

# **Funktionelle Untersuchung von Benzimidazolen und Acridonsäureamiden als Modulatoren des ABC-Transporters ABCB1**

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Katja Sterz**

aus

Köln

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

Tag der Promotion: 05. April 2013

Erscheinungsjahr: 2013

Die Erfahrungen sind wie die Samenkörner,  
aus denen die Klugheit emporwächst.

*K. Adenauer*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der ABC-Transporter und ihre pharmazeutische Bedeutung . . .	1
1.1.1 Humane ABC-Transporter . . . . .	2
1.1.2 Pharmazeutische Relevanz humaner ABC-Transporter . . . . .	3
1.2 Die MDR-assoziierten Transporter ABCB1, ABCG2 und ABCC1 . . . . .	7
1.2.1 ABCB1 . . . . .	7
1.2.2 ABCG2 . . . . .	13
1.2.3 ABCC1 . . . . .	16
1.3 Modulatoren des ABCB1 . . . . .	18
1.3.1 Inhibitoren . . . . .	18
1.3.2 Aktivatoren . . . . .	21
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Chemikalien und Pufferlösungen . . . . .	27
3.1.1 Eingesetzte Chemikalien und Herstellung von Verdünnungsreihen . . .	27
3.1.2 Herstellung von Pufferlösungen . . . . .	27
3.2 Zellkultur . . . . .	32
3.2.1 Verwendete Zelllinien . . . . .	32
3.2.2 Allgemeine Zellkultur . . . . .	33
3.2.3 Kryokonservierung von Zellen . . . . .	34
3.2.4 Zellzahlbestimmung . . . . .	34
3.2.5 Aufnahme einer Wachstumskinetik . . . . .	35
3.3 Allgemeine und molekularbiologische Methoden . . . . .	36
3.3.1 Herstellung von Proben für die Gelelektrophorese . . . . .	36
3.3.2 Proteinbestimmung nach Peterson-Lowry . . . . .	38
3.3.3 SDS-Gelelektrophorese . . . . .	39
3.3.4 Western-Blot . . . . .	41

3.3.5	Nachweis der ABCB1 Expression mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper . . . . .	44
3.3.6	Immunohistochemische Untersuchungen . . . . .	45
3.4	Funktionelle Charakterisierung von ABC-Transportern mittels Durchflusszytometrie . . . . .	49
3.4.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie . . . . .	49
3.4.2	Bestimmung der intrazellulären Konzentration fluoreszierender ABCB1 Substrate . . . . .	51
3.4.3	Messung des Rhodamin 123 Efflux . . . . .	54
3.4.4	Pheophorbid A Akkumulationsassay für ABCG2 . . . . .	55
3.5	Weitere funktionelle Methoden . . . . .	57
3.5.1	MTT-Assay . . . . .	57
3.5.2	Calcein-AM Assay . . . . .	58
3.5.3	Hoechst 33342 Akkumulationsassay . . . . .	60
3.5.4	Bestimmung der ATPase-Aktivität von ABCB1 . . . . .	62
3.6	Statistische und mathematische Methoden . . . . .	65
3.6.1	Analyse von Konzentrations-Effekt-Kurven . . . . .	65
3.6.2	Resistenzfaktor und Sensitivierungsfaktor . . . . .	66
3.6.3	Berechnung der Pumpgeschwindigkeit von ABC-Transportern . . . . .	67
3.6.4	Michaelis-Menten-Kinetik . . . . .	68
<b>4</b>	<b>Charakterisierung von Zelllinien und Etablierung funktioneller Methoden zur Untersuchung von ABC-Transportern</b>	<b>79</b>
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien . . . . .	79
4.1.1	Resistenzspektrum der eingesetzten Zellen . . . . .	79
4.1.2	Untersuchung der ABCB1 Expression . . . . .	92
4.2	Etablierung des Rhodamin 123-Akkumulationsassays . . . . .	99
4.2.1	Akkumulation von Rhodamin 123 in A2780 und A2780 Adr . . . . .	100
4.2.2	Einfluss des verwendeten Puffers . . . . .	102
4.2.3	Übertragung in den Mikromaßstab . . . . .	106
4.2.4	Untersuchung bekannter ABCB1-Inhibitoren . . . . .	108
4.2.5	Verwendung von Tetramethylrosamin als Substrat . . . . .	113
<b>5</b>	<b>Benzimidazole und Benzothiazole als Modulatoren von ABCB1</b>	<b>117</b>
5.1	Aktivierung von ABCB1 . . . . .	117
5.2	Einfluss von QB102 auf die ABCB1 Expression . . . . .	125
5.3	Untersuchung von Benzimidazolen mittels funktioneller Assays . . . . .	133
5.3.1	Untersuchungen an ABCB1 . . . . .	133

---

5.3.2	Vergleich verschiedener Substrate und Zelllinien . . . . .	151
5.3.3	Screening an weiteren ABC-Transportern . . . . .	157
5.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen . . . . .	161
5.4.1	Einleitung . . . . .	161
5.4.2	Erstellung der Pharmakophormodelle . . . . .	161
5.4.3	Ergebnisse . . . . .	166
<b>6</b>	<b>Acridonsäureamide als Modulatoren von ABCB1 und ABCG2</b>	<b>175</b>
6.1	Derivate des GF120918 als Inhibitoren von ABCB1 . . . . .	175
6.1.1	Funktionelle Untersuchungen an ABCB1 . . . . .	175
6.1.2	Einfluss ausgewählter Derivate auf die ABCB1 vermittelte Resistenz .	187
6.1.3	Untersuchung des Bindungsverhaltens der GF120918 Derivate . . . . .	195
6.2	Acridonsäureamide als Inhibitoren von ABCG2 . . . . .	201
6.2.1	Funktionelle Untersuchungen an ABCG2 . . . . .	201
6.2.2	Bindungsverhalten der Acridonsäureamide an ABCG2 . . . . .	206
6.3	Kleine Acridonsäureamide als Aktivatoren von ABCB1 . . . . .	211
6.3.1	Funktionelle Untersuchungen an ABCB1 . . . . .	211
<b>7</b>	<b>Untersuchungen zur Aktivierung von ABCB1</b>	<b>227</b>
7.1	Substratspezifität der Aktivierung von ABCB1 durch Benzimidazole und Acridonsäureamide . . . . .	227
7.1.1	Zytotoxizität der Modulatoren . . . . .	228
7.1.2	Einfluss auf den Transport zytostatisch wirksamer Arzneistoffe . . . . .	236
7.2	Einfluss der Aktivatoren auf die ATPase-Aktivität des ABCB1 . . . . .	243
7.3	Enzymkinetische Betrachtung von Aktivatoren . . . . .	248
<b>8</b>	<b>Untersuchung von Derivaten des Tetramethylrosamin</b>	<b>255</b>
8.1	Fluoreszenzeigenschaften und Substratcharakter . . . . .	256
8.2	Untersuchung von Modulatoren des ABCB1 . . . . .	263
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>271</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>275</b>
<b>A</b>	<b>Chemikalienverzeichnis</b>	<b>301</b>
<b>B</b>	<b>Strukturen der QB-Derivate und Gü-Verbindungen</b>	<b>305</b>
<b>C</b>	<b>Pharmakophor-Erstellung</b>	<b>309</b>
C.1	Konformationssuche . . . . .	309

C.2	Alignments . . . . .	309
C.2.1	Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ (A1) . . . . .	310
C.2.2	Inhibitoren vom Benzimidazol-Typ (A2) . . . . .	310
C.2.3	Aktivatoren vom 4-Aminothienopyrimidin-Typ (A3) . . . . .	311
C.3	Pharmakophor-Erstellung mit Consensus . . . . .	311
<b>D</b>	<b>Strukturen und Spektren von Derivaten des Tetramethylrosamin</b>	<b>315</b>
<b>E</b>	<b>Untersuchung von Jatrophan-Diterpenen</b>	<b>319</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>325</b>
	<b>Verfassererklärung</b>	<b>327</b>



# Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette (ATP-Bindungsstelle)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2
BSA	Bovines Serumalbumin
Cal-AM	Calcein-AM, Calcein-Acetoxymethylester
CHO-Zellen	Chinesische Hamster-Ovarzellen
COL	Colchicin
CsA	Cyclosporin A, Ciclosporin
DACA	Dimethylaminoethylacridin-4-carboxamid
DMF	Dose-modifying factor (Sensitivierungsfaktor)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNR	Daunorubicin
ECL-Reagenz	Enhanced Chemoluminescence-Reagenz
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Hoe 33342	Hoechst 33342
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HTS	High-Throughput-Screening
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
MDCK-Zellen	Madin Darby Canine Kidney Zellen
MDR	Multidrug Resistance (Multiple Zytostatikaresistenz)
MRP1	Multidrug Resistance associated Protein 1, ABCC1
MSD	Membrane Spanning Domain (Transmembranäre Domäne)
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P-gp	P-Glykoprotein, ABCB1
Pheo A	Pheophorbid A
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rho 123	Rhodamin 123
RMSD	Root-mean-square deviation
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehungen
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TMD	Transmembranäre Domäne
TMR	Tetramethylrosamin
VBL	Vinblastin

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Familie der ABC-Transporter und ihre pharmazeutische Bedeutung

Die ABC-Transporter stellen eine der größten Familien membranärer Proteine dar, welche ubiquitär sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen exprimiert werden. Sämtliche Vertreter dieser Superfamilie beziehen die für den Transport von Substraten notwendige Energie aus der Hydrolyse bzw. Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) und weisen als typisches Strukturmerkmal eine hochkonservierte ATPase-Domäne (ABC, ATP-binding cassette) auf. Diese setzt sich aus mehreren charakteristischen Aminosäuresequenzen zusammen, darunter die allgemein für Nukleotidbindungsstellen typischen Motive „Walker A“ und „Walker B“ sowie eine auch als „C-Schleife“ bezeichnete spezifische ABC-Signatur [1, 2]. Die Einordnung von Proteinen in die Familie der ABC-Transporter erfolgt daher basierend auf der Sequenz und der Struktur dieser Nukleotidbindungsdomäne (NBD) [3, 4].

Trotz ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer vielfältigen physiologischen Aufgaben besitzen fast alle ABC-Transporter einen charakteristischen Aufbau aus zwei zytoplasmatischen NBDs und zwei transmembranären Domänen (TMDs), welche wiederum aus je sechs  $\alpha$ -Helices aufgebaut sind [4]. Insbesondere in Prokaryonten existieren jedoch auch einige Proteine, welche aus isolierten NBDs bestehen und regulatorischen Einfluss auf bestimmte zelluläre Prozesse nehmen. Die übrigen prokaryotischen Transporter weisen den für die gesamte Familie typischen Aufbau auf, wobei die einzelnen Strukturelemente in der Regel als separate Proteine exprimiert werden, die sich zu einer funktionellen Einheit zusammenlagern. Diese Proteine stellen häufig Importer dar, welche für die Aufnahme essentieller Stoffe verantwortlich sind [5, 6]. Es existieren jedoch auch einige in verschiedene Exkretionsprozesse involvierte Transporter, wie beispielsweise der Phospholipidtransporter MsbA aus *V. cholerae*. Bei diesem handelt es sich um einen der ersten ABC-Transporter, für den eine hochaufgelöste Kristallstruktur erhalten werden konnte [7, 8].

Bei den eukaryotischen ABC-Transportern hingegen handelt es sich in fast allen Fällen um Exporter, welche an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt sind. Im Gegensatz zu

den meisten prokaryotischen Vertretern liegen die funktionellen Untereinheiten (TMDs und NBDs) hier innerhalb eines einzigen Proteins vor [3, 4]. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung eukaryotischer – insbesondere humaner – Transportproteine liegt, sollen diese nachfolgend ausführlicher vorgestellt werden.

### 1.1.1 Humane ABC-Transporter

Bis heute konnten 48 humane ABC-Transporter identifiziert werden, die basierend auf einer phylogenetischen Analyse ihrer Genstruktur in sieben Subfamilien (ABCA-ABCG) unterteilt werden können. Hierbei kommen die meisten humanen Proteine auch in allen anderen Wirbeltieren vor [3, 9]. Eine diesbezügliche Ausnahme stellt insbesondere die Subfamilie ABCA dar, welche die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies aufweist. Die physiologische Funktion der zwölf humanen Transporter dieser Subfamilie ist nur wenig erforscht. Für einige Vertreter konnte jedoch eine Beteiligung am Transport von Cholesterin (ABCA1) und von Vitamin A-Derivaten (ABCA4) nachgewiesen werden [10, 11].

Die Funktion der Transporter aus der Subfamilie ABCB hingegen ist in vielen Fällen gut charakterisiert: Während ABCB1 (P-gp, P-Glykoprotein) eine Vielzahl von Xenobiotika transportiert (siehe Kapitel 1.2.1), werden ABCB4 und ABCB11 in der Leber exprimiert, wo sie für den Transport von Gallensalzen und Phosphatidylcholin verantwortlich sind [12]. Des Weiteren gehört auch eine Reihe von sogenannten Halbtransportern zu dieser Subfamilie. Diese bestehen lediglich aus jeweils nur einer TMD und einer NBD; ein Homo- oder Heterodimer aus zwei Halbtransportern bildet hier die funktionsfähige Einheit. Zu den Halbtransportern der ABCB-Subfamilie zählen neben den im Endoplasmatischen Reticulum lokalisierten Peptidtransportern ABCB2 und ABCB3 auch mehrere in den Eisenmetabolismus involvierte Proteine [3, 9].

Die Subfamilie ABCC wiederum besteht ausschließlich aus „Volltransportern“, die ein breites Spektrum physiologischer Funktionen besitzen. Neben den sogenannten Multidrug Resistance assoziierten Proteinen (MRPs) ABCC1-ABCC6 und ABCC10 sowie dem Chloridionen-Kanal ABCC7 (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [13] zählen hierzu auch die an der Insulinsekretion beteiligten Proteine ABCC8 und ABCC9 (SUR, Sulfonylurea Receptor) [14].

Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Familien umfassen die Subfamilien ABCD-G jeweils eine deutlich geringere Anzahl an Proteinen. Die Subfamilie ABCD besteht aus vier peroxisomalen Halbtransportern, die an der Fettsäureoxidation beteiligt sind während die Subfamilien ABCE und F solche Proteine enthalten, die ausschließlich aus NBDs bestehen

und verschiedene Aufgaben erfüllen. In der Subfamilie ABCG sind sechs inverse Halbtransporter zusammengefasst, die hauptsächlich am Transport verschiedener Sterole beteiligt sind [3, 9]. Zu dieser Subfamilie zählt außerdem das ABCG2 (BCRP, Breast Cancer Resistance Protein), welches unter anderem mit der Resistenzentwicklung bestimmter maligner Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (siehe Kapitel 1.2.2).

### 1.1.2 Pharmazeutische Relevanz humaner ABC-Transporter

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 angedeutet, besitzen die humanen ABC-Transporter vielfältige physiologische Funktionen, aus denen sich eine enorme pharmazeutische Relevanz dieser Proteinfamilie ableitet. So kann eine Reihe von Erkrankungen auf Defekte bestimmter ABC-Transportergene zurückgeführt werden. Des Weiteren haben insbesondere die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachteten Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 einen signifikanten Einfluss auf die Pharmakokinetik unterschiedlicher Arzneistoffe oder können an der Resistenzentwicklung maligner Tumoren gegenüber verschiedenen Zytostatika beteiligt sein.

#### Transporter assoziierte Erkrankungen

Zum heutigen Zeitpunkt ist eine Reihe von Erkrankungen bekannt, die auf Gendefekte humaner ABC-Transporter zurückgeführt werden können (Zusammenfassung siehe Tabelle 1.1). Diese Defekte werden autosomal rezessiv vererbt und führen in der Regel zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust des entsprechenden Proteins [9]. Aufgrund der multiplen physiologischen Funktionen mancher ABC-Transporter und der Existenz unterschiedlicher Genotypen äußern sich diese Erkrankungen häufig in sehr variablen Symptomkomplexen oder in einer Erhöhung des Risikos für bestimmte Erkrankungen [3, 9].

Ein diesbezügliches Beispiel stellen die in der Leber exprimierten Transporter ABCB4 und ABCB11 dar, die für den Transport von Phosphatidylcholin und Gallensalzen verantwortlich sind. Homozygote Mutationen dieser ABC-Transportergene führen zur intrahepatischen Cholestase, die aufgrund von Leberzirrhose und -versagen meist früh einen tödlichen Verlauf nimmt. Frauen mit heterozygoter Mutation der entsprechenden Gene weisen hingegen lediglich ein erhöhtes Cholestaserisiko in der Schwangerschaft auf [15].

#### Beeinflussung der Arzneistoffwirkung durch ABC-Transporter

ABC-Transporter spielen des Weiteren eine große Rolle in der Pharmakotherapie verschiedener Erkrankungen. So greifen beispielsweise die in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzten Sulfonylharnstoffe an dem im Pankreas an der Insulinausschüttung beteiligten Protein ABCC8 (SUR1) an [3, 16]. Insgesamt sind jedoch nur wenige Arzneistoffe

**Tabelle 1.1:** Durch Defekte humaner ABC-Transportergene verursachte Erkrankungen (nach [3, 9]).

<b>Gen</b>	<b>Erkrankung</b>
ABCA1	Tangier-Krankheit, familiäre Hypoalphalipoproteinämie
ABCA3	Surfactantmangel
ABCA4	Stargardt-Syndrom, Retinitis pigmentosa, Maculadegeneration
ABCA12	Lamelläre Ichtyosis
ABCB2	Immunschwäche
ABCB3	Immunschwäche
ABCB4	Progressives familiäres intrahepatisches Cholestasesyndrom (Typ 3)
ABCB7	Sideroblastische Anämie
ABCB11	Progressives familiäres intrahepatisches Cholestasesyndrom (Typ 2)
ABCC2	Dubin-Johnson-Syndrom
ABCC6	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC7	Zystische Fibrose
ABCC8	Familiäre persistierende hyperinsuline Hypoglykämie des Kindesalters
ABCD1	Adrenoleukodystrophie
ABCG5	Sitosterolämie
ABCG8	Sitosterolämie

bekannt, die ihre pharmakodynamische Wirkung durch eine direkte Interaktion mit einem ABC-Transporter entfalten.

Viele ABC-Transporter besitzen jedoch aufgrund der Tatsache, dass sie vorwiegend in Geweben mit einer physiologischen Barrierefunktion exprimiert werden, einen entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik verschiedenster Arzneistoffe. Hierzu zählen beispielsweise die Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 [17]. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit insbesondere auf der Untersuchung des ABCB1 lag, soll nachfolgend dessen pharmakokinetische Relevanz exemplarisch umrissen werden.

Für ABCB1 konnte in der Vergangenheit eine Expression in einer Vielzahl von Geweben, unter anderem in Dünndarm, Leber, Niere, Testes, Placenta sowie der luminalen Seite der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, nachgewiesen werden. Somit wird das Protein, in solchen Geweben exprimiert, die eine protektive Funktion für die angrenzenden empfindlichen Organe besitzen [18–20]. Aufgrund dieser Lokalisation besitzt ABCB1 einen entscheidenden Einfluss auf die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination (ADME) vieler Arzneistoffe [21]: Die Expression von ABCB1 im Dünndarm führt zu einer drastischen Verringerung der peroralen Bioverfügbarkeit vieler Arzneistoffe, die Substrate dieses Transporters darstellen. So wurde beispielsweise in ABCB1 defizienten Mäusen eine deutlich erhöhte systemische Verfügbarkeit von peroral appliziertem Paclitaxel beobachtet [21].

