellung von zwei Elektropherogrammen eines humanen Gewebeytosols unter Einsatz verschiedener Conen; Detektion <sup>60</sup> Ni	36
Abbildung 5.2-1:	Vergleich eines Elektropherogramms eines Cd-beladenen Metallothionein-gemisches mit einem Elektropherogramm eines Cytosols von einer malignen Kolongewebeprobe unter optimierten Bedingungen	37

Abbildung 5.2-2: Verlauf des Temperaturgradienten innerhalb einer Kapillare _____	38
Abbildung 5.2-3: Elektropherogramm des MT-Gemisches bei einer Pufferkonzentration von 20 mmol/L _____	41
Abbildung 5.2-4: Elektropherogramm des MT-MIX Standards mit einer Pufferkonzentration von 50 mmol/L _____	42
Abbildung 5.2-5: Einfluss des pH-Wertes des Puffers auf die elektrophoretische Trennung eines Cadmium beladenen MT-MIX Standards _____	43
Abbildung 5.3-1: Elektropherogramme von Nickelspezies in Abhängigkeit von der Cytosolgewinnung _____	45
Abbildung 5.3-2: Vergleich der Gesamtnickelkonzentration im Cytosol in Abhängigkeit von der verwendeten Aufschlussmethode (mechanisch und mittels Ultraschall) ____	46
Abbildung 5.4-1: Elektropherogramme von zwei Cytosolen (NG und TG) vor der Acetonitrilfällung _____	47
Abbildung 5.4-2: Elektropherogramme von zwei Cytosolen (NG und TG) nach der Acetonitrilfällung _____	47
Abbildung 5.4-3: SEC / ICP-MS Chromatogramme eines Cytosols vor und nach der Acetonitrilfällung _____	49
Abbildung 5.4-4: Probenvorbehandlung zur Nickelspeziesanalyse mittels CE / ICP-MS und SEC / ICP-MS Kopplung _____	50
Abbildung 5.5-1: SE-Chromatogramme eines Cytosols in Abhängigkeit von der Säulentemperatur _____	51
Abbildung 5.5-2: SE-Chromatogramme eines Cytosols in Abhängigkeit von der Zugabe eines Antioxidants _____	52
Abbildung 6.1-1: Ergebnisse der TXRF-Messung für die Cytosole vor der Acetonitrilfällung _	55
Abbildung 6.1-2: Ergebnisse der TXRF-Messung für die Cytosole nach der Acetonitrilfällung	55
Abbildung 6.2-1: Gesamtproteingehalte der Cytosole (Probe 1-5) _____	57
Abbildung 6.3-1: Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 3 _____	59
Abbildung 6.3-2: Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 5 _____	59
Abbildung 6.3-3: Elektropherogramme der Cytosole (NG/entz.G) der Probe 4 _____	59
Abbildung 6.3-4: Elektropherogramme einer Ni-Standardlösung (20 µg/L) und eines Cytosols der Probe NG 3 _____	60
Abbildung 6.3-5: Übereinstimmung der Migrationszeit der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 3 _____	61
Abbildung 6.3-6: Elektropherogramme zur Identifizierung einer weiteren Nickelspezies _____	64
Abbildung 6.3-7: Verhalten der Nickelspezies im Cytosol gegenüber niedrig konzentrierten EDTA-Lösungen _____	65
Abbildung 6.3-8: Verhalten der Nickelspezies im Cytosol gegenüber hoch konzentrierten EDTA- Lösungen _____	65
Abbildung 6.4-1: Massenkali­briergerade für die SEC-Säule _____	67
Abbildung 6.4-2: SE-Chromatogramme der Cytosole von Normalgewebe und Tumorgewebe der Probe 1(UV-Detektion bei 254 nm) _____	68