Auch die Verteilung von Arzneistoffen im Organismus wird durch ABCB1 maßgeblich be-

einflusst. Hierbei reduziert insbesondere das in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte Protein die ZNS-Gängigkeit vieler Wirkstoffe. So wurde unter anderem beobachtet, dass eine Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Antiepileptika mit einer erhöhten Expression dieses Transporters in bestimmten Hirnregionen einhergeht [22]. Des Weiteren wird die medikamentöse Therapie von HIV-Infektionen und Gehirntumoren aufgrund des Substratcharakters vieler hierzu eingesetzter Arzneistoffe ebenfalls negativ beeinflusst [21, 23]. Schließlich ist ABCB1 aufgrund seiner Expression in Leber und Niere auch an der hepatischen und renalen Elimination von Wirkstoffen beteiligt [21].

Aus der zuvor beschriebenen Beteiligung des ABCB1 an unterschiedlichen pharmakokinetischen Prozessen ergibt sich außerdem eine Vielzahl von möglichen Arzneistoffinteraktionen zwischen Substraten und Hemmstoffen des Transporters. In Anwesenheit des ABCB1 Inhibitors Chinidin konnten beispielsweise deutlich erhöhte Plasmaspiegel von peroral appliziertem Digoxin festgestellt werden: Aufgrund der Hemmung des Transporters durch Chinidin wird das Herzglykosid im Dünndarm verstärkt aufgenommen [24]. Ein weiteres diesbezügliches Beispiel stellt die bei langfristiger Therapie mit Johanniskrautextrakten auftretende reduzierte Bioverfügbarkeit verschiedener Arzneistoffe dar. Diese ist auf die gleichzeitige Induktion von ABCB1 und metabolisierenden Enzymen wie CYP3A4 durch Inhaltsstoffe des Johanniskrauts zurückzuführen [25]. Dieses Beispiel verdeutlicht außerdem das überlappende Substrat- und Induktorspektrum sowie das Zusammenspiel von Cytochrom P450 Enzymen und ABCB1 bei der Aufnahme und Metabolisierung einer Vielzahl von Wirkstoffen [21, 26].

### **ABC-Transporter und Zytostatikaresistenz**

Die Chemotherapie mit zytostatisch wirksamen Arzneistoffen stellt einen wichtigen Bestandteil der Therapie maligner Erkrankungen dar. Ihr Erfolg wird jedoch in vielen Fällen durch die Entwicklung einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber den eingesetzten Zytostatika verhindert. Dies kann zum einen durch Mechanismen geschehen, die für einen bestimmten Arzneistoff oder eine definierte Substanzgruppe spezifisch sind. So führt unter anderem die erhöhte Expression der Dihydrofolatreduktase zur Resistenz gegenüber Methotrexat, dessen Angriffspunkt dieses Enzym darstellt [27]. Zum anderen existiert eine Vielzahl unspezifischer Mechanismen, die zu einem Wirkungsverlust verschiedener Wirkstoffklassen führen können. Hierzu können beispielsweise eine verstärkte DNA-Reparatur, eine Verringerung apoptotischer Signaltransduktionswege oder die Anwesenheit von sich nicht teilenden Zellen innerhalb eines soliden Tumors gezählt werden [27].

Auch eine Reihe von ABC-Transportern wird mit der Entwicklung einer unspezifischen Resistenz gegenüber einer Vielzahl sowohl strukturell als auch mechanistisch differierender Zytostatika in Verbindung gebracht [28]. Dies konnte erstmalig 1976 am Beispiel des ABCB1

beobachtet werden: Mit Colchicin selektionierte resistente CHO-Zellen wiesen eine Kreuzresistenz gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Chemotherapeutika auf [29]. Diese multiple Zytostatikaresistenz wird auch als MDR (Multidrug Resistance) bezeichnet. Ueda *et al.* konnten kurz darauf durch Transfektion sensitiver Zellen mit dem humanen *ABCB1*-Gen nachweisen, dass dieser sogenannte klassische MDR-Phänotyp auf die alleinige Expression dieses Transporters in der Zellmembran – und den damit verbundenen aktiven Efflux verschiedener Zytostatika aus der Zelle – zurückzuführen ist [30]. Ähnliche Effekte konnten später auch für eine Reihe weiterer ABC-Transporter beobachtet werden. Hierzu zählen unter anderem die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls betrachteten Proteine ABCC1 und ABCG2 [31].

Die tatsächliche klinische Relevanz der Transporter assoziierten MDR konnte bis heute noch nicht abschließend beurteilt werden. Als gesichert gilt jedoch eine Rolle des ABCB1 in der Resistenzentwicklung einiger hämatologischer Erkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) sowie bestimmter solider Tumore [32, 33]. Insbesondere maligne Entartungen von Geweben, die bereits durch eine hohe physiologische Expression von ABCB1 gekennzeichnet sind, können dabei eine sogenannte intrinsische MDR aufweisen; die Unempfindlichkeit kann sich jedoch auch während der Behandlung durch die Selektion resistenter Zellen entwickeln [27].

Eine Beteiligung an der Resistenzentwicklung der AML gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutika gilt auch für ABCG2 als erwiesen. Im Falle sonstiger Tumorentitäten ist die klinische Datenlage hinsichtlich einer möglichen Beteiligung dieses Transporters jedoch nicht eindeutig [34]. Ähnliches gilt auch für eine Reihe weiterer ABC-Transporter, unter anderem ABCC1 [31].

Trotz der nachgewiesenen Relevanz einiger ABC-Transporter ist jedoch nicht davon auszugehen, dass eine klinisch signifikante multiple Zytostatikaresistenz allein auf deren Expression im Tumorgewebe zurückzuführen ist. Zwar wurde ursprünglich in unterschiedlichen selektionierten Zelllinien gezeigt, dass diese polyspezifischen Transportproteine, insbesondere ABCB1, eine Ursache des klassischen MDR-Phänotyps darstellen, neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass zusätzlich eine Vielzahl weiterer Mechanismen an der Entwicklung dieser Form der Zytostatikaresistenz beteiligt ist [35].

Der thematische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Betrachtung der drei genannten Transporter, insbesondere des ABCB1. Im nachfolgenden Kapitel soll daher insbesondere dieses Protein ausführlicher vorgestellt werden. Da ABCG2 und ABCC1 hier nur eine untergeordnete Rolle spielen und sich viele der für ABCB1 dargestellten allgemeinen Aspekte auch auf diese übertragen lassen, wird auf diese Proteine nur kurz eingegangen.



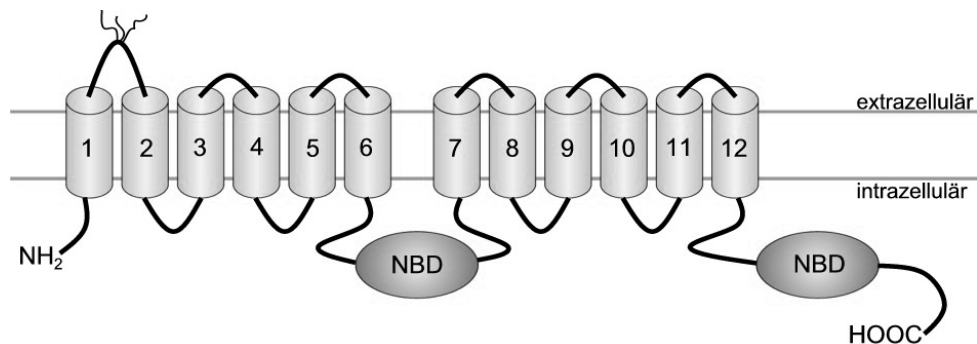
## 1.2 Die MDR-assoziierten Transporter ABCB1, ABCG2 und ABCC1

### 1.2.1 ABCB1

Im Jahr 1976 entdeckten Juliano und Ling in Colchicin-selektionierten CHO-Zellen mit der Nager-Isoform des ABCB1 den ersten MDR-assoziierten eukaryotischen ABC-Transporter [29]. Das in der apikalen Membran polarisierter Zellen vorkommende, etwa 170 kDa große Protein wurde inzwischen intensiv untersucht und stellt daher heute das am besten charakterisierte eukaryotische ABC-Protein dar [17, 20]. Aufgrund seiner Expression in Geweben mit physiologischer Barrierefunktion kommt ihm eine wichtige Schutzfunktion vor potentiell toxischen Xenobiotika zu [17, 20, 36].

ABCB1 besteht aus 1280 Aminosäuren und weist den typischen Aufbau eines eukaryotischen ABC-Transporters, bestehend aus zwei intrazellulär lokalisierten NBDs und zwei TMDs, die aus jeweils sechs transmembranären  $\alpha$ -Helices zusammengesetzt sind, auf [17, 28, 37]. In Abbildung 1.1 ist das Topologiemodell des ABCB1 schematisch dargestellt: Es wird deutlich, dass das Protein zwei homologe Hälften aufweist, die über einen Linker von etwa 75 Aminosäuren Länge verbunden sind [37]. Des Weiteren ist das Protein an drei Asparaginsäureresten im ersten extrazellulären Loop N-glykosiliert. Die N-Glykosilierung besitzt jedoch keinen Einfluss auf die Transportfunktion oder das Substratspektrum des ABCB1; es wird vermutet, dass sie eine Rolle für die korrekte Faltung des Proteins im Endoplasmatischen Reticulum spielt [17, 38].

In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die Bindung der zumeist lipophilen Substrate (siehe Kapitel 1.2.1.1) innerhalb der TMDs erfolgt. In Mutationsstudien konnten Loo *et al.* eine Beteiligung unterschiedlicher transmembranärer Helices an der Substratbindung nachweisen [39–41]. Unterstützt werden diese Erkenntnisse durch Photolabelingexperimente weiterer Autoren [42, 43]. Der Transport der Substrate erfolgt dabei vermutlich direkt aus der Zellmembran, wo sich diese aufgrund ihrer Lipophilie anreichern und an den Transporter binden können [44–46]. Diese Hypothesen wurden bereits früh durch niedrig aufgelöste elektronenmikroskopische Strukturen des ABCB1 unterstützt [47, 48]. Es ist jedoch bislang nicht bekannt, wie der Transportvorgang nach der Bindung der Substrate in der Zellmembran abläuft. So erscheint es möglich, dass die Substanzen von der inneren in die äußere Membranhälfte transportiert werden und von dort aus in das extrazelluläre Medium diffundieren (Flippase Modell). Gemäß dem HVC-Modell (Hydrophobic Vacuum Cleaner) erfolgt der Transport hingegen aus der Zytoplasmamembran direkt in den Extrazellularraum [49].



**Abbildung 1.1:** Topologiemodell des ABCB1 bestehend aus zwei Hälften mit je einer NBD (dunkelgrau) und sechs transmembranären Helices (hellgrau). Der erste extrazelluläre Loop ist N-glykosyliert.

Die Energie für den aktiven Transport wird wie bei allen ABC-Transportern aus der Hydrolyse von ATP an den NBDs gewonnen. Hierzu werden beide NBDs benötigt, die sich bei der Bindung von vermutlich zwei ATP-Molekülen zu einem Dimer zusammenlagern. Die eigentliche ATP-Bindungsstelle wird dabei aus den Walker A und B Motiven der einen und der C-Schleife der anderen NBD gebildet [2, 49]. Die Hydrolyse des Nukleotids führt schließlich zu Konformationsänderungen innerhalb der TMDs, welche den Transport des Substrats induzieren, wobei der exakte Mechanismus der Kopplung von ATPase- und Transportaktivität noch nicht aufgeklärt werden konnte. Diesbezüglich wurde jedoch eine Reihe von Modellen erstellt, auf welche in Kapitel 1.2.1.2 näher eingegangen wird.

Die im Jahr 2009 publizierte Kristallstruktur (Auflösung 3,8 Å) des zum humanen ABCB1 zu 87 % homologen murinen Transporters bestätigte viele der zuvor beschriebenen, anhand grundlegender biochemischer Untersuchungen und niedrig aufgelöster Strukturen aufgestellten Theorien. Durch Kokristallisation des Proteins mit dem gegenüber ABCB1 inhibitorisch wirksamen Hexapeptid QZ59 konnte beispielsweise die Bindung von Liganden innerhalb der TMDs nachgewiesen werden [50]. Diese in Abwesenheit von ATP erhaltene Kristallstruktur spiegelt eine offene Konformation des Proteins wider. Informationen bezüglich der geschlossenen Konformation können hingegen aus Homologiemodellen gewonnen werden, die z.B. basierend auf der Kristallstruktur des bakteriellen ABC-Transporters Sav1866 erstellt worden sind [51, 52].

### 1.2.1.1 Substratspektrum

Als Substrate werden solche Verbindungen bezeichnet, die durch ABCB1 aktiv transportiert werden. Davon abzugrenzen sind Modulatoren, welche an das Protein binden und dessen Funktion beeinflussen. Es sei an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen, dass eine Reihe von Verbindungen existiert, die beide Eigenschaften besitzen [28, 36].

**Tabelle 1.2:** Substrate von ABCB1 (Auswahl nach [17], [28], und [36]).

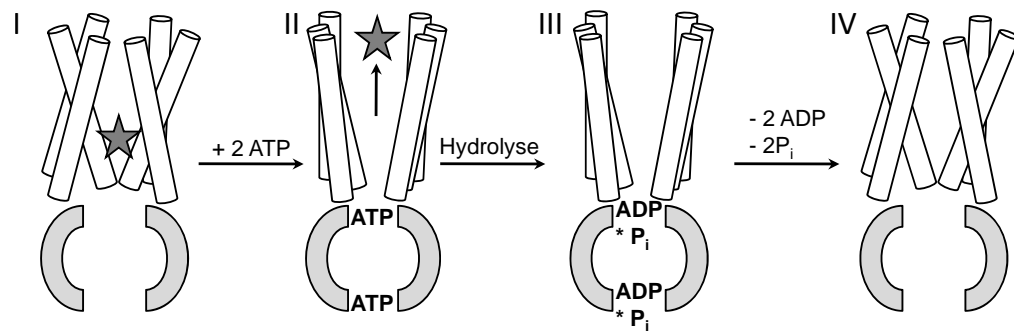
Klasse		Beispiele
Zytostatika	Anthrazykline	Daunorubicin, Doxorubicin
	Anthracene	Mitoxantron
	Mitosehemmstoffe	<i>Vinca</i> -Alkaloide, Taxane, Colchicin
	Tyrosinkinasehemmer	Imatinib, Gefitinib
	Sonstige	Topotecan, Etoposid
Virustatika	Proteaseinhibitoren	Ritonavir, Saquinavir
Herz-Kreislauf	Herzglykoside	Digoxin
	Ca-Antagonisten	Nifedipin, Verapamil, Diltiazem
	Antihypertensiva	Propranolol, Reserpin
Sonstige Arzneistoffe	Steroide	Dexamethason, Hydrocortison
	Immunsuppressiva	Ciclosporin, Tacrolimus
	Opioide	Morphin, Loperamid
	Antihistaminika	Cimetidin, Terfenadin
Fluoreszenzfarbstoffe		Rhodamin 123, Calcein-AM, Tetramethylrosamin, Hoechst 33342

Das Substratspektrum des ABCB1 umfasst eine Vielzahl strukturell äußerst diverser Substanzen, darunter auch viele Arzneistoffe. Anhand der kleinen Auswahl von Verbindungen in Tabelle 1.2 wird deutlich, dass die Substrate des Transporters insgesamt nur sehr wenige gemeinsame Strukturmerkmale aufweisen: In der Regel haben die Substanzen ein Molekulargewicht zwischen 200 und 1900 kDa und besitzen aromatische Partialstrukturen. Des Weiteren handelt es sich häufig um lipophile, schwach basische Moleküle, die bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegen. Anionische Verbindungen werden hingegen nicht transportiert [17, 28].

Aus dem breiten Spektrum von Substanzen, die durch ABCB1 transportiert werden, und der Expression des Transporters in Geweben mit einer Barrierefunktion ergibt sich die große pharmazeutische Relevanz des Proteins. Auf diesen Aspekt wurde bereits in Kapitel 1.1.2 eingegangen, sodass er an dieser Stelle nicht näher erläutert werden soll.

### 1.2.1.2 Transportmechanismus

Der exakte Mechanismus des Transports von Substraten durch ABCB1 konnte bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es existiert jedoch eine Reihe von Modellen, die den möglichen Transportzyklus des Proteins beschreiben. Diese lassen sich auch auf andere ABC-Transporter wie beispielsweise ABCC1 und ABCG2 übertragen oder stellen die Grundlage



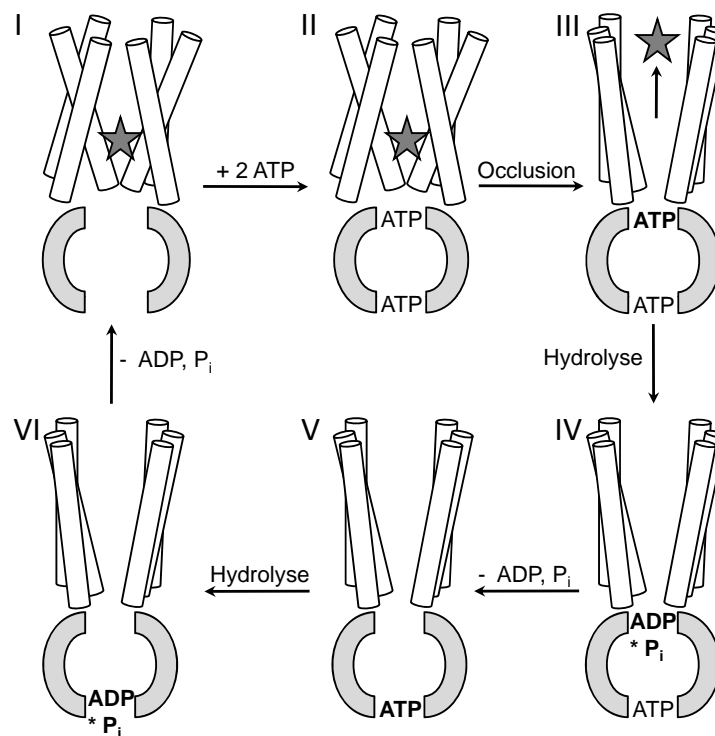
**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des Transportzyklus des ABCB1 gemäß dem „ATP-Switch Modell“ (modifiziert nach [56]). Dargestellt sind jeweils die TMDs (weiß), die NBDs (hellgrau) sowie das Substrat (Stern).

jener Modelle dar, die eigens für diese Proteine entwickelt wurden [53, 54]. Die wichtigsten Transportmodelle sollen nachfolgend kurz vorgestellt werden.

Bereits 1995 postulierten Senior *et al.* einen Transportzyklus, bei dem die Hydrolyse von ATP alternierend an beiden NBDs erfolgt [55]. Basierend auf dieser Hypothese wurden nach intensiveren biochemischen Untersuchungen des Proteins weitere Modelle erstellt, welche diese frühen Erkenntnisse grundsätzlich unterstützen. Hierbei werden insbesondere das von Higgins und Linton publizierte „ATP-Switch Modell“ sowie das sogenannte „Occlusion-induced-Switch Modell“ nach Sauna und Ambudkar diskutiert [1].

Der hypothetische Transportzyklus nach dem „ATP-Switch Modell“ ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt: Im Grundzustand liegt das Protein in einer offenen Konformation vor. In einem ersten Schritt bindet das Substrat an die High-Affinity Site innerhalb der TMDs, was zu einer Erhöhung der Affinität gegenüber ATP führt. Im zweiten Schritt induziert die Bindung von zwei Molekülen ATP die Dimerisierung der NBDs, welche wiederum die Öffnung der TMDs nach außen und die Freisetzung des Substrats von der sogenannten Low-Affinity Site nach sich zieht. Anschließend führt die Hydrolyse beider Moleküle ATP (Schritt III) sowie die sequentielle Freisetzung von ADP und Phosphat (Schritt IV) zur Rückkehr in den basalen Zustand mit hoher Substrataffinität [2, 56].

Das in Abbildung 1.3 schematisch dargestellte „Occlusion-induced-Switch Modell“ ähnelt dem zuvor beschriebenen in einigen Punkten: Zu Beginn des Transportzyklus liegt der Transporter auch hier in einem Grundzustand mit hoher Substrataffinität vor. Die Bindung des Substrats sowie zweier Moleküle ATP mit anschließender Dimerisierung der NBDs initiiert dann den Transportvorgang (I,II). Allerdings wird bei diesem Modell davon ausgegangen, dass im NBD-Dimer zunächst nur eine lockere Bindung des Nukleotids erfolgt; erst der feste Einschluss („Occlusion“) eines Moleküls ATP führt zur Ausbildung des Low-Affinity States (III). Durch Hydrolyse des fest gebundenen ATP wird das Substrat dann endgültig in den



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des Transportzyklus des ABCB1 gemäß dem „Occlusion-induced-Switch Mechanismus“ (modifiziert nach [1]). Dargestellt sind jeweils die TMDs (weiß), die NBDs (hellgrau) sowie das Substrat (Stern).

extrazellulären Raum freigesetzt (IV). Der Einschluss und die Spaltung des zweiten Moleküls ATP führt schließlich zur Rückkehr des Proteins in den basalen Zustand (V,VI) [57, 58].

Ein neueres, darauf basierendes Modell für den den Transportzyklus des ABCB1 wurde im Jahr 2010 durch die Arbeitsgruppe um F. Sharom entwickelt (ohne Abbildung). Die Autoren gehen davon aus, dass die NBDs im inaktiven Zustand in Form eines „symmetrischen“ Dimers mit zwei nur locker gebundenen Molekülen ATP vorliegen. Ist das Protein katalytisch aktiv, erfolgt die feste Bindung eines der ATP-Moleküle sowie die Anlagerung des Substrats. Dieses wird durch die Hydrolyse des fest gebundenen Nukleotids freigesetzt, wobei nun das zweite Molekül ATP fest eingeschlossen wird. Das nun locker gebundene, bei der Spaltung gebildete ADP wird dann freigesetzt und durch ein neues ATP-Molekül substituiert, sodass der Zyklus in analoger Art und Weise fortgesetzt werden kann. Der katalytisch aktive ABC-Transporter liegt damit immer in einem sogenannten „asymmetrischen“ Zustand mit einem fest und einem locker gebundenen Molekül ATP oder ADP vor [59].

Neben den vorgestellten Modellen ist in der Literatur eine Reihe weiterer möglicher Transportzyklen beschrieben. Hierzu zählt unter anderem das von Callaghan *et al.* postulierte, auf thermodynamischen Betrachtungen basierende „Thermodynamic-Transition Modell“, wel-

ches in seinen Grundzügen dem „ATP-Switch Modell“ stark ähnelt [60]. Die Tatsache, dass ABCB1 auch in Abwesenheit eines Substrats eine basale ATPase-Aktivität besitzt, welche durch Inhibitoren und Substrate stimuliert werden kann, wird in einem von Al-Shawi *et al.* publizierten potentiellen Transportmechanismus berücksichtigt [61].

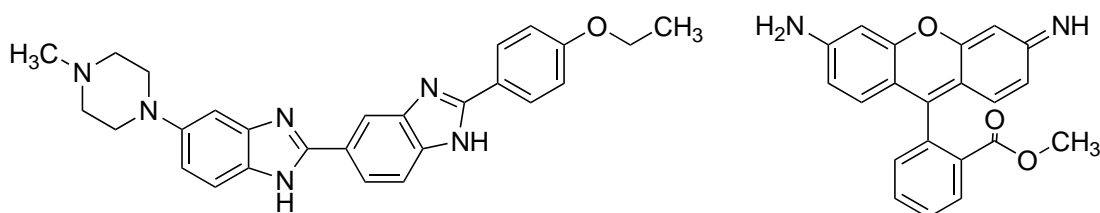
### 1.2.1.3 Bindungsstellen

Insbesondere vor dem Hintergrund der Polyspezifität des ABCB1 stellt sich die Frage nach der Anzahl und Lokalisation seiner möglichen Bindungsstellen. Beide Aspekte konnten bis heute zwar noch nicht vollständig aufgeklärt werden, es existiert jedoch eine Vielzahl von Publikationen, welche die Existenz mehrerer Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden postulieren.

Wie bereits erwähnt wurde, gilt es als erwiesen, dass die Bindungsstellen des Proteins innerhalb der TMDs lokalisiert sind. So konnte in verschiedenen Mutationsstudien und Photolabelingexperimenten gezeigt werden, dass Aminosäuren aus fast allen TMDs (1, 4-7, 9-12) an der Bindung von Substraten und Modulatoren beteiligt sind [39–43, 62]. Daneben beschäftigt sich eine Vielzahl von Studien mit der Untersuchung möglicher Bindungsstellen und deren Interaktionen auf funktioneller Ebene [63]. Über diese soll nachfolgend ein kurzer Überblick gegeben werden.

Shapiro und Ling konnten durch Fluoreszenzmessungen an ABCB1-haltigen Plasmamembranvesikeln zeigen, dass die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342 (siehe Abbildung 1.4) an zwei unterschiedliche Bindungsstellen binden, die sich gegenseitig im Sinne einer positiven Kooperativität beeinflussen [64]. Diese werden entsprechend der beiden Liganden als Rhodamin- und Hoechst-Bindungsstelle bezeichnet und zeichnen sich durch eine unterschiedliche Substratspezifität aus: Während neben Hoechst 33342 z.B. Colchicin und Quercetin Affinität zur Hoechst-Bindungsstelle besitzen, binden Rhodamin 123, das Chinolinderivat LDS-751 sowie Anthrazykline an die Rhodamin-Bindungsstelle des Proteins [64, 65]. In einer späteren Arbeit konnten die Autoren die Existenz einer dritten regulatorischen Bindungsstelle nachweisen, an welcher Prazosin und Progesteron binden [66].

Die Lokalisation dieser Bindungsstellen wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht: In Mutationsstudien konnte beispielsweise die Beteiligung der TMDs 6,9 und 12 an der Bindung des Thiol-reaktiven MTS-Rhodamin gezeigt werden [67]. Die Arbeitsgruppe um F. Sharom hingegen untersuchte die räumliche Lage dieser Bindungsstelle mittels FRET-basierter Techniken und postulierte deren Lokalisation in einem intrazellulären Bereich nahe der NBDs [68]. In analoger Art und Weise wurde gezeigt, dass sich die Hoechst-Bindungsstelle



**Abbildung 1.4:** Strukturformeln von Hoechst 33342 (links) und Rhodamin 123 (rechts).

vermutlich ebenfalls innerhalb der intrazellulären Hälfte der Zytoplasmamembran, jedoch in größerer Entfernung zu den NBDs, befindet [69].

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen von Shapiro und Ling postulierten Martin *et al.* basierend auf Radioligandbindungsstudien die Existenz von mindestens vier negativ kooperativ interagierenden Bindungsstellen, von denen drei eine Transportfunktion besitzen. Die vierte Bindungsstelle, an die GF120918 und Nicardipin binden, weist hingegen nur eine regulatorische Funktion auf. Das Bindungsverhalten des Rhodamin 123, welches eine zentrale Rolle in dem von Shapiro und Ling publizierten Modell besitzt, konnte in dieser Studie nicht eindeutig charakterisiert werden [70].

Neben den zuvor vorgestellten Beispielen existiert eine Reihe weiterer Studien, die meist basierend auf funktionellen Untersuchungen und Literaturdaten bis zu sieben verschiedene Bindungsstellen vorschlagen [71–74]. Auf diese soll jedoch an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

Trotz der großen Anzahl von Untersuchungen, die sich mit dieser Thematik befassen, konnte bislang nicht aufgeklärt werden, ob die verschiedenen Bindungsstellen als unterschiedliche bevorzugte Erkennungsregionen innerhalb der großen Bindungstasche des ABCB1 realisiert sind oder ob es sich um einzelne streng definierte Bindungsstellen handelt. Auf die erstgenannte Möglichkeit deutet z.B. die Tatsache hin, dass Rhodamin 123 und LDS-751, welche laut Shapiro und Ling beide Affinität zur Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 besitzen, gleichzeitig an das Protein binden können [75]. Daneben erscheint auch das Vorliegen eines Induced-Fit Mechanismus möglich, bei welchem die eigentliche Bindungsstelle erst bei Bindung des Substrats durch eine individuelle Konformationsänderung korrekt ausgebildet wird [76].

### 1.2.2 ABCG2

Der Halbtransporter ABCG2 wurde im Jahr 1998 zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen entdeckt: Doyle *et al.* wiesen das Protein in der durch Selektion mit Doxorubicin und Verapamil gewonnen Mammakarzinomzelllinie MCF-7/AdrVp nach, die resistent gegenüber

verschiedenen Zytostatika war ohne die bis dahin bekannten MDR-assoziierten Transporter ABCB1 und ABCC1 zu exprimieren [77]. Parallel dazu entdeckten Allikmets *et al.* das *ABCG2* Gen in humanem Plazentagewebe [78]. Die Arbeitsgruppe um S. Bates wiederum konnte die entsprechende cDNA aus der gegenüber Mitoxantron resistenten Colonkarzinomzelllinie S1-M1-80 isolieren [79].

ABCG2 besteht aus 665 Aminosäuren und besitzt im glykosilierten Zustand ein Molekulargewicht von 72 kDa. Es handelt sich um einen aus sechs transmembranären  $\alpha$ -Helices aufgebauten inversen Halbtransporter, bei welchem sich die intrazelluläre NBD – anders als im Falle vieler sonstiger ABC-Transporter – am N-Terminus des Proteins befindet [80, 81]. Ähnlich wie für ABCB1 beschrieben, besitzt auch hier die Glykosylierung keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Transporters [82]. Um eine funktionsfähige Einheit zu bilden, muss ABCG2 als Halbtransporter jedoch dimerisieren. Kage *et al.* wiesen mittels Gelelektrophorese nach, dass die Dimerisierung durch die Bildung von Disulfidbrücken erfolgt: Unter nicht reduzierenden Versuchsbedingungen kann ABCG2 als Dimer mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa detektiert werden, während in Anwesenheit des reduzierenden Agens 2-Mercaptoethanol nur das Monomer nachgewiesen werden kann [83]. Neben einem Dimer als funktionsfähige Einheit des ABCG2 werden von einigen Autoren auch Tetramere oder größere Oligomere diskutiert [84–86].

ABCG2 wird ähnlich wie ABCB1 hauptsächlich in solchen Geweben exprimiert, die eine physiologische Barrierefunktion besitzen. So konnte insbesondere eine sehr hohe Expression des Transporters in der Plazenta festgestellt werden, wo es den sich entwickelnden Fetus vor dem Einfluss potentiell toxischer Xenobiotika schützt. Daneben wurde ABCG2 unter anderem im Dünndarm, in Leber und Niere sowie den Testes nachgewiesen [81]. Aufgrund der Lokalisation des Proteins in den genannten Geweben besitzt es eine ähnliche physiologische Funktion, wie sie bereits in Kapitel 1.1.2 am Beispiel des ABCB1 erläutert wurde [81, 87]. Die Überexpression von ABCG2 kann des Weiteren zur Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber verschiedenen Zytostatika beitragen. Dies wurde *in vitro* schon früh anhand verschiedener Tumorzelllinien gezeigt: Zelllinien, die das Protein exprimieren, wiesen einen klassischen MDR-Phänotyp auf [88]. Die tatsächliche klinische Relevanz des ABCG2 in der Tumorthherapie konnte jedoch wie in Kapitel 1.1.2 erwähnt bislang nicht geklärt werden [34].

Daneben besitzt ABCG2 jedoch auch für dieses Protein spezifische Aufgaben. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transporters in der weiblichen Brustdrüse am Ende der Schwangerschaft sowie während der Stillzeit erhöht ist. Es wird vermutet, dass ABCG2 an der Sekretion von Nährstoffen wie beispielsweise des Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) in die Muttermilch beteiligt ist. Daneben können auf diesem Weg auch Arzneistoffe, die Sub-



**Tabelle 1.3:** Substrate von ABCG2 und ABCC1 (Auswahl nach [28, 36, 81, 91] und [54]). Die mit „\*“ gekennzeichneten Verbindungen werden nur durch die Mutanten R482T und R482G des ABCG2 transportiert.

Klasse	ABCG2	ABCC1
Zytostatika	Daunorubicin *	Daunorubicin
	Doxorubicin *	Doxorubicin
	Mitoxantron	Methotrexat
	Methotrexat	<i>Vinca</i> -Alkaloide
	Irinotecan (SN-38)	Irinotecan
	Topotecan	Topotecan
	Etoposid *	
Antibiotika	Ciprofloxacin	
	Erythromycin	
	Nitrofurantoin	
Virustatika	Lamivudin	Ritonavir
	Zidovudin	Saquinavir
	Abacavir	
Glukuronid- und Sulfatkonjugate	Estradiol-17- $\beta$ -D-glukuronid	Estradiol-17- $\beta$ -D-glukuronid
	Dehydroepiandrosteron-3-sulfat	Dehydroepiandrosteron-3-sulfat
		Etoposidglukuronid
Sonstige Substanzen	Aflatoxin B1	Aflatoxin B1
	Cerivastatin	Leukotrien C <sub>4</sub>
	Cimetidin	Arsen- und Antimonverbindungen
	Nitrendipin	GSSG
	Imatinibmesylat	Imatinibmesylat
	Riboflavin	
Fluoreszenzfarbstoffe	Pheophorbid A	Calcein-AM
	Hoechst 33342	
	Rhodamin 123 *	

strate des Transporters sind, in den kindlichen Organismus gelangen [89, 90]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass eine bestimmte Population hämatopoetischer Stammzellen, die sogenannte „Side Population“, eine hohe Expression des Proteins aufweist. Ein Einfluss auf die Hämatopoese konnte jedoch nicht festgestellt werden, sodass davon ausgegangen wird, dass es auch hier eine protektive Funktion besitzt [89].

ABCG2 besitzt ein breites, teilweise mit dem des ABCB1 und des ABCC1 überlappendes Substratspektrum (siehe Tabelle 1.3). Zu den transportierten Substanzen zählen neben einer Reihe von Zytostatika auch weitere Arzneistoffe, Nahrungstoxine sowie verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, welche in funktionellen Testsystemen zur Untersuchung des ABCG2 vermittelten Transports eingesetzt werden können.

Maßgeblich beeinflusst wird das Spektrum der transportierten Substanzen interessanterweise durch eine Punktmutation in Position 482 der Aminosäuresequenz: Der Austausch von Arginin gegen Threonin (R482T) oder Glycin (R482G) führt dazu, dass beispielsweise auch Anthrazykline, Etoposid und Rhodamin 123 transportiert werden [92]. Des Weiteren kommt es durch diese Mutation zum Verlust der Fähigkeit des ABCG2 das Folsäureanalogon Methotrexat zu transportieren [93]. Die genannten Mutationen wurden bislang jedoch nicht in klinischen Proben sondern ausschließlich in Zelllinien, die durch Selektion mit Zytostatika gewonnen wurden, nachgewiesen. Eine klinische Relevanz des veränderten Substratspektrums ist demnach nicht anzunehmen [36].

### 1.2.3 ABCC1

Der Transporter ABCC1 wurde im Jahre 1992 von Cole *et al.* in der mit Doxorubicin behandelten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie H69AR entdeckt. Ähnlich wie im Falle des ABCG2 wiesen auch diese Zellen eine multiple Zytostatikaresistenz auf, ohne jedoch den bis dahin einzigen bekannten MDR-assoziierten Transporter ABCB1 zu exprimieren [94].

ABCC1 besteht aus 1531 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 190 kDa, wobei es grundsätzlich den typischen Aufbau eines eukaryotischen ABC-Transporters aufweist. Im Gegensatz zu beispielsweise ABCB1 besitzt ABCC1 jedoch eine zusätzliche N-terminale transmembranäre Domäne (MSD0), welche jedoch nur aus fünf  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist; der N-Terminus des Proteins befindet sich somit extrazellulär [54, 95]. Diese zusätzliche TMD besitzt allerdings keinen Einfluss auf die Transportfunktion des ABCC1. Bestimmte Teile der Linkerregion zwischen der MSD0 und der ersten vollständigen transmembranären Domäne sind jedoch sowohl für den Transport als auch für den korrekten Einbau in die Zellmembran essentiell [54, 96]. Die Glykosylierung des Proteins erfolgt an Asparaginresten nahe des N-Terminus sowie im extrazellulären Loop zwischen den  $\alpha$ -Helices 12 und 13 und besitzt ebenfalls keinen Einfluss auf die Funktion des Transporters [91, 95].

ABCC1 wird im menschlichen Körper in einer Vielzahl von Organen exprimiert. Große Mengen des Transporters können dabei insbesondere in der Lunge, der Niere, der Plazenta, den Testes sowie in Herz- und Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu ABCB1 und ABCG2 wird ABCC1 jedoch hauptsächlich auf der basolateralen Seite polarisierter Epithelzellen exprimiert. Entsprechend dieses ubiquitären Vorkommens besitzt ABCC1 vermutlich ebenfalls eine protektive Funktion für empfindliche Gewebe. Da ABCC1 außerdem in der Lage ist, die oxidierte Form des Glutathion (GSSG) zu transportieren, wird vermutet, dass es außerdem eine Schutzfunktion gegenüber zellulärem Stress besitzt [54, 91].

Zu den Substraten, die durch ABCC1 transportiert werden, zählen außer einer Reihe von Zytostatika auch verschiedene Glukuronid- und Sulfat-Konjugate von Arzneistoffen sowie Arsen- und Antimonverbindungen (siehe Tabelle 1.3). Der Transport einiger dieser Substanzen, darunter Daunorubicin und Vincristin, erfolgt dabei als Kotransport zusammen mit Glutathion [91].