Abbildung 6.4-3:	Vergleich Chromatogramm eines Cytosol (TG) mit UV und mit ICP-MS Detektion _____	69
Abbildung 6.4-4:	SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 3 _____	70
Abbildung 6.4-5:	SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 5 _____	70
Abbildung 6.4-6:	SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/entz.G) der Probe 4 _____	71
Abbildung 6.4-7:	Zuordnung der Nickelspezies über eine Kupferspezies (Molmasse 6 kDa) der Probe NG 1 _____	73
Abbildung 6.4-8:	Zuordnung der Nickelspezies über eine Kupferspezies (Molmasse 6 kDa) der Probe TG 1 _____	74
Abbildung 6.4-9:	Fraktionierung des Cytosols der Probe TG 1 _____	75
Abbildung 6.4-10:	Elektropherogramme der SEC-Fraktionen (4 kDa und 9 kDa) _____	76
Abbildung 6.5-1:	SE-Chromatogramme nach Zusatz von Zn <sup>2+</sup> - und Ni <sup>2+</sup> -Ionen zum Cytosol der Probe NG 10 _____	80
Abbildung 6.5-2:	SE-Chromatogramme nach Zusatz von Zn <sup>2+</sup> - und Ni <sup>2+</sup> -Ionen zum Cytosol der Probe TG 10 _____	80
Abbildung 10.6-1:	Elektropherogramme von Kupferspezies in Abhängigkeit von der Cytosolherstellung _____	108
Abbildung 10.6-2:	Elektropherogramme von Zinkspezies in Abhängigkeit von der Cytosolherstellung _____	108
Abbildung 10.6-3:	Elektropherogramme von Bleispezies in Abhängigkeit von der Cytosolherstellung _____	108
Abbildung 10.8-1:	Kalibriergerade zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Cytosolproben _____	111
Abbildung 10.10-1:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 1 _____	113
Abbildung 10.10-2:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 2 _____	114
Abbildung 10.10-3:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 10 _____	114
Abbildung 10.10-4:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 11 _____	114
Abbildung 10.10-5:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 12 _____	115
Abbildung 10.10-6:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 13 _____	115
Abbildung 10.10-7:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 14 _____	115
Abbildung 10.10-8:	Elektropherogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 15 _____	116
Abbildung 10.10-9:	Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 1 _____	120
Abbildung 10.10-10:	Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG 1 _____	121
Abbildung 10.10-11:	Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG2 _____	121
Abbildung 10.10-12:	Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG2 _____	121
Abbildung 10.10-13:	Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG3 _____	122

Abbildung 10.10-14: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG4 _____	122
Abbildung 10.10-15: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von entz.G4 _____	122
Abbildung 10.10-16: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 5 _____	123
Abbildung 10.10-17: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG5 _____	123
Abbildung 10.10-18: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 10 _____	123
Abbildung 10.10-19: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG 10 _____	124
Abbildung 10.10-20: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 11 _____	124
Abbildung 10.10-21: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG11 _____	124
Abbildung 10.10-22: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 12 _____	125
Abbildung 10.10-23: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG 12 _____	125
Abbildung 10.10-24: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 13 _____	125
Abbildung 10.10-25: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG 13 _____	126
Abbildung 10.10-26: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 14 _____	126
Abbildung 10.10-27: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG 14 _____	126
Abbildung 10.10-28: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von NG 15 _____	127
Abbildung 10.10-29: Übereinstimmung der Migrationszeiten der Nickelspezies I und der Kupferspezies im Cytosol von TG 15 _____	127
Abbildung 10.12-1: SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 1 _____	129
Abbildung 10.12-2: SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 10 _____	129
Abbildung 10.12-3: SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 11 _____	129
Abbildung 10.12-4: SE-Chromatogramme der Cytosole(NG/TG) der Probe 13 _____	130
Abbildung 10.12-5: SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 14 _____	130
Abbildung 10.12-6: SE-Chromatogramme der Cytosole (NG/TG) der Probe 15 _____	130
Abbildung 10.12-7: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 3 _____	131