## 1.3 Modulatoren des ABCB1

Als Modulatoren werden Substanzen bezeichnet, welche die Funktion eines ABC-Transporters beeinflussen, wobei es sich sowohl um eine inhibitorische als auch um eine aktivierende Wirkung handeln kann. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung des ABCB1 liegt, soll im Folgenden schwerpunktmäßig auf die bekannten Modulatoren dieses Transporters – insbesondere die in dieser Arbeit betrachteten Substanzklassen – eingegangen werden.

### 1.3.1 Inhibitoren

Für ABCB1 konnte in der Vergangenheit eine Beteiligung an der Entwicklung der klassischen MDR von Tumoren gezeigt werden (siehe Kapitel 1.1.2). Die Hemmung des Transporters galt daher lange als eine viel versprechende neuartige Therapieoption für die Behandlung multiresistenter Krebserkrankungen. Zu diesem Zweck wurden bislang unterschiedliche Ansatzpunkte gewählt: Durch den Einsatz von siRNA oder Antisense-Oligonukleotiden kann die Expression des Transporters bereits auf RNA-Ebene reduziert werden. Des Weiteren kann eine Reduktion der zellulären Menge an ABC-Transportern auch durch die Beeinflussung regulatorischer Signaltransduktionswege erreicht werden. Dies ist beispielsweise für ABCG2 beschrieben, dessen Expression durch bestimmte Tyrosinkinaseinhibitoren herunter reguliert wird [97, 98].

In der Vergangenheit wurde jedoch hauptsächlich der Weg einer direkten Hemmung des ABCB1 vermittelten Transports auf Proteinebene beschritten. Zu diesem Zweck wurde eine Vielzahl inhibitorisch wirksamer Verbindungen entwickelt, über die im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden soll (siehe Tabelle 1.4).

Die Hemmstoffe des ABCB1 können grundsätzlich in verschiedene Gruppen unterteilt werden [97, 100]: Bei den sogenannten Inhibitoren der ersten Generation handelt es sich um Arzneistoffe, die neben ihrer pharmkodynamischen Hauptwirkung zusätzlich in der Lage sind, den ABCB1 vermittelten Transport zu hemmen. Hierzu zählen unter anderem die Calciumkanalblocker Verapamil und Diltiazem sowie das Immunsuppressivum Ciclosporin. Aufgrund ihrer eigentlichen Hauptwirkung weisen diese Substanzen jedoch in den hohen Konzentrationen, die für eine effiziente Hemmung des Transports benötigt werden, eine starke Toxizität auf.

Basierend auf diesen Substanzen wurden daher Inhibitoren der zweiten Generation entwickelt. Hierbei handelt es sich meist um Derivate der zuvor genannten Arzneistoffe, die sich durch eine Reduktion der ursprünglichen Hauptwirkung zugunsten einer spezifischen ABCB1

**Tabelle 1.4:** Inhibitoren von ABCB1 (Auswahl nach [28, 98] und [99]).

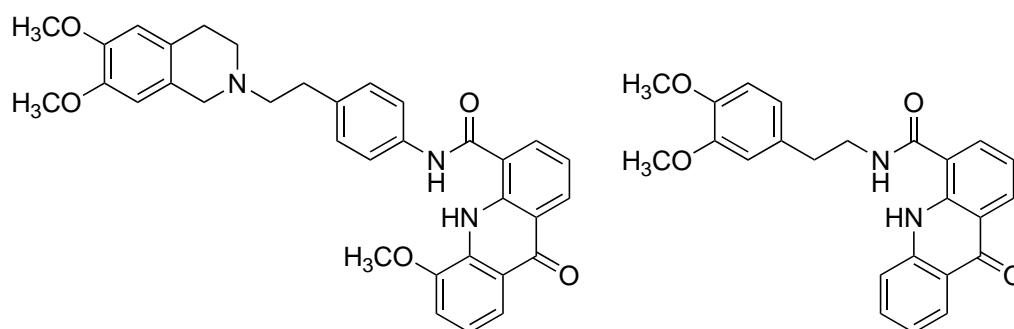
Klasse	Beispiele
1. Generation	Chinidin Ciclosporin Diltiazem Verapamil
2. Generation	Dexverapamil Dexniguldipin PSC 833 (Valspodar) VX-710 (Biricodar)
3. Generation	GF120918 (Elacridar) LY335979 (Zosuquidar) MS 209 (Dofequidar) XR9576 (Tariquidar)

hemmenden Aktivität auszeichnen. In diese Gruppe sind beispielsweise Dexverapamil und das Ciclosporinderivat PSC 833 (Valspodar) einzuordnen.

Inhibitoren der dritten Generation hingegen sind hochaffine Wirkstoffe, deren Struktur hinsichtlich einer effizienten Hemmung des ABCB1 optimiert wurde. Sie weisen demnach keine strukturelle Verwandtschaft zu den erstgenannten Klassen auf. Einige der Vertreter besitzen dabei eine zusätzliche inhibitorische Aktivität gegenüber anderen ABC-Transportern wie ABCG2 und ABCC1. Zu dieser Gruppe zählt auch GF120918 (Elacridar), dessen Derivate im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden sollten.

Das Acridonsäureamid GF120918, dessen Struktur in Abbildung 1.5 links dargestellt ist, wurde zu Beginn der 1990er Jahre von der Firma Glaxo entwickelt und charakterisiert. Die Verbindung war dabei in der Lage, die ABCB1 vermittelte Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufzuheben. Die in verschiedenen Zelllinien bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte lagen dabei im nanomolaren Bereich [101, 102]. Diese ersten Ergebnisse konnten in den Folgejahren durch eine Reihe weiterer Studien bestätigt werden. Des Weiteren wurde in diesen nachgewiesen, dass GF120918 keine inhibitorische Aktivität gegenüber den bis dahin bekannten MDR-assoziierten Transportern ABCC1 und ABCC2 besitzt [103–105].

Bereits kurz nach der Entdeckung des ABCG2 im Jahre 1998 konnten de Bruin *et al.* jedoch nachweisen, dass GF120918 in der Lage ist, diesen Transporter ebenfalls zu hemmen [106]. Somit handelt es sich bei dem Acridonsäureamid um einen dualen Inhibitor des ABCB1 und des ABCG2. Ausgehend von der hohen Aktivität des GF120918 gegenüber den beiden Proteinen wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von Acridonsäurederivaten entwickelt



**Abbildung 1.5:** Strukturformeln von GF120918 (links) und MBLI-87 (rechts).

und hinsichtlich ihrer MDR-modulierenden Eigenschaften charakterisiert [107–110]. Unter diesen sind vor allem die von Boumendjel *et al.* publizierten Acridonsäureamide hervorzuheben [110]. Diese leiten sich strukturell direkt von GF120918 ab, besitzen jedoch keine Tetrahydroisochinolinpartialstruktur (siehe Abbildung 1.5, rechts). Dennoch handelt es sich bei diesen Verbindungen um potente Inhibitoren des ABCG2, deren Aktivität mit der des GF120918 vergleichbar ist. Die Wirksamkeit des in Abbildung 1.5 repräsentativ dargestellten MBLI-87 konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden [111].

### Klinische Studien

Eine Reihe von Inhibitoren wurde in der Vergangenheit bereits in klinischen Studien der Phasen I-III hinsichtlich eines möglichen positiven Effektes auf die Chemotherapie verschiedener Tumorentitäten untersucht. Zwar konnten in einigen dieser Studien erste viel versprechende Ergebnisse erhalten werden, insgesamt stellte sich der klinische Einsatz von MDR-Modulatoren jedoch als problematisch dar, sodass bis heute noch kein Arzneistoff eine Zulassung für diese Indikation erhalten konnte [98, 112].

Neben praktischen Aspekten bei der Durchführung der Studien, beispielsweise der Bestimmung der ABCB1 Expression der behandelten Tumore, waren hier insbesondere toxische Effekte der Modulatoren, der Zytostatika oder anderer im Rahmen der Chemotherapie eingesetzter Arzneistoffe problematisch:

Im Falle der Inhibitoren der ersten Generation stellte insbesondere die pharmakologische Hauptwirkung der Inhibitoren einen limitierenden Faktor dar. So wurden aufgrund seiner niedrigen Affinität gegenüber ABCB1 sehr hohe Dosierungen von Verapamil benötigt, um eine effektive Hemmung des Transporters zu erreichen. Die inakzeptable Kardiotoxizität des Inhibitors führte hier zum Abbruch der klinischen Studien [112]. Für das Immunsuppressivum Ciclosporin konnte in einer Phase III Studie erstmalig ein positiver Effekt auf die Therapie der akuten myeloischen Leukämie mit Daunorubicin und Cytarabin gezeigt werden [113]. Andere Untersuchungen zeigten jedoch keinen therapeutischen Vorteil dieser

Substanz. Des Weiteren wurden in einigen Studien problematische Veränderungen der Pharmakokinetik unterschiedlicher Arzneistoffe beobachtet, sodass dieser Ansatz ebenfalls nicht weiter verfolgt wurde [114]. Ein ähnliches Bild zeichnete sich im Falle der Inhibitoren der zweiten Generation wie beispielsweise PSC833 ab [112].

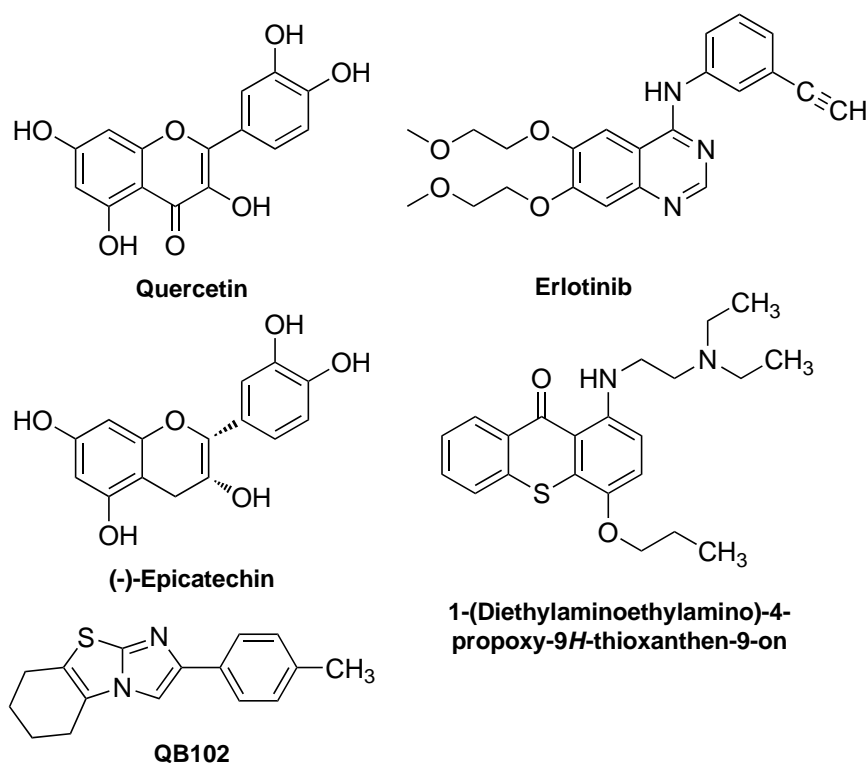
Auch die klinischen Studien mit Inhibitoren der dritten Generation führten bislang nicht zur Markteinführung eines therapeutisch einsetzbaren MDR-Modulators. In einer ersten Phase I Studie konnten zwar viel versprechende Ergebnisse für das Anthranilsäureamid XR9576 erhalten werden, die darauf folgenden Untersuchungen wurden jedoch allesamt aufgrund einer inakzeptabel erhöhten Toxizität der eingesetzten Zytostatika abgebrochen [112]. Das gegenüber ABCB1 und ABCG2 wirksame Acridonsäureamid GF120918 zeigte ebenfalls in einer Phase I Studie einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit des bei der Therapie unterschiedlicher solider Tumore eingesetzte Topotecan. Bis heute wurden jedoch keine weiterführenden klinischen Studien mit diesem Inhibitor durchgeführt [98, 115].

Insgesamt konnten somit bislang nur wenige positive Effekte der Inhibitoren in der Therapie maligner Erkrankungen nachgewiesen werden, sodass dieser Ansatz in den vergangenen Jahren insgesamt immer weniger verfolgt wurde. Aufgrund der ubiquitären Expression und der großen pharmakokinetischen Relevanz von ABC-Transportern ergeben sich jedoch gleichzeitig neue Perspektiven für den Einsatz von spezifischen Hemmstoffen. Beispielhaft seien hier die Diagnostik und die Therapie neurogenerativer Erkrankungen genannt. Aber auch ein Einsatz zur gezielten Verbesserung der peroralen Bioverfügbarkeit schlecht resorbierbarer Arzneistoffe ist denkbar [100, 115].

### 1.3.2 Aktivatoren

Neben der Vielzahl von Inhibitoren des ABCB1 sind auch einige wenige Substanzen bekannt, die in der Lage sind, den ABCB1 vermittelten Transport zu stimulieren. Der Mechanismus der Aktivierung wurde bislang jedoch noch nicht näher untersucht. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass sie auf einer allosterischen Interaktion verschiedener Bindungsstellen des Proteins beruht. Im Folgenden soll zunächst ein kurzer Überblick über die bekannten Aktivatoren gegeben werden. Anschließend wird auf die sogenannten QB-Verbindungen, die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen, näher eingegangen. Die Strukturen ausgewählter Aktivatoren des ABCB1 sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

Critchfield *et al.* konnten bereits im Jahre 1994 zeigen, dass die Flavonoide Quercetin, Galangin und Kämpferol den ABCB1 vermittelten Efflux von Doxorubicin in der Colonkarzinomzelllinie HCT-15 stimulieren. Hierbei wurde eine ungefähr 50 %ige Reduktion des intrazellulär vorhandenen radioaktiv markierten Anthrazyklins in der Zelle detektiert [116]. Ein weiteres



**Abbildung 1.6:** Strukturformeln ausgewählter literaturbekannter Aktivatoren von ABCB1.

Flavonoid mit aktivierenden Eigenschaften ist das (-)-Epicatechin, für welches Wang *et al.* eine Stimulation des Transports von LDS-751 nachweisen konnten [117].

Neben den Flavonoiden existieren einige weitere Verbindungen, für die in der Literatur eine Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports unterschiedlicher Substrate beschrieben ist. So verstärken bestimmte hydrophobe Peptide den Transport von Colchicin in ABCB1-haltigen Plasmamembranvesikeln aus resistenten CHO-Zellen [118]. Der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib soll hingegen den ABCB1 vermittelten Efflux von Mitoxantron stimulieren, während der Transport von Vincristin gehemmt wird [119]. Außerdem wurde kürzlich für einige Thioxanthe eine Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports von Rhodamin 123 beschrieben [120].

Die bereits erwähnten QB-Verbindungen stellen eine der wenigen Substanzklassen dar, deren ABCB1 aktivierende Wirksamkeit in der Vergangenheit bereits etwas ausführlicher untersucht wurde. Ursprünglich waren diese Substanzen als Inhibitoren des Tumorsuppressor-Proteins p53 konzipiert [121, 122]. In einem Screening stellten Kondratov *et al.* jedoch fest, dass einige der Substanzen, darunter QB11, QB13 und QB102, die intrazelluläre Akkumulation von Doxorubicin und Rhodamin 123 in ABCB1 exprimierenden Zellen senkten [123]. Die nähere Untersuchung der exemplarisch ausgewählten Verbindung QB102 ergab, dass sie nicht



den Transport aller Substrate stimuliert, sondern dass ihre Wirkung stark substratabhängig ist. Dieses Verhalten kann teilweise mit den postulierten Bindungsstellen der betrachteten Substrate erklärt werden [44]:

- Der Transport von Daunorubicin, Doxorubicin und Rhodamin 123, welche an die Rhodamin-Bindungsstelle binden sollen, wird stimuliert. Allerdings besitzen einige Substanzen nur eine aktivierende Wirkung gegenüber Rhodamin 123.
- Der Efflux von Hoechst 33342, welches an die Hoechst-Bindungsstelle bindet, sowie von Vinblastin und Vincristin, die Affinität zu beiden Bindungsstellen besitzen sollen, wird inhibiert.
- Der Transport einiger weiterer Substrate wie Colchicin und Actinomycin D wird durch QB102 nicht beeinflusst.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass die QB-Verbindungen an die Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1 binden und dort den Transport von Substraten kompetitiv hemmen. Die von Shapiro und Ling propagierte positive Kooperativität zwischen Hoechst- und Rhodamin-Bindungsstelle bewirkt demnach die Stimulation des Efflux von Rhodamin 123 und Anthrazyklinen [44, 123].



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die polyspezifischen ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 besitzen im menschlichen Körper eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Hierbei beeinflusst insbesondere ABCB1, auf welchem der hauptsächliche Fokus dieser Arbeit liegt, aufgrund seiner ubiquitären Expression die Pharmakokinetik vieler Arzneistoffe. Des Weiteren ist dieser Transporter an der Entwicklung einer multiplen Zytostatikaresistenz (MDR) verschiedener maligner Erkrankungen beteiligt. Trotz intensiver Forschungsbemühungen in der Vergangenheit konnten viele Fragestellungen insbesondere hinsichtlich der Polyspezifität sowie möglicher Bindungsstellen des ABCB1 noch nicht abschließend beantwortet werden.

Die funktionelle Untersuchung der Interaktion von Modulatoren des Transporters mit verschiedenen Substraten stellt einen möglichen Ansatzpunkt zur Charakterisierung potentieller Bindungsstellen dar. Eine für derartige Studien geeignete Verbindungsklasse stellen beispielsweise die von Kondratov *et al.* publizierten Verbindungen – insbesondere QB11 und QB102 – dar, da deren modulierende Aktivität eine starke Substratabhängigkeit aufweist [123]: Während der ABCB1 vermittelte Transport einiger Substrate stimuliert wird, hemmen die Substanzen den Efflux anderer Substrate. Dabei wurde insbesondere der Mechanismus der Aktivierung des Transports bestimmter Substrate bislang noch nicht näher untersucht.

Des Weiteren ist die spezifische Interaktion von ausschließlich inhibitorisch wirksamen Substanzen mit verschiedenen Substraten bzw. Bindungsstellen ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung neuartiger Arzneistoffe, die potentiell zur Überwindung der MDR oder zur Beeinflussung der Pharmakokinetik von Substraten des ABCB1 eingesetzt werden können. So wären beispielsweise MDR-Inhibitoren denkbar, die den ABCB1 vermittelten Transport bestimmter Zytostatika hemmen, während andere Substanzen nicht beeinflusst werden. Aber auch in der frühen Entwicklung von Arzneistoffkandidaten anderer Indikationen ist die mögliche Substratabhängigkeit der ABCB1 inhibitorischen Aktivität von Bedeutung. So ist die Auswahl eines geeigneten Substrats für den Ausschluss möglicher Interaktionen neuer Wirkstoffe mit diesem pharmakokinetisch überaus relevanten Protein essentiell.

Basierend auf den zuvor dargestellten Aspekten ergaben sich für die vorliegende Arbeit die folgenden thematischen Schwerpunkte:

- Die Etablierung eines für die Charakterisierung der Interaktion von Modulatoren mit der Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 geeigneten durchflusszytometrischen funktionellen Testsystems unter Verwendung der Substrate Rhodamin 123 und Tetramethylrosamin (Rhodamin 123- bzw. Tetramethylrosamin-Akkumulationsassay).
- Die Charakterisierung der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften neuartiger, von QB11 abgeleiteter Imidazobenzimidazole unter Verwendung des neu entwickelten Rhodamin-Akkumulationsassays sowie weiterer bereits bestehender Testsysteme. Hier stand insbesondere die Untersuchung des Einflusses struktureller Modifikationen auf die modulatorischen Eigenschaften der Substanzen im Mittelpunkt. Daneben sollten so die für die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports essentiellen Strukturmerkmale identifiziert werden.
- Untersuchungen zum möglichen Mechanismus der Aktivierung von ABCB1 sowie der Substratabhängigkeit der Wirkung unter Verwendung verschiedener Assays.
- Die Charakterisierung neuer im Arbeitskreis synthetisierter Acridonsäureamide hinsichtlich ihrer inhibierenden Aktivität gegenüber ABCB1 und ABCG2. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand insbesondere die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowie die Ermittlung einer eventuell bestehenden Selektivität ihrer Wirkung gegenüber bestimmten Substraten oder einem der beiden ABC-Transporter.
- Die Untersuchung der Eignung unterschiedlicher Substrate zur funktionellen *in vitro* Testung von Modulatoren des ABCB1 sowie die Erforschung des Einflusses ihrer Eigenschaften auf die erhaltenen Ergebnisse. Als Modellsubstrate sollten verschiedene Derivate des Tetramethylrosamin dienen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Chemikalien und Pufferlösungen**

#### **3.1.1 Eingesetzte Chemikalien und Herstellung von Verdünnungsreihen**

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität „pro Analyti“ (p.A.) bezogen. Eine detaillierte Aufstellung der jeweiligen Bezugsquellen ist Anhang A zu entnehmen.

Jene Substanzen, die bezüglich ihrer Aktivität gegenüber bestimmten ABC-Transportern funktionell charakterisiert werden sollten, wurden zunächst in Dimethylsulfoxid gelöst, sodass sich eine Konzentration von 10 mmol/l ergab. Zur Anfertigung einer Verdünnungsreihe wurden entsprechende Lösungen in dest. Wasser, KHP (vgl. Kapitel 3.1.2.2) oder isotoner Kochsalzlösung hergestellt. Wiesen die Testsubstanzen keine ausreichende Löslichkeit in den zur Verfügung stehenden wässrigen Medien auf, wurden Methanol oder Dimethylsulfoxid zugesetzt, wobei deren finaler Gehalt in den Proben für funktionelle Assays einen Wert von 5 bzw. 1 % (V/V) nicht überschritt.

#### **3.1.2 Herstellung von Pufferlösungen**

Im Allgemeinen wurden zur Herstellung sämtlicher Pufferlösungen zunächst die Feststoffe eingewogen, in der Hälfte des benötigten Volumens an dest. Wasser gelöst und anschließend jene Bestandteile hinzugefügt, die bereits in Form einer Lösung vorlagen. Dann wurde mit dest. Wasser auf etwa 80 % des gewünschten Endvolumens aufgefüllt. Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben, mit NaOH oder HCl eingestellt und schließlich das noch fehlende Volumen an dest. Wasser zugegeben.

Nachfolgend soll die Herstellung jener Pufferlösungen, die eine breite Anwendung in der Zellkultur oder bei der Durchführung funktioneller Assays fanden, beschrieben werden. Spezielle Puffer, die nur für eine bestimmte Methode eingesetzt wurden, werden in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

**Tabelle 3.1:** Herstellung von 10x phosphatgepufferter Kochsalzlösung.

<b>PBS-Stammlösung (10x)</b>		pH 7,4
40,0 g	Natriumchlorid	1,369 mol/l
7,0 g	Dinatriumhydrogenphosphat	0,099 mol/l
1,0 g	Kaliumdihydrogenphosphat	0,015 mol/l
1,0 g	Kaliumchlorid	0,027 mol/l
ad 500,0 ml	dest. Wasser	

### 3.1.2.1 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) wurde insbesondere in der Zellkultur, beispielsweise zum Waschen von Zellen, verwendet. Weiterhin bildet sie die Grundlage für eine Reihe weiterer Puffer, die in verschiedenen Experimenten zur Anwendung kamen.

Da von dieser Pufferlösung in der Regel größere Mengen benötigt wurden, wurde nach dem zuvor beschriebenen allgemeinen Prinzip zunächst die in Tabelle 3.1 beschriebene zehnfach konzentrierte Stammlösung hergestellt, zu 100 ml aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Zur Herstellung der einfach konzentrierten Lösung wurde ein Aliquot aufgetaut, vollständig in einen 1000 ml Messkolben überführt und mit dest. Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt. Sollte der Puffer für die Zellkultur eingesetzt werden, wurde er vor der Verwendung autoklaviert.

### 3.1.2.2 Krebs-HEPES-Puffer (KHP)

Der Krebs-HEPES-Puffer (KHP) wurde für die meisten funktionellen Assays verwendet, da Zellen in ihm mittelfristig überleben können. Gegenüber den sonst verwendeten Nährmedien bietet er jedoch den Vorteil einer definierten Zusammensetzung und der Abwesenheit von Bestandteilen, die die Messung möglicherweise stören könnten (z.B. Proteine/Enzyme, Wachstumsfaktoren).

In einem ersten Schritt wurde die in Tabelle 3.2 beschriebene fünffach konzentrierte Stammlösung nach dem zuvor beschriebenen allgemeinen Verfahren hergestellt (vgl. Seite 27). Diese konnte zu 100 ml aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

Zur Herstellung des einfach konzentrierten Puffers wurden 100 ml der Stammlösung in einen 500 ml Messkolben überführt und mit 650 µl der Calciumchlorid-Lösung (1 mol/l) versetzt. Anschließend wurde dest. Wasser bis zu einem Volumen von etwa 400 ml addiert, 600 µl Magnesiumsulfat-Lösung (1 mol/l) zugesetzt und schließlich mit dest. Wasser auf 500,0 ml

**Tabelle 3.2:** Herstellung des Krebs-HEPES-Puffers (KHP).

<b>KHP-Stammlösung (5x)</b>		pH 7,4
5,958 g	HEPES	50,0 mmol/l
17,330 g	Natriumchlorid	593 mmol/l
0,876 g	Kaliumchlorid	23,5 mmol/l
0,408 g	Kaliumdihydrogenphosphat	6,00 mmol/l
0,882 g	Natriumhydrogencarbonat	21,0 mmol/l
5,796 g	D-Glucose Monohydrat	58,5 mmol/l
ad 500,0 ml	dest. Wasser	
<b>Calciumchlorid-Lösung 1 mol/l</b>		
1,47 g	Calciumchlorid Dihydrat	1 mol/l
ad 10,0 ml	dest. Wasser	
<b>Magnesiumsulfat-Lösung 1 mol/l</b>		
2,465 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat	1 mol/l
ad 10,0 ml	dest. Wasser	
<b>KHP</b>		pH 7,4
100,0 ml	KHP-Stammlösung	
650 $\mu$ l	Calciumchlorid-Lösung	1,3 mmol/l
600 $\mu$ l	Magnesiumsulfat-Lösung	1,2 mmol/l
ad 500,0 ml	dest. Wasser	

aufgefüllt. Die erhaltene Lösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots zu jeweils 50 ml eingefroren.

### 3.1.2.3 HEPES-Na Puffer

Die Zusammensetzung des HEPES-Na Puffers entsprach der bei Saengkhae *et al.* beschriebenen [124]. Die in Tabelle 3.3 beschriebene Stammlösung wurde nach der auf Seite 27 dargestellten allgemeinen Vorgehensweise hergestellt, wobei der pH-Wert mit KOH anstelle von NaOH eingestellt wurde. So konnte die Stammlösung auch zur Herstellung des in Kapitel 3.1.2.4 beschriebenen HEPES-K Puffers verwendet werden.

Für die Herstellung des einfach konzentrierten Puffers wurden 20,0 ml der Stammlösung in einem 100 ml Messkolben vorgelegt und 100  $\mu$ l der Calciumchlorid-Lösung aus Tabelle 3.2 hinzugefügt. Dann wurde dest. Wasser bis zu einem Volumen von etwa 50 ml addiert und 50  $\mu$ l Magnesiumsulfat-Lösung (1 mol/l, vgl. Tabelle 3.2) zugesetzt. Nach Zugabe der benötigten Menge Natriumchlorid wurde mit dest. Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt.

**Tabelle 3.3:** Herstellung von HEPES-Na Puffer.

<b>HEPES-Stammlösung (5x)</b>		pH 7,4
2,385 g	HEPES	100 mmol/l
0,131 g	Kaliumchlorid	17,5 mmol/l
0,496 g	D-Glucose Monohydrat	25,0 mmol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>HEPES-Na Puffer</b>		pH 7,4
20,0 ml	HEPES-Stammlösung	
100 µl	Calciumchlorid-Lösung(1 mol/l)	1 mmol/l
50 µl	Magnesiumsulfat-Lösung (1 mol/l)	0,5 mmol/l
0,771 g	Natriumchlorid	132 mmol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	

### 3.1.2.4 HEPES-K Puffer und KHP-K

Die beiden im Folgenden beschriebenen Lösungen gleichen in ihrer Zusammensetzung dem HEPES-Na Puffer bzw. dem Krebs-HEPES-Puffer. Sie enthalten jedoch anstelle von Natriumchlorid eine äquimolare Menge an Kaliummethansulfonat. Im Falle des KHP-K wurde zusätzlich Natriumhydrogencarbonat durch das entsprechende Kaliumsalz substituiert. Die Herstellung dieser Pufferlösungen ist in Tabelle 3.4 beschrieben. Zusätzlich wurde die Calciumchlorid- sowie die Magnesiumsulfat-Lösung aus Tabelle 3.2 verwendet.

In einem ersten Schritt wurde die Kaliummethansulfonat-Stammlösung hergestellt. Zu diesem Zweck wurden in einem 100 ml Messkolben etwa 20 ml dest. Wasser vorgelegt und 2,75 ml 70 %ige Methansulfonsäure (9,61 mol/l) zugesetzt. Die erhaltene Lösung wurde mit wässriger Kaliumhydroxid-Lösung (0,5 mol/l) neutralisiert und mit dest. Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt.

Die Herstellung des HEPES-K Puffers erfolgte in Analogie zu der des HEPES-Na Puffers aus Kapitel 3.1.2.3 wobei anstelle des Natriumchlorids 50,0 ml der Kaliummethansulfonat-Stammlösung zugesetzt wurden (vgl. Tabelle 3.4).

Zur Herstellung von KHP-K wurde zunächst analog Kapitel 3.1.2.2 eine fünffach konzentrierte Stammlösung hergestellt, wobei anstelle von Natriumhydrogencarbonat eine äquimolare Menge Kaliumhydrogencarbonat verwendet wurde. 20,0 ml dieser Lösung wurden dann in einen 100 ml Messkolben überführt und 130 µl Calciumchlorid-Lösung zugesetzt. Dann wurden 44,7 ml der Kaliummethansulfonat-Stammlösung sowie 120 µl Magnesiumsulfatlösung hinzugefügt und mit dest. Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt.



**Tabelle 3.4:** Herstellung von HEPES-K Puffer und KHP-K. Die Herstellung der HEPES-Stammlösung ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

<b>Kaliummethansulfonat-Stammlösung (2x)</b>		pH 7,0
2,75 ml	Methansulfonsäure 70 %	264 mmol/l
	Kaliumhydroxid-Lösung (0,5 mol/l)	
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>HEPES-K Puffer</b>		pH 7,4
20,0 ml	HEPES-Stammlösung	
100 µl	Calciumchlorid-Lösung (1 mol/l)	1 mmol/l
50 µl	Magnesiumsulfat-Lösung (1 mol/l)	0,5 mmol/l
50,0 ml	Kaliummethansulfonat-Stammlösung	132 mmol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>KHP-K Stammlösung (5x)</b>		pH 7,4
1,192 g	HEPES	50,0 mmol/l
0,175 g	Kaliumchlorid	23,5 mmol/l
0,082 g	Kaliumdihydrogenphosphat	6,00 mmol/l
0,211 g	Kaliumhydrogencarbonat	21,0 mmol/l
1,159 g	D-Glucose Monohydrat	58,5 mmol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>KHP-K</b>		pH 7,4
20,0 ml	KHP-K Stammlösung	
130 µl	Calciumchlorid-Lösung	1,3 mmol/l
120 µl	Magnesiumsulfat-Lösung	1,2 mmol/l
44,7 ml	Kaliummethansulfonat-Stammlösung	118 mmol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Verwendete Zelllinien

#### **A2780 und A2780 Adr**

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 (No. 93112519) sowie die daraus durch kontinuierliche Selektion mit Doxorubicin gewonnene ABCB1 überexprimierende Tochterzelllinie A2780 Adr (No. 93112520) wurden von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) bezogen [125]. Beide Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zelllinie A2780 Adr wurde in jeder zehnten Passage mit 0,5 µmol/l Doxorubicin behandelt, um die durch die Überexpression von ABCB1 vermittelte multiple Zytostatikaresistenz aufrecht zu erhalten.

#### **CHO-K1 pcDNA und CHO-K1 M403**

Beide Zelllinien wurden von Dr. Jens Meyer im Rahmen seiner Dissertationsarbeit aus der chinesischen Hamsterovarienzelllinie CHO-K1 (DSMZ Nr. ACC110) durch Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1(+)-mdr1 bzw. dem entsprechenden Leervektor pcDNA3.1(+) erzeugt [126, 127]. Sie wurden in Ham's F12 Medium unter Zusatz von 10 % FKS, 2 mmol/l L-Glutamin sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Im Falle der mit dem *ABCB1* Gen transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403 wurden dem Nährmedium zusätzlich 0,2 mg/ml des Selektionsantibiotikums Geneticin (G418) zugesetzt, um die ABCB1 Expression aufrecht zu erhalten. Vor der Durchführung eines funktionellen Assays wurden die CHO-K1 M403 Zellen für maximal 16 h mit 5 mmol/l Natriumbutyrat behandelt [128, 129].

#### **2008 und 2008 MRP1**

Die beiden Zelllinien wurden dankenswerterweise von Dr. Piet Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Bei der Zelllinie 2008 handelt es sich, ähnlich wie bei A2780, um eine humane Ovarialkarzinomzelllinie, die aus dem Tumor einer unbehandelten Patientin gewonnen wurde. Durch retrovirale Transfektion mit humaner *ABCC1* cDNA wurde daraus die ABCC1 exprimierende Tochterzelllinie 2008 MRP1 erzeugt [130, 131]. Beide Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Im Falle von 2008 MRP1 wurden dem Medium zusätzlich 0,2 mg/ml Geneticin (G418) zugesetzt.

### MDCKII und MDCKII BCRP

Die Zelllinie MDCK (Madin Darby Canine Kidney) wurde ursprünglich aus der Niere eines Cocker Spaniels gewonnen. Aus einer späten Passage dieser Zelllinie entwickelte sich der hier verwendete Subklon MDCKII, der leicht veränderte Membraneigenschaften aufweist [132, 133]. Durch retrovirale Transfektion mit humaner *ABCG2* cDNA (Wildtyp R482) wurde daraus die Zelllinie MDCKII BCRP erzeugt, in der das *ABCG2* Gen zusätzlich mit einem für GFP (Green fluorescent protein) codierenden DNA-Abschnitt verknüpft ist. Die Expression des fluoreszierenden GFP ( $\lambda_{\text{ext.}} = 475 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 509 \text{ nm}$ ) ermöglicht - insbesondere bei durchflusszytometrischen Untersuchungen - die obligatorische Kontrolle der *ABCG2* Expression in den verwendeten Zellen [134]. Beide Zelllinien wurden von Dr. Alfred Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt und in D-MEM mit 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

### MCF7 und MCF7/MX

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF7/MX wurde durch kontinuierliche Selektion mit dem Zytostatikum Mitoxantron aus der parenteralen Zelllinie MCF7 erzeugt und zeichnet sich durch eine Überexpression von *ABCG2* aus. Beide Zelllinien wurden von Dr. Erasmus Schneider (Wadsworth Center, Albany, NY, US) zur Verfügung gestellt [88, 135]. Sie wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 20 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Im Falle der resistenten Zelllinie MCF7/MX wurden dem Medium etwa alle zehn Passagen 0,3 µmol/l Mitoxantron zugesetzt, um die Expression von *ABCG2* auf einem gleichbleibenden Niveau zu erhalten.

## 3.2.2 Allgemeine Zellkultur

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigten ein adhärentes Wachstumsverhalten und wurden in Gewebekulturflaschen mit 75 oder 175 cm<sup>2</sup> Fläche (T75 bzw. T175) in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> sowie einer relativen Luftfeuchte von 96 % kultiviert. Dabei fanden die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Nährmedien Verwendung. Das verbrauchte Medium wurde unter aseptischen Bedingungen – je nach Dichte des Zellrasens – etwa alle zwei bis drei Tage durch frisches ersetzt. Dabei wurden für eine T75-Gewebekulturflasche 15 ml, für eine T175-Flasche 25 ml Nährmedium verwendet.

Erreichte der Zellrasen eine Konfluenz von maximal 90 %, wurden die Zellen subkultiviert. Vor dem Ablösen der Zellen wurde das vorhandene Nährmedium entfernt und die Zellen mit 2 ml (T75) oder 3 ml (T175) sterilem PBS gewaschen, um anhaftendes Nährmedium zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurde das gleiche Volumen Trypsin-EDTA Lösung

zugesetzt, um die Zellen von der Kulturflasche abzulösen. Die Einwirkdauer und -temperatur des Trypsins lag dabei zwischen wenigen Minuten bei Raumtemperatur (A2780, CHO-K1 und MCF7) und bis zu 15 min bei 37 °C (MDCK und 2008). Die nun nur noch locker anhaftenden Zellen wurden mit frischem Nährmedium abgespült, sodass sich ein Gesamtvolumen von 10 ml ergab. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und bei  $266 \times g$  und 4 °C für 4 min zentrifugiert. Das nach dem Absaugen des Überstandes erhaltene Zellpellet wurde in weiteren 10 ml Nährmedium resuspendiert und die gewünschte Menge Zellen in eine neue Gewebekulturflasche mit einer entsprechenden Menge Medium ausgesät.

#### 3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitkonservierung wurden von allen verwendeten Zelllinien Aliquots in flüssigem Stickstoff eingelagert. Zu diesem Zweck wurden diese in T175-Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von etwa 80–90 % kultiviert und wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben abgelöst. Nach der Zentrifugation wurde das erhaltene Zellpellet in 4,5 ml frischem Nährmedium pro Flasche resuspendiert und jeweils 900 µl der resultierenden Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden 100 µl DMSO als Kryoprotektivum zugesetzt und die Aliquots zunächst bei -80 °C eingefroren, bevor sie zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Bei Bedarf konnten die so konservierten Zellen wieder in Kultur genommen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein PP-Röhrchen mit 9 ml frischem Nährmedium überführt. Nach Zentrifugation ( $266 \times g$ , 4 °C, 4 min) wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 15 ml Medium resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension in eine T75-Gewebekulturflasche überführt. Anschließend wurde diese im Inkubator unter normalen Zellkulturbedingungen gelagert und am nächsten Tag bei Bedarf das Nährmedium sowie nicht angewachsene Zellen abgesaugt und frisches Medium zugesetzt.

#### 3.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des CASY<sup>®</sup>1 Model TT ermittelt. Hierzu wurden 20 µl der zu untersuchenden Zellsuspension in 10 ml sterilfiltrierte CASY<sup>®</sup>ton Lösung, eine isoosmotische Elektrolytlösung, überführt und vorsichtig gemischt. Die so erhaltene stark verdünnte Zellsuspension wurde nun mit dem genannten Messgerät analysiert. Hierbei fließt die Zellsuspension durch eine Kapillare definierten Innendurchmessers (150 µm), an die eine elektrische Spannung angelegt ist. Passiert eine Zelle die Kapillare,

führt dies zu einer Widerstandsänderung, die proportional zur Größe der entsprechenden Zelle ist. Aus der Anzahl und Größe der registrierten Widerstandsänderungen lässt sich sowohl die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension als auch deren Größenverteilung ermitteln [136].

### 3.2.5 Aufnahme einer Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien zu charakterisieren wurde eine Wachstumskinetik aufgenommen. Die aus der exponentiellen Phase der Wachstumskurve ermittelte mittlere Populationsverdopplungszeit beschreibt dabei die Wachstumsgeschwindigkeit. Dieser Parameter erlaubt einerseits den Vergleich unterschiedlicher Zelllinien, andererseits ermöglicht er Rückschlüsse auf den Einfluss bestimmter Substanzen auf das Zellwachstum.

#### Durchführung

Die verschiedenen Zelllinien wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von einer Gewebekulturflasche abgelöst und bei Bedarf weiter subkultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl in der erhaltenen Suspension ermittelt und mit dem entsprechenden Nährmedium auf 20 000 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurde pro Zelllinie jeweils 1 ml in alle Vertiefungen zweier 24-well Gewebekulturplatten pipettiert. Etwa alle 12 h wurde der Überstand von drei Vertiefungen abgesaugt, mit jeweils 250 µl PBS gewaschen und nach Zugabe von je 100 µl Trypsin-EDTA Lösung für einige Minuten bei 37 °C inkubiert um ein vollständiges Ablösen der Zellen zu erreichen. Diese wurden mit 900 µl frischem Medium aufgenommen ( $V_{\text{ges.}} = 1 \text{ ml}$ ) und erneut die Zellzahl in allen drei Proben ermittelt [136].

Der Mittelwert der ermittelten Zellzahlen wurde gegen die Zeit aufgetragen und die Populationsverdopplungszeit abgelesen. Die Verdopplungszeit von Zellen kann zusätzlich rein rechnerisch bestimmt werden, solange diese sich mit Sicherheit in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Hierzu wird zunächst aus der Ausgangszellzahl ( $N_0$ ) sowie der Zellzahl zu einem definierten Zeitpunkt ( $N_t$ ) die Wachstumskonstante ( $k$ ) bestimmt:

$$k = \frac{\ln \frac{N_t}{N_0}}{t} \quad (3.1)$$

Mit deren Hilfe kann dann die mittlere Populationsverdopplungszeit ( $t_2$ ) ermittelt werden:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.2)$$

### 3.3 Allgemeine und molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Proben für die Gelelektrophorese

Um den ABCB1 Expressionsstatus in den verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot untersuchen zu können, mussten die Zellen zunächst so aufbereitet werden, dass sie für die vorausgehende SDS-Gelelektrophorese verwendet werden konnten. Zu diesem Zweck wurden sie in runden Gewebekulturschalen kultiviert, bis eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht war. Anschließend konnten sie zur Herstellung einer einfachen Membranpräparation oder eines Zellysates verwendet werden. Beide Vorgehensweisen werden im Folgenden beschrieben und in Kapitel 4.1.2 hinsichtlich ihrer Eignung für den Nachweis von Membranproteinen in humanen und Säugetierzellen verglichen.

**Tabelle 3.5:** Lösungen für die Herstellung einer Membranpräparation.

<b>HEPES-Stammlösung</b>		<b>pH 7,4</b>
17,353 g	HEPES-Na	66,7 mmol/l
31,773 g	HEPES	133,3 mmol/l
ad 1000,0 ml	dest. Wasser	
<b>Homogenisationspuffer</b>		
50,0 ml	HEPES-Stammlösung	
50,0 ml	Na <sub>2</sub> EDTA-Lösung 100 mmol/l	10 mmol/l
ad 500,0 ml	dest. Wasser	
<b>Lagerungspuffer</b>		
50,0 ml	HEPES-Stammlösung	
0,5 ml	Na <sub>2</sub> EDTA-Lösung 100 mmol/l	0,1 mmol/l
ad 500,0 ml	dest. Wasser	

##### 3.3.1.1 Herstellung einer Membranpräparation

Die für die Herstellung einer einfachen Membranpräparation benötigten Lösungen (siehe Tabelle 3.5) wurden am Tag vor der Durchführung vorbereitet und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert. Der pH-Wert der HEPES-Stammlösung wurde bei Bedarf mit Natronlauge oder Salzsäure auf einen Wert von 7,4 eingestellt. Weiterhin wurden Zentrifugengläser sowie der für die Zentrifugation der Proben benötigte Rotor (Festwinkelrotor JA 25.50) ebenfalls am Tag zuvor in den Kühlschrank gestellt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt, um eine Zerstörung des nachzuweisenden Zielproteins durch Proteasen möglichst gering zu halten.

Für die Herstellung der Membranpräparation wurden zehn zu ca. 90% bewachsene Gewebekulturschalen verwendet. Nach dem Absaugen des verbrauchten Nährmediums wurden in jede Schale 2,4 ml des kalten Homogenisationspuffers gegeben, die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers abgelöst und die aus jeweils fünf Schalen erhaltene Zellsuspension in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Abschließend wurden evtl. noch verbliebene Zellen mit weiteren 6 ml Homogenisationspuffer abgewaschen und diese ebenfalls in das zugehörige PP-Röhrchen pipettiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde nun zweimal homogenisiert (Polytron-Homogenisator, 12 s), in gekühlte Zentrifugengläser überführt und alle Gefäße mit Homogenisationspuffer auf 50,0 g aufgefüllt. In dem nun folgenden Zentrifugationsschritt ( $800 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) wurden insbesondere verbliebene größere Zellbruchstücke sowie Zellkerne abgetrennt. Der Überstand wurde in zwei weitere gekühlte Zentrifugengläser überführt und bei  $40\,000 \times g$  und  $2^\circ\text{C}$  für 30 min zentrifugiert um die erwünschten Zellmembranbestandteile anzureichern. Das so erhaltene Pellet wurde im Anschluss in 50,0 g Lagerungspuffer aufgenommen und erneut unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde noch einmal wiederholt, bevor beide Pellets in 5 ml Lagerungspuffer resuspendiert und in Aliquots zu 500  $\mu\text{l}$  bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

### 3.3.1.2 Herstellung eines Zelllysates

Zur Herstellung eines Zelllysates wurde der bei Kuteykin *et al.* beschriebene Lyse-Puffer verwendet [137]. Dazu wurde zunächst die zehnfach konzentrierte Stammlösung aus Tabelle 3.6 hergestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Am Versuchstag wurde diese mit kaltem dest. Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und die lysierenden Bestandteile Natriumdeoxycholat und Triton-X-100 sowie Proteaseinhibitoren (Complete Mini Proteaseinhibitor<sup>®</sup>, Roche) gemäß Herstellerangabe zugefügt. Der pH-Wert der eisgekühlten Lösung wurde überprüft und bei Bedarf mit Natronlauge oder Salzsäure auf einen Wert von 8,0 eingestellt. Auch hier wurden sämtliche Arbeitsschritte unter Eiskühlung durchgeführt.

Die Zellen aus jeweils zehn zu etwa 90% konfluenten Kulturschalen wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, unter Verwendung des Homogenisationspuffers aus Tabelle 3.5 mit Hilfe eines Gummischabers geerntet und in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Nachdem die Schalen mit weiteren 5 ml Puffer gespült und auch diese Suspension in das PP-Röhrchen überführt worden war, wurden die Zellen abzentrifugiert ( $266 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 4 min). Nach dem Absaugen des klaren Überstands wurde das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer aufgenommen, die Lösung zu 500  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

**Tabelle 3.6:** Lösungen für die Herstellung eines Zelllysates.

<b>Lysepuffer-Stammlösung (10x)</b>		
3,03 g	Tris	250 mmol/l
2,92 g	Natriumchlorid	500 mmol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>Lysepuffer</b>		pH 8,0
2,0 ml	Lysepuffer-Stammlösung	
100 mg	Natriumdeoxycholat	0,5 % (m/V)
100 mg	Triton-X-100	0,5 % (m/V)
ad 20,0 ml	dest. Wasser	

### 3.3.2 Proteinbestimmung nach Peterson-Lowry

Der Gesamtproteingehalt der Membranpräparationen und Zelllysate wurde mit der Methode nach Peterson-Lowry ermittelt. Die Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* stellt eine modifizierte Biuret Reaktion dar, bei der die Proteine in wässriger, alkalischer Lösung einen Komplex mit Kupfer(II)ionen bilden. Dieser wird anschließend mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz – einer wässrigen, phosphorsauren Lösung von Natriummolybdat und Natriumwolframat – umgesetzt. Hierbei reduziert das zu bestimmende Protein das in der Lösung vorhandene Phosphomolybdat und -wolframat zu intensiv blau gefärbten Produkten, die photometrisch bei 750 nm quantifiziert werden können. Das komplexierte Kupfer(II) soll hierbei die Elektronenübertragung erleichtern und wird während der Reaktion selbst zu Kupfer(I) reduziert [138, 139]. Die hier verwendete modifizierte Methode nach Peterson soll den Einfluss potentiell störender Substanzen verringern, indem die Proteine zunächst mit Natriumdeoxycholat solubilisiert und durch Ausfällen mit Trichloressigsäure und anschließende Zentrifugation von den übrigen Lösungsbestandteilen abgetrennt werden. Somit ist dieses Verfahren gut für die Quantifizierung membranständiger Proteine geeignet [140].

#### Durchführung

Die für die Proteinbestimmung benötigten Lösungen sind in Tabelle 3.7 zusammengestellt. Die alkalische, SDS haltige Natriumtartratlösung (Lösung A) konnte nach ihrer Herstellung für maximal zwei Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden. Alle übrigen Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. In einem ersten Schritt wurden zur Erstellung einer Kalibriergeraden aus einer BSA Stammlösung (0,2 mg/ml) Verdünnungen hergestellt, die zwischen 0 und 30 µg Gesamtprotein in 1 ml enthielten. Die zu untersuchenden Proben wurden in dest. Wasser ebenfalls so verdünnt, dass ihr Proteingehalt im Bereich der Kalibriergeraden lag ( $V_{\text{ges}} = 1 \text{ ml}$ ).



**Tabelle 3.7:** Lösungen für die Proteinbestimmung nach Peterson-Lowry.

<b>Alkalische Natriumtartrat-Lösung</b>		<b>Lösung A</b>
4,0 g	Natriumhydroxid	0,4 % (m/V)
20,0 g	Natriumcarbonat	2,0 % (m/V)
0,2 g	Natriumtartrat	0,001 mol/l
10,0 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	1,0 % (m/V)
ad 1000,0 ml	dest. Wasser	
<b>Kupfersulfat-Lösung ca. 0,5 %</b>		<b>Lösung B</b>
0,5 g	Kupfersulfat Pentahydrat	ca. 0,5 % (m/V)
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>Natriumdeoxycholat-Lösung 0,3 %</b>		
0,3 g	Natriumdeoxycholat	0,3 % (m/V)
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>TCA-Lösung 70 %</b>		
70,0 g	Trichloressigsäure (TCA)	70,0 % (m/V)
ad 100,0 ml	dest. Wasser	

Zur Solubilisation der Proteine wurden zu allen Proben 50 µl Natriumdeoxycholatlösung (0,3 %) gegeben, kurz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zusatz von 100 µl kalter Trichloressigsäure (70 %) wurden die Proteine ausgefällt und anschließend abzentrifugiert ( $13\,000 \times g$ , 4 °C, 20 min). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde 1 ml des Biuret-Reagenzes (Mischung von 49 Volumenteilen Lösung A und 1 Volumenteil Lösung B) zugesetzt und die Proben für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 50 µl Folin-Ciocalteau Reagenz hinzugegeben, für weitere 30 min unter Lichtschutz inkubiert und die Absorption bei 750 nm vermessen. Aus der Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben ermittelt.

### 3.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Proteine können mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Hier wurde die diskontinuierliche Methode nach Lämmli *et al.* verwendet, bei der die Proteinproben vor der eigentlichen Trennung in einem großporigen Sammelgel (5 % Acrylamid) fokussiert werden [141]. Vor dem Auftragen der Proben wurden intramolekulare Disulfidbrücken durch kurzes Erhitzen in Anwesenheit von DTT reduziert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem Trenngel kleinerer Porenweite (7,5 % Acrylamid).

**Tabelle 3.8:** Lösungen für die Herstellung von Polyacrylamidgelen (für 2 Gele).

<b>Trenngel-Lösung</b>		pH 8,8
12,1 g	Tris	1,0 mol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>Sammelgel-Lösung</b>		pH 6,8
12,1 g	Tris	1,0 mol/l
ad 100,0 ml	dest. Wasser	
<b>SDS-Lösung</b>		
1,0 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10,0 % (m/V)
ad 10,0 ml	dest. Wasser	
<b>APS-Lösung</b>		
100,0 mg	Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10,0 % (m/V)
ad 1,0 ml	dest. Wasser	

### Durchführung

Sämtliche für die SDS-Gelektrophorese benötigten Lösungen wurden vor Versuchsbeginn wie in den Tabellen 3.8 und 3.9 beschrieben hergestellt. Der Elektrophoresepuffer wurde aus der zehnfach konzentrierten Stammlösung durch Verdünnung mit dest. Wasser im Verhältnis 1:10 hergestellt. Vor dem Gießen der Polyacrylamidgele wurden die Bestandteile der Gelkammern mit Isopropanol gereinigt und die Kammer nach dem Zusammenbau mit dest. Wasser auf Dichtigkeit geprüft.

Die zu untersuchenden Proben (vgl. Kapitel 3.3.1) wurden zunächst mit Tris-Lösung (vgl. Tabelle 3.9) so verdünnt, dass sich eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl ergab. Die gewünschte Proteinmenge (1–10 µg pro Bahn) wurde anschließend vorgelegt und mit Tris-Lösung auf 10 µl ergänzt.

Zur Herstellung des Trenngels wurden zunächst Acrylamid-Lösung, Trenngel-Lösung, dest. Wasser sowie die SDS-Lösung in einem 50 ml PP-Röhrchen gemischt und anschließend durch Zugabe von TEMED und APS-Lösung die Polymerisation gestartet (vgl. Tabelle 3.10). Die Mischung wurde zügig in die vorbereiteten Gelkammern gefüllt und mit 2-Propanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 10 min wurde das 2-Propanol verworfen und das Sammelgel nach der zuvor beschriebenen Methode vorbereitet. Auch diese Mischung wurde in die Gelkammern gefüllt und anschließend der Kamm eingesetzt. Die Polymerisationszeit betrug in diesem Fall ca. 30 min. In der Zwischenzeit erfolgte die weitere Vorbereitung der Proben. Dazu wurden zu einem Aliquot Probenauftragpuffer 25 µl DTT-Lösung (20x) addiert und gut gemischt. Jeweils 10 µl dieser Lösung wurden zu den bereits

**Tabelle 3.9:** Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.

<b>Tris-Lösung 20 mmol/l</b>		
24,0 mg	Tris	20 mmol/l
ad 10,0 ml	dest. Wasser	
<b>Bromphenolblau-Lösung, gesättigt</b>		
ca. 1 mg	Bromphenolblau	gesättigt
ad 10,0 ml	dest. Wasser	
<b>Probenauftragspuffer (2x)</b>		
1,75 ml	Sammelgel-Lösung	184 mmol/l
1,50 ml	Glycerol 100 %	15,0 % (V/V)
5,0 ml	SDS-Lösung	5 % (m/V)
1,25 ml	Bromphenolblau-Lösung	15,0 % (V/V)
aliquotieren zu 475 µl		
<b>DTT-Lösung (20x)</b>		
49,4 mg	Dithiothreitol (DTT)	3,20 mol/l
ad 100 µl	dest. Wasser	
<b>Elektrophoresepuffer (10x)</b>		
30,0 g	Tris	0,25 mol/l
144,0 g	Glycin	1,92 mol/l
10,0 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	1,0 % (m/V)
ad 1000,0 ml	dest. Wasser	

verdünnten Proteinproben gegeben und diese sowie der Proteinstandard für etwa 5 min bei 95 °C denaturiert.

Nach dem Ende der Polymerisationszeit wurde der Kamm entfernt, die Elektrophoresekammer zusammengebaut und mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Taschen wurden vor dem Auftragen der Proben und des Standards (5 µl) mit Elektrophoresepuffer gespült. Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 200 V so lange, bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte (ca. 40 min). Nach dem Entfernen des Sammelgels wurde das Trenngel für den Western Blot verwendet.

### 3.3.4 Western-Blot

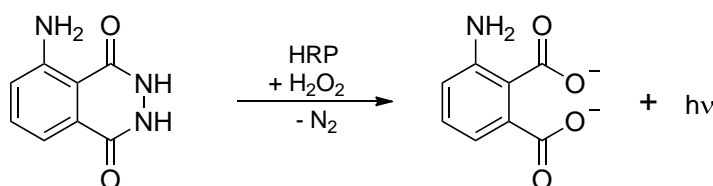
Beim Western Blot werden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem Gel eluiert und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)

**Tabelle 3.10:** Herstellung von Trenn- und Sammelgel (je 2 Gele).

Bestandteil	Trenngel, 7,5 %	Sammelgel, 5 %
Acrylamid-Lösung 30 %	3,750 ml	0,836 ml
Trenngel-Lösung	5,625 ml	-
Sammelgel-Lösung	-	0,625 ml
dest. Wasser	5,365 ml	3,445 ml
SDS-Lösung	0,150 ml	0,050 ml
TEMED	0,027 ml	0,005 ml
APS-Lösung	0,105 ml	0,021 ml

Membran übertragen. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membranoberfläche kann die Expression von ABCB1 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers C219 nachgewiesen werden. Dieser Antikörper bindet an ein hochkonserviertes intrazelluläres Epitop des Proteins, wobei sowohl humanes ABCB1 als auch die entsprechenden Proteine anderer Säuger erkannt werden [142, 143]. Anschließend kann ein sekundärer Antikörper, der kovalent an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden ist, an das Fc-Fragment des primären Antikörpers binden.

Zum Nachweis der Antikörperbindung wird die Membran mit einer alkalischen Lösung von 5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion (Luminol) und Wasserstoffperoxid inkubiert. Dabei wird Luminol - katalysiert durch die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase - durch Wasserstoffperoxid zu einem angeregten Dianion oxidiert. Die bei der Rückkehr in den Grundzustand entstehende Chemilumineszenz kann mit Hilfe einer Gamma-Kamera detektiert und dokumentiert werden (vgl. Abbildung 3.1). Viele derartige Reagenzien enthalten zusätzlich p-Iodphenol, welches als Kofaktor bei der Peroxidase-Reaktion fungiert.

**Abbildung 3.1:** Reaktionsschema für die Umsetzung von Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid.

### Durchführung

Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurden die in Tabelle 3.11 beschriebenen Pufferlösungen hergestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Lösung des primären Antikörpers C219 konnte bei 4 °C gelagert und mehrfach wieder verwendet werden. Die Lö-

**Tabelle 3.11:** Pufferlösungen für den Western Blot.

<b>Transferpuffer</b>			
28,8 g	Glycin		192 mmol/l
6,1 g	Tris		25 mmol/l
ad 2000,0 ml	dest. Wasser		
<b>TBS-Stammlösung (10x)</b>			pH 7,3
40,0 g	Natriumchlorid		1,37 mmol/l
6,06 g	Tris		100 mmol/l
ad 500,0 ml	dest. Wasser		
<b>TBS-T-Lösung</b>			
100,0 ml	TBS-Stammlösung		
2,0 ml	Tween 20		0,2 % (V/V)
ad 1000,0 ml	dest. Wasser		
<b>Blockierungslösung</b>			
2,5 g	Milchpulver		5,0 % (m/V)
ad 50,0 ml	TBS-T Lösung		

sung des sekundären Antikörpers (vgl. Tabelle 3.12) dagegen wurde jeweils frisch hergestellt und nach der Verwendung verworfen.

In einem ersten Schritt wurde die PVDF-Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten, für 20 s in Methanol äquilibriert und bis zur Verwendung in Transferpuffer aufbewahrt. Das bei der Gelelektrophorese erhaltene Trenngel wurde ebenfalls für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Gel und Membran wurden anschließend luftblasenfrei in die Blot-Kassette eingesetzt und diese zusammen mit einem Kühllakku in den Blot-Tank eingesetzt. Nachdem der Tank vollständig mit kaltem Transferpuffer gefüllt worden war, erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran bei 100 V (60 min).

Nach dem Ende des Blot-Vorganges wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 60 min in 50 ml Blockierungslösung geschüttelt. Anschließend wurde sie dreimal für 10 min mit TBS-T gespült und schließlich für weitere 60 min mit 10 ml der Lösung des primären Antikörpers inkubiert. Die Membran wurde dann über Nacht in der primären Antikörper-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag erfolgte die Reaktion mit dem sekundären Antikörper (Anti-mouse IgG) sowie die Detektion des ABCB1. Nach dem Entfernen der primären Antikörper-Lösung wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T gespült und dann für 90 min mit 10 ml der frisch hergestellten Arbeitslösung des sekundären Antikörpers inkubiert. Schließlich wur-

**Tabelle 3.12:** Antikörper-Lösungen für den Western Blot (für 2 Membranen).

<b>Primärer ABCB1 Antikörper C219</b>		1:640
20,0 mg	Natriumazid	0,1 % (m/V)
1,0 g	BSA	5,0 % (m/V)
31,2 µl	Antikörper C219	
ad 20,0 ml	TBS-T Lösung	
<b>Sekundärer Antikörper, Stammlösung</b>		
5 µl	Antikörper HRP-conjugated Anti-mouse IgG	
45 µl	TBS-T Lösung	
<b>Sekundärer Antikörper, Arbeitslösung</b>		1:20.000
1,0 g	Milchpulver	5 % (m/V)
10 µl	Sek. Antikörper, Stammlösung	
ad 20,0 ml	TBS-T Lösung	

de weitere zweimal mit TBS-T gewaschen und die Membran bis zur weiteren Verwendung in dieser Lösung gelagert. Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran mit 2 ml des gemäß Herstellerangabe zubereiteten ECL-Reagenzes benetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mittels des Versa Doc Imagine Blot Detection System 5000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) detektiert und dokumentiert.

### 3.3.5 Nachweis der ABCB1 Expression mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper

Die ABCB1 Expression in verschiedenen Zelllinien wurde zusätzlich mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 17F9 (BD Biosciences, San Diego, USA) nachgewiesen. Dieser bindet im Gegensatz zu C219 (vgl. Kapitel 3.3.4) selektiv an ein extrazelluläres Epitop des humanen Proteins. Die zusätzliche Markierung des Antikörpers mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ermöglicht eine direkte Detektion des zellulären ABCB1 mittels Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 3.4.1), weshalb er gut für den Nachweis von humanem ABCB1 in lebenden Zellen geeignet ist [144, 145].

#### Durchführung

Die benötigte phosphatgepufferte Kochsalzlösung (vgl. Kapitel 3.1.2.1) wurde spätestens am Tag vor dem Versuch hergestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Waschpuffer und Anfärbepuffer (vgl. Tabelle 3.13) wurden am Versuchstag frisch hergestellt und auf Eis gelagert.

**Tabelle 3.13:** Lösungen für den ABCB1 Nachweis mittels Antikörper.

<b>Waschpuffer</b>		pH 7,4
1,25 g	BSA	0,5 % (m/V)
ad 250,0 ml	PBS	
<b>Anfärbepuffer</b>		pH 7,4
1,25 g	BSA	0,5 % (m/V)
0,25 g	Natriumazid	0,1 % (m/V)
ad 250,0 ml	PBS	

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von der Gewebekulturflasche abgelöst, nach der Zentrifugation in 10 ml sterilem PBS resuspendiert und gegebenenfalls subkultiviert. Die Zellzahl in der so erhaltenen Suspension wurde bestimmt und anschließend 1 Million Zellen in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt. Dabei wurden für jede Zelllinie insgesamt drei Proben vorbereitet. Das nach Zentrifugation ( $266 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 4 min) und vorsichtigem Absaugen des Überstandes erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml kaltem Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 2 ml gekühltem Anfärbepuffer gewaschen und das Zellpellet schließlich in 100  $\mu\text{l}$  Anfärbepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  der gebrauchsfertigen Antikörper-Lösung zu jeweils zwei der drei Proben wurden alle unter Lichtschutz für 40 min auf Eis inkubiert. Die nicht mit dem Antikörper behandelte Probe diente zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen.

Am Ende der Inkubationszeit wurden alle Ansätze mit 2 ml Anfärbepuffer überschichtet und erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das resultierende Zellpellet in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und die Proben nach dem Überführen in FACS-Röhrchen mit den in Tabelle 3.14 aufgeführten Geräteparametern am Durchflusszytometer vermessen. Dabei wurde für jede Probe die zelluläre Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ext.}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 530 \pm 15 \text{ nm}$ ) von 10 000 Zellen vermessen. Basierend auf dem FSC-SSC Dotplot wurde jene Zellpopulation ermittelt, die einzelne lebende Zellen beinhaltet und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzwerte zur Auswertung herangezogen (vgl. Kapitel 3.4.1). Die jeweilige zelluläre Eigenfluoreszenz wurde hierbei von den betreffenden Messwerten der beiden anderen Proben subtrahiert.

### 3.3.6 Immunohistochemische Untersuchungen

Zur Veranschaulichung einiger Sachverhalte wurden Präparate für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung hergestellt. Dabei werden bestimmte zelluläre Strukturen mit Hilfe ge-

**Tabelle 3.14:** Geräteparameter für die Detektion von ABCB1.

Parameter	Voltage	Amp. Gain	Mode
FSC	E00	1.00	lin
SSC (A2780)	350 V	1.00	lin
SSC (CHO-K1)	320 V	1.00	lin
FL-1	500 V	1.00	log

eigneter Fluoreszenzfarbstoffe oder entsprechend markierter Antikörper angefärbt und die Zellen so präpariert, dass sie einer mikroskopischen Betrachtung zugänglich waren. Die mit dem im Folgenden beschriebenen Verfahren hergestellten Präparate sind bei korrekter, vor Licht geschützter Lagerung mehrere Wochen stabil.

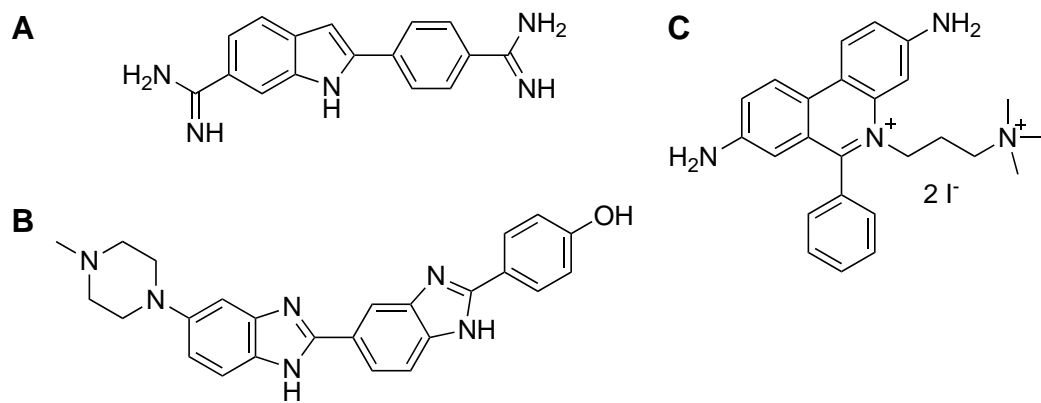
### **Vorbereitung und Fixieren von Zellen**

Alle im Folgenden für die Präparation benötigten Lösungen mit Ausnahme von PBS (vgl. Kapitel 3.1.2.1) wurden am Versuchstag frisch hergestellt. In einem ersten Schritt wurden runde Deckgläschen (steril) in die Vertiefungen von 6-well Gewebekulturplatten platziert und mit 2 ml Nährmedium überschichtet. Die zu untersuchenden Zelllinien wurden dann wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von einer Gewebekulturflasche abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und gegebenenfalls subkultiviert. Anschließend wurden diese gezählt und so viele Zellen in die Vertiefungen der vorbereiteten Gewebekulturplatten pipettiert, dass sich nach ein bis zwei Tagen vereinzelte Kolonien bildeten. Im Falle der Zelllinien A2780 und A2780 Adr wurden jeweils 350 000 Zellen, bei den deutlich schneller wachsenden CHO-K1 pcDNA und CHO-K1 M403 Zellen 100 000 Zellen ausgesät. War die gewünschte Zelldichte erreicht, wurde das Nährmedium entfernt, der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend fixiert. Zu diesem Zweck wurde nach dem Absaugen der Überstände 1 ml frisch hergestellte 3,7%ige Formaldehyd-Lösung zugegeben und für 5-10 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

### **Visualisierung von ABCB1 mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper**

Zum Anfärben von ABCB1 in der Zellmembran wurde der in Kapitel 3.3.5 beschriebene FITC-markierte monoklonale Antikörper 17F9 verwendet. Hierzu wurde die zum Fixieren der Zellen verwendete Formaldehyd-Lösung abgesaugt und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 ml BSA-Lösung (1 % in PBS) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min und dem Entfernen dieser Lösung wurden vorsichtig 50 µl Antikörper-Lösung (1:10 verdünnt in 1 % BSA) auf das Deckgläschen pipettiert, dieses mit einem zweiten Deckgläschen abgedeckt und die Platten für 40 min unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurde das obere Deckgläschen entfernt und die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gespült.





**Abbildung 3.2:** Strukturen der zum Anfärben von Zellkernen verwendeten Farbstoffe DAPI (A), Hoechst 33258 (B) und Propidiumiodid (C).

### Anfärben von Zellkernen

Das Anfärben der Zellkerne diente einer besseren Orientierung innerhalb der präparierten Zellen. Grundsätzlich standen hierfür zwei verschiedene Methoden zur Verfügung, die in Abhängigkeit von den spektralen Eigenschaften der sonstigen betrachteten Farbstoffe eingesetzt wurden. Die Strukturen der verwendeten Farbstoffe sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

In der Regel wurden die Kernfärbungen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff 4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach dem Fixieren und der optionalen Antikörperfärbung vor Licht geschützt für 5-10 min mit 40  $\mu$ l einer DAPI-Lösung (5  $\mu$ g/ml in PBS) behandelt und anschließend erneut mit 1 ml PBS gewaschen. Anstelle von DAPI konnte auch die gleiche Menge des ebenfalls interkalierenden Farbstoffes Hoechst 33258, einem Bis-Benzimidazol Derivat, verwendet werden.

Alternativ wurden Zellkerne mit Propidiumiodid angefärbt, welches sich von den zuvor beschriebenen Substanzen sowohl in seiner Exzitations- als auch Emissionswellenlänge unterscheidet. Vor der eigentlichen Färbung mussten die Zellen hier zunächst bei 37 °C für 30 min mit Ribonuclease A (100  $\mu$ g/ml in PBS) behandelt werden. Nach dem Absaugen dieser Lösung und einmaligem Spülen mit 1 ml PBS wurden 50  $\mu$ l Propidiumiodid-Lösung (5  $\mu$ mol/l in PBS) zupipettiert und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde erneut mit 1 ml PBS gewaschen.

### Intrazelluläre Akkumulation fluoreszierender Substanzen

Um die intrazelluläre Akkumulation bekannter ABCB1 Substrate und anderer fluoreszierender Testsubstanzen zu visualisieren wurden die Zellen vor dem Fixieren für eine bestimmte Zeit bei 37 °C mit einer definierten Konzentration der entsprechenden Verbindungen inku-

**Tabelle 3.15:** Übersicht über alle für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Substanzen und Antikörper.

Substanz	$c_{\text{end}}$	t	$\lambda_{\text{ext.}}$	$\lambda_{\text{em.}}$
FITC-17F9		40 min	488 nm	500-530 nm
DAPI	5 $\mu\text{g/ml}$	10 min	405 nm	425-475 nm
Hoechst 33258	5 $\mu\text{g/ml}$	10 min	405 nm	425-475 nm
Propidiumiodid	5 $\mu\text{mol/l}$	15 min	488 nm	552-617 nm
Rhodamin 123	0,3 $\mu\text{mol/l}$	120 min	488 nm	500-530 nm
LM-8.1	10 $\mu\text{mol/l}$	180 min	405 nm	425-475 nm

biert (vgl. Tabelle 3.15). Anschließend konnten zusätzlich die zuvor beschriebenen Färbungen durchgeführt werden.

### Fertigstellung der Präparate

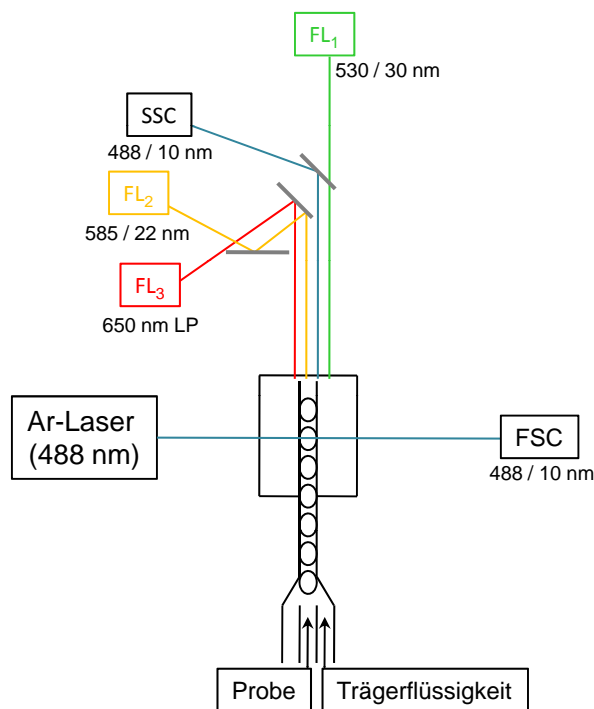
Nach dem letzten abschließenden Waschschrift wurden die Deckgläschen mit 1 ml dest. Wasser überschichtet, vorsichtig aus der Gewebekulturplatte entnommen und kurz auf Zellstoff getrocknet. Anschließend wurden sie mit einem Tropfen Mounting Medium auf beschrifteten Objektträgern fixiert und bis zum vollständigen Aushärten (über Nacht) unter Lichtschutz aufbewahrt. Abschließend wurde die Kante des Deckgläschens mit Klarlack überzogen, um das Präparat endgültig zu versiegeln. Die fertigen Objekte wurden vor Licht geschützt gelagert und mit einem konfokalen Mikroskop bei den in Tabelle 3.15 aufgeführten Exzitations- und Emissionswellenlängen betrachtet und dokumentiert.

## 3.4 Funktionelle Charakterisierung von ABC-Transportern mittels Durchflusszytometrie

### 3.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence activated cell sorting) stellt eine spektroskopische Methode dar, mit der sich diverse Eigenschaften einzelner lebender Zellen charakterisieren lassen. Ein Durchflusszytometer besteht grundlegend aus drei funktionellen Einheiten: Einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System sowie einer signalverarbeitenden Einheit.

Das Messverfahren basiert auf dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. Hierbei wird die zu untersuchende Zellsuspension durch eine Kanüle in eine schnell in die gleiche Richtung fließende Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) injiziert. Die hierdurch verursachte perlschnurartige Aufreihung der Zellen innerhalb der Trägerflüssigkeit ermöglicht die separate optische Erfassung jeder einzelnen Zelle [146, 147].



**Abbildung 3.3:** Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers. Mit dem verwendeten Gerät kann neben dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) die zelluläre Fluoreszenz in drei Fluoreszenzkanälen (FL<sub>1</sub>–FL<sub>3</sub>) gemessen werden. Angegeben ist der jeweils detektierbare Wellenlängenbereich; im Fall von FL<sub>1</sub> z.B. 530/30 nm (515–545 nm).

Die so vereinzelt Zellen treffen in der Messzelle auf einen Laserstrahl, der im Falle des

hier verwendeten Gerätes (FACScalibur<sup>®</sup>, BD Biosciences, San Jose, USA) von einem Argonlaser (Anregungswellenlänge 488 nm) erzeugt wird. Das optische Detektionssystem erfasst anschließend eine Reihe verschiedener Parameter, die zur Charakterisierung der betrachteten Zellen herangezogen werden können (vgl. Abbildung 3.3).

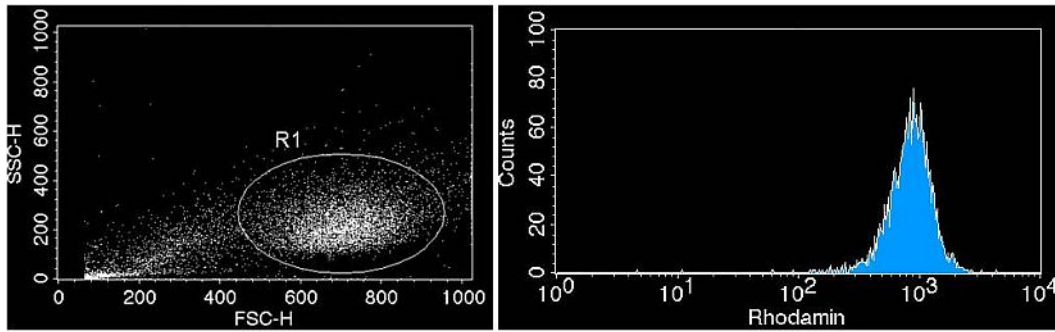
- Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Angle Light Scatter) wird axial zur Anregungsrichtung gemessen, ist proportional zur Zelloberfläche und damit ein Maß für die Größe der betrachteten Zelle.
- Das durch intrazelluläre Brechung und Reflexion erzeugte Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) wird orthogonal zur Anregungsrichtung detektiert. Es stellt ein Maß für die Granularität bzw. intrazelluläre Komplexität der Zelle dar.
- Die nach Anregung durch den Argonlaser emittierte zelluläre Fluoreszenz kann in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (FL<sub>1</sub>–FL<sub>3</sub>) detektiert werden. Dies erfolgt ebenfalls im rechten Winkel zur Anregungsrichtung.

Durch Messung der Fluoreszenz können bestimmte zelluläre Strukturen nach dem Anfärben mit spezifischen Farbstoffen oder entsprechend markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Das emittierte Licht wird dabei durch geeignete Interferenzfilter selektiert und mit Hilfe von Photodetektoren (PMTs, Photomultiplier-Tubes) verstärkt und detektiert [147]. Für die Kanäle FL<sub>1</sub> und FL<sub>2</sub> finden zu diesem Zweck sogenannte Band-pass Filter Verwendung, die für Licht eines definierten Wellenlängenbereiches durchlässig sind. Im dritten Fluoreszenzkanal (FL<sub>3</sub>) wird nur Licht mit Wellenlängen oberhalb eines bestimmten Grenzwertes detektiert (Long-pass Filter).

#### **Datenanalyse**

Die ermittelten Messwerte können anschließend in Form von Histogrammen oder sogenannten Dotplots visualisiert werden. Während im Histogramm eine eindimensionale Häufigkeitsverteilung der Messwerte dargestellt wird, können mit Hilfe eines Dotplots mehrere Parameter parallel betrachtet werden. Im Folgenden soll die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Auswertung durchflusszytometrischer Experimente kurz dargestellt werden. In dem ausgewählten exemplarischen Versuch wurden A2780 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 angefärbt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der Software Cell-Quest Pro<sup>®</sup> 5.2.1 (BD Biosciences, San Jose, USA).

Basierend auf einem FSC-SSC Dotplot wurden zunächst jene Zellen ausgewählt, die die Hauptpopulation in der vermessenen Probe darstellten (Abbildung 3.4, links). Diese beinhaltete in der Regel vitale Einzelzellen, wodurch tote Zellen sowie unerwünschte größere Zellagglomerate von der Auswertung ausgeschlossen werden konnten. Diese Festlegung erfolgte



**Abbildung 3.4:** Analyse der Rohdaten eines durchflusszytometrischen Experimentes (Anfärben von A2780 Zellen mit Rhodamin 123). Links: FSC-SSC Dotplot; die Region „R1“ beinhaltet vitale Einzelzellen. Rechts: Histogramm der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz (FL<sub>1</sub>) der basierend auf dem Dotplot selektierten Zellen (R1).

für jedes Experiment in der Regel anhand einer unbehandelten Probe, die keine potentiell toxischen Testsubstanzen enthielt. Die in dieser Population gemessenen Fluoreszenzwerte wurden anschließend in Form eines Histogrammes (Abbildung 3.4, rechts) dargestellt und der zugehörige Mittelwert berechnet. Da die zelluläre Fluoreszenz in vielen Fällen keiner idealen Normalverteilung entsprach, wurde der geometrische Mittelwert verwendet.

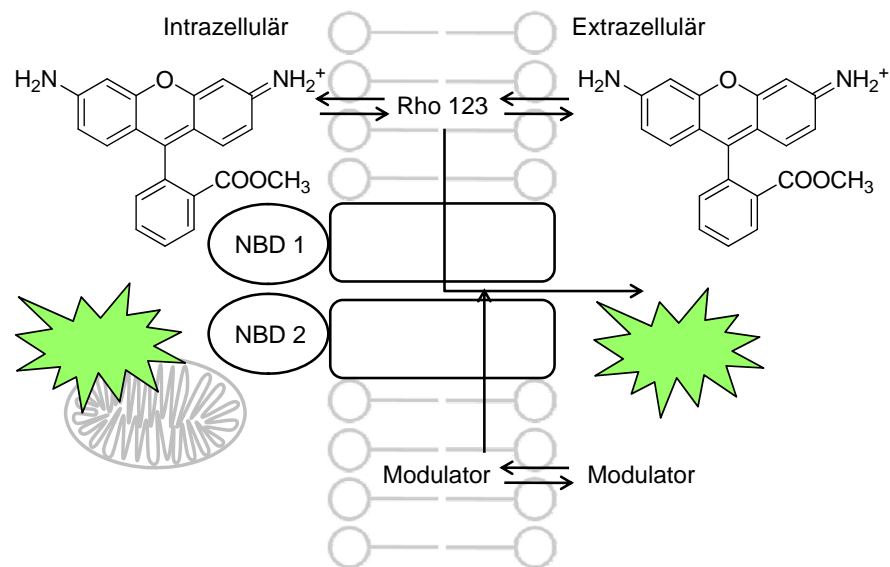
### 3.4.2 Bestimmung der intrazellulären Konzentration fluoreszierender ABCB1 Substrate

#### 3.4.2.1 Akkumulationsassays für ABCB1

Zur funktionellen Charakterisierung von ABCB1 kann eine Vielzahl fluoreszierender Substrate des Transporters eingesetzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden hierzu das Zytostatikum Daunorubicin (DNR) sowie die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 (Rho 123) und Tetramethylrosamin (TMR) verwendet. Die entsprechenden Akkumulationsassays besitzen ein einheitliches Funktionsprinzip, welches am Beispiel des Rhodamin 123 kurz dargestellt werden soll.

Das Xanthen-Derivat Rhodamin 123 ist ein bekanntes ABCB1-Substrat aus der Klasse der Triphenylmethanfarbstoffe ( $\lambda_{\text{ext.}} = 507 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 529 \text{ nm}$ ), welches sich aufgrund seiner spektralen Eigenschaften gut für durchflusszytometrische Untersuchungen eignet [148].

Die Substanz gelangt durch passive Diffusion in die Zelle, wo sie sich - wie auch eine Reihe weiterer lipophiler, basischer Farbstoffe - hauptsächlich in den Mitochondrien anreichert [149, 150]. In Zellen, die sich durch eine erhöhte Expression von ABCB1 auszeichnen, wird Rhodamin 123 dagegen aktiv aus der Zelle heraus transportiert (vgl. Abbildung 3.5). Dabei folgt die intrazelluläre Anreicherung der Verbindung einer Kinetik erster Ordnung, sodass



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Rhodamin 123 Akkumulationsassays.

sich nach einer gewissen Inkubationszeit ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom einstellt. Die intrazelluläre Fluoreszenz im Steady-State kann mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden. Wird ABCB1 hingegen durch den Zusatz eines entsprechenden Modulators inhibiert oder aktiviert, kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung bzw. Abnahme der Fluoreszenz.

### Durchführung

In einem ersten Schritt wurden zehnfach konzentrierte Lösungen der Testsubstanzen in KHP hergestellt und 200 µl dieser Lösungen oder KHP in FACS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von einer T175 Gewebekulturflasche abgelöst. Nach der Zentrifugation wurde das resultierende Pellett in 5 ml steriler PBS aufgenommen und die Zellen bei Bedarf subkultiviert. Anschließend wurde erneut bei  $266 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 4 min zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml sterilfiltriertem KHP resuspendiert. Die Zellzahl wurde ermittelt und mit KHP auf eine Zelldichte von 1,25 Mio/ml eingestellt. 1,6 ml dieser Zellsuspension wurden in die vorbereiteten FACS-Röhrchen überführt und diese unter leichtem Schütteln für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden 200 µl einer zehnfach konzentrierten Lösung des gewünschten Fluoreszenzfarbstoffes (vgl. Tabelle 3.16) zugesetzt und die Proben weiterhin unter den zuvor genannten Bedingungen inkubiert. So ergab sich eine finale Zelldichte von 1 Mio/ml. Alle 10 min wurde die zelluläre Fluoreszenz von 10 000 Zellen für maximal 30 s mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen, bis kein weiterer Fluoreszenzanstieg detektierbar war. Vor

jeder einzelnen Messung wurden die Proben kurz durchmischt. Die Auswertung erfolgte wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 3.4.1), wobei die ermittelten Plateau-Fluoreszenzwerte u.a. zur Generierung von Konzentrations-Effekt-Kurven herangezogen werden konnten.

### 3.4.2.2 Übertragung auf Mikrotiterplatten

Da diese Vorgehensweise sich für die funktionelle Testung von ABCB1-Modulatoren im größeren Maßstab als unpraktikabel erwies, wurde die Methode in leicht abgewandelter Form auf Mikrotiterplatten übertragen. Hierbei wurden die Zellen ebenfalls mit dem gewünschten Farbstoff in An- und Abwesenheit einer Testsubstanz inkubiert, die intrazelluläre Fluoreszenz wurde jedoch lediglich zu einem definierten Zeitpunkt im Steady-State ermittelt.

In der Regel wurde eine zehnfach konzentrierte Verdünnungsreihe der Testsubstanzen und eines Standard-Inhibitors (XR9577) in KHP (0,01–10 µmol/l) hergestellt und 10 µl dieser Lösungen oder KHP in die Vertiefungen einer 96er-Rundboden-Mikrotiterplatte pipettiert. Dann wurden die benötigten Zellen von der Gewebekulturflasche abgelöst, gewaschen, gezählt und die Zelldichte mit KHP auf 1,25 Mio/ml eingestellt. 80 µl dieser Suspension wurden in jede Vertiefung der vorbereiteten Mikrotiterplatte überführt und diese für 15 min im Inkubator bei 37 °C gelagert. Anschließend wurden zügig 10 µl der zehnfach konzentrierten Farbstoff-Lösung zugesetzt. Zusätzlich wurden mehrere Wells mit KHP anstelle des Substrates versetzt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen messen zu können. Die Platten wurden nun bei 37 °C inkubiert, bis das Steady-State erreicht war. Die hierfür benötigte Inkubationsdauer hing von dem verwendeten Substrat ab (vgl. Tabelle 3.16).

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde die zelluläre Fluoreszenz mit Hilfe des Durchflusszytometers ermittelt (vgl. Kapitel 3.4.1). Die für die verschiedenen Substrate verwendeten Inkubationszeiten und Anregungs- sowie Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Die verwendeten Geräteparameter entsprachen den in Tabelle 3.14 aufgeführten. Die Messung erfolgte im sogenannten HTS-Modus (High-Throughput-Screening) bei 37 °C, wobei pro Well 10 µl jeder Probe innerhalb von 3 s vermessen wurden. Um in dieser geringen Zeitspanne eine ausreichende Anzahl von Zellen erfassen zu können, wurden die Proben vor der Messung mit Hilfe einer Multikanalpipette kurz resuspendiert. In der Regel konnten so mehrere Tausend Zellen pro Well vermessen werden, wodurch auch bei solchen Proben, die eine stärkere Streuung der intrazellulären Fluoreszenzwerte aufwiesen, ein statistisch aussagekräftiger Mittelwert bestimmt werden konnte.

Zur Auswertung wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzwerte aller einzelnen, vitalen Zellen verwendet (vgl. Kapitel 3.4.1). Diese wurden in das Programm Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 übertragen und die zelluläre Eigenfluoreszenz von den in Anwesenheit des Substrates

**Tabelle 3.16:** Übersicht über die für Akkumulationsassays (ABCB1) verwendeten Farbstoffe. Aufgeführt sind die jeweils eingesetzten Konzentrationen ( $c_{\text{end}}$ ), die bei der Durchführung auf Mikrotiterplatten benötigte Inkubationszeit ( $t$ ) sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Farbstoff	$c_{\text{end}}$	$t$	$\lambda_{\text{ext.}}$	$\lambda_{\text{em.}}$
Rhodamin 123	0,3 $\mu\text{mol/l}$	120 min	488 nm	530 nm (FL <sub>1</sub> )
Tetramethylrosamin	0,3 $\mu\text{mol/l}$	60 min	488 nm	650 nm (FL <sub>3</sub> )
Daunorubicin	3 $\mu\text{mol/l}$	180 min	488 nm	650 nm (FL <sub>3</sub> )

gemessenen Werten subtrahiert. Die korrigierten Fluoreszenzwerte wurden schließlich gegen die zugehörige logarithmierte Modulatorkonzentration aufgetragen und eine durch die 4-Parameter logistische Gleichung (vgl. Kapitel 3.6.1) beschriebene Konzentrations-Effekt-Kurve generiert (GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0).

### 3.4.3 Messung des Rhodamin 123 Efflux

Zusätzlich zu dem zuvor beschriebenen Akkumulationsassay kann der ABCB1 vermittelte Transport von Rhodamin 123 auch direkt gemessen werden. Zu diesem Zweck werden die Zellen zunächst für eine bestimmte Zeit mit einem Überschuss des Farbstoffes beladen. Nach dem Austausch des Rhodamin 123-haltigen gegen substratfreies Medium kann die zeitabhängige Abnahme der zellulären Fluoreszenz in An- und Abwesenheit von ABCB1 Modulatoren detektiert werden. Diese Verfahrensweise bietet den Vorteil, dass der aktive Auswärtstransport des ABCB1-Substrates direkt verfolgt werden kann. Aufgrund der aufwendigeren Durchführung ist die Methode jedoch nicht für die Bearbeitung größerer Probenzahlen geeignet und wurde daher nur in einigen wenigen Fällen angewendet.

#### Durchführung

Die verwendeten Zellen wurden in einer T175 Gewebekulturflasche bis zu einer Konfluenz von maximal 90% kultiviert und wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von dieser abgelöst und bei Bedarf subkultiviert. Im Anschluss wurde die Zellzahl in der erhaltenen Suspension ermittelt und auf eine Dichte von 500 000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und diese über Nacht im Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) gelagert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurden pro Well 10 bzw. 50  $\mu\text{l}$  einer Lösung von Rhodamin 123 (100  $\mu\text{mol/l}$  in PBS) addiert sodass sich eine Endkonzentration von etwa 1 bzw. 5  $\mu\text{mol/l}$  des Substrates ergab. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 2 h (37 °C) wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 250  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und 1 ml frisches Nährmedium, dem gegebenenfalls



eine definierte Konzentration eines ABCB1-Modulators zugesetzt worden war, hinzugegeben. Die zelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz (FL<sub>1</sub>, 550 V) wurde dann in definierten zeitlichen Abständen für etwa 60 bis 90 min mit Hilfe des Durchflusszytometers ermittelt. Zu diesem Zweck wurde das Nährmedium von den entsprechenden Proben abgesaugt, der Zellrasen mit 250 µl kalter PBS gewaschen und anschließend für 2 min bei 37 °C mit 100 µl Trypsin-EDTA Lösung inkubiert. Die nur noch lose anhaftenden Zellen wurden dann in 900 µl kalter PBS aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert (10 000 × g, Shortspin). Das nach dem Entfernen des Überstandes erhaltene Pellet wurde in 1 ml kaltem PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Der wie in Kapitel 3.4.1 beschriebene ermittelte geometrische Mittelwert der zellulären Fluoreszenzwerte wurde dann gegen die zugehörige Inkubationszeit aufgetragen. Eine schnellere bzw. stärkere Verringerung der Fluoreszenz deutete dabei auf eine erhöhte ABCB1 Aktivität hin, während bei vollständiger Inhibition des Transporters praktisch keine Fluoreszenzabnahme detektierbar war.

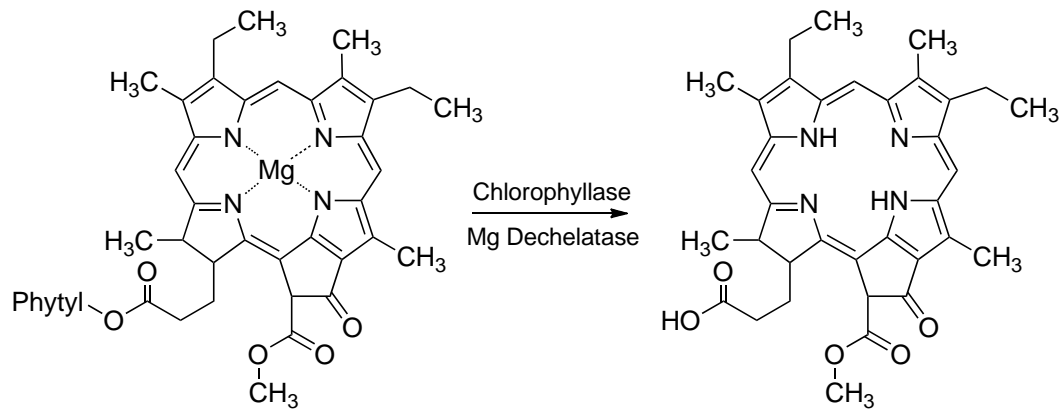
### 3.4.4 Pheophorbid A Akkumulationsassay für ABCG2

Bei Pheophorbid A (Pheo A) handelt es sich um ein Porphyrinderivat, welches eine Zwischenstufe im Chlorophyll-Abbau der Pflanzen darstellt (vgl. Abbildung 3.6). In einer Reihe von Publikationen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass Pheophorbid A ein Substrat des ABC-Transporters ABCG2 darstellt. ABCB1 und ABCC1 dagegen sind nicht in der Lage die Substanz zu transportieren, somit handelt es sich bei Pheophorbid A um ein selektives ABCG2-Substrat. Das photoaktive Molekül kann durch Licht der Wellenlänge 488 nm (Argonlaser) zur Fluoreszenz angeregt werden und ist somit gut für durchflusszytometrische Untersuchungen geeignet [151, 152]. Das grundlegende Prinzip der hier verwendeten Methode entspricht dem der für ABCB1 beschriebenen Akkumulationsassays (vgl. Kapitel 3.4.2) und soll hier nicht näher beschrieben werden.

#### Durchführung

Die Durchführung des Pheophorbid A Akkumulationsassays erfolgte wie in der Literatur beschrieben [153]. Wie bereits beschrieben wurde zunächst eine zehnfach konzentrierte Verdünnungsreihe der Testsubstanzen und eines Standard-Inhibitors (XR9577) in KHP vorbereitet und jeweils 10 µl der Lösungen in die Vertiefungen einer 96er-Mikrotiterplatte (Rundboden) überführt.

Die benötigten Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von maximal 90 % kultiviert und wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von diesen abgelöst. Nach der Zentri-



**Abbildung 3.6:** Reaktionsschema der Umsetzung von Chlorophyll A zum fluoreszierenden Pheophorbid A.

fugation ( $266 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 4 min) wurde das erhaltene Pellet in 5 ml steriler PBS resuspendiert und die Zellen bei Bedarf subkultiviert. Anschließend wurde erneut unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert, die Zellen in 5–10 ml KHP aufgenommen und die Zellzahl in der Suspension ermittelt. Für eine Mikrotiterplatte wurden nun 3 Mio. Zellen entnommen und mit KHP auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden jeweils 80  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension in die Vertiefungen der vorbereiteten Mikrotiterplatte überführt und diese dann für etwa 15 min im Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert.