Abbildung 10.12-8: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 3 _____	131
Abbildung 10.12-9: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 4 _____	131
Abbildung 10.12-10: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe entzündetes G 4 _____	132
Abbildung 10.12-11: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 5 _____	132
Abbildung 10.12-12: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 5 _____	132
Abbildung 10.12-13: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 10 _____	133
Abbildung 10.12-14: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 10 _____	133
Abbildung 10.12-15: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 11 _____	133
Abbildung 10.12-16: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 11 _____	134
Abbildung 10.12-17: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 13 _____	134
Abbildung 10.12-18: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 13 _____	134
Abbildung 10.12-19: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 14 _____	135
Abbildung 10.12-20: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 14 _____	135
Abbildung 10.12-21: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe NG 15 _____	135
Abbildung 10.12-22: Zuordnung der Ni-Spezies über eine Cu-Spezies (6 kDa) der Probe TG 15 _____	136

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1-1: Molare Massen der Nickelspezies im Cytosol von Rattennieren _____	4
Tabelle 2.1-2: Ergebnisse der Nickelspeziesanalyse im Cytosol von unterschiedlichen Gewebeproben der Ratte bzw. des Frosches _____	6
Tabelle 2.2-1: Zusammenfassung der CE / ICP-MS Literatur _____	17
Tabelle 4.1-1: Kenndaten der analysierten Gewebeproben _____	22
Tabelle 5.1-1: Konditionierungsschritte des Chelex 100 für die anschließende Reinigung des Tris-HNO <sub>3</sub> -Puffers _____	34
Tabelle 5.2-1: Gewählte Messparameter für die Optimierung der Kapillarentemperatur _____	39

Tabelle 5.2-2:	Auflistung der optimierten Parameter der CE / ICP-MS Kopplung _____	44
Tabelle 5.5-1:	Optimierte Messparameter für die SEC / ICP-MS Kopplung _____	53
Tabelle 6.3-1:	Peakflächenverhältnisse der Nickelspezies I zu Spezies II _____	62
Tabelle 6.4-1:	Proteinstandards für die Massenkalisierung der SEC-Säule. _____	67
Tabelle 6.4-2:	Molmassen der Nickelspeziesfraktionen _____	71
Tabelle 6.4-3:	Peakflächenverhältnisse der Nickelspezies I (6 kDa) zu Nickelspezies II (9 kDa); SEC / ICP-MS Messungen _____	77
Tabelle 10.7-1:	Ergebnisse der TXRF-Messung für die Cytosolproben vor der Acetonitrilfällung _____	109
Tabelle 10.7-2:	Ergebnisse der TXRF-Messung für die Cytosolproben nach der Acetonitrilfällung _____	110
Tabelle 10.8-1:	Ergebnisse der Kalibrierung für die Gesamtproteinbestimmung (n=3) ____	111
Tabelle 10.8-2:	Ermittelte Extinktionen und die berechneten Gesamtproteingehalte (n=3)	112
Tabelle 10.9-1:	Wiederholpräzision eines Cytosols für die CE / ICP-MS Kopplung <sup>3</sup> ____	112
Tabelle 10.9-2:	Abschätzung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der CE / ICP-MS Kopplung _____	113
Tabelle 10.10-1:	berechnete Flächen der Nickelspezies I und II für die CE / ICP-MS und Flächenverhältnisse für die Proben 1-5 und 10-15 _____	116
Tabelle 10.10-2:	Wertetabelle zur Durchführung des t-Test (auf der Ebene von 0,01) für die Peakflächenverhältnisse (CE / ICP-MS) _____	117
Tabelle 10.10-3:	Ergebnisse des t-Test der Peakflächen _____	118
Tabelle 10.11-1:	Wiederholpräzision (Retentionzeit) eines Cytosols für die SEC / ICP-MS Kopplung (n=5) _____	128
Tabelle 10.11-2:	Wiederholpräzision (Peakflächen) eines Cytosols für die SEC / ICP-MS Kopplung (n=5) _____	128
Tabelle 10.12-1:	berechnete Flächen der Nickelspezies I und II für die SEC / ICP-MS und Flächenverhältnisse für die Proben 1-5 und 10-15 _____	136
Tabelle 10.12-2:	Wertetabelle zur Durchführung des t-Test (Ebene 0,01) für die Peakflächenverhältnisse (SEC / ICP-MS) _____	137
Tabelle 10.12-3:	Ergebnisse des t-Test der Peakflächen _____	137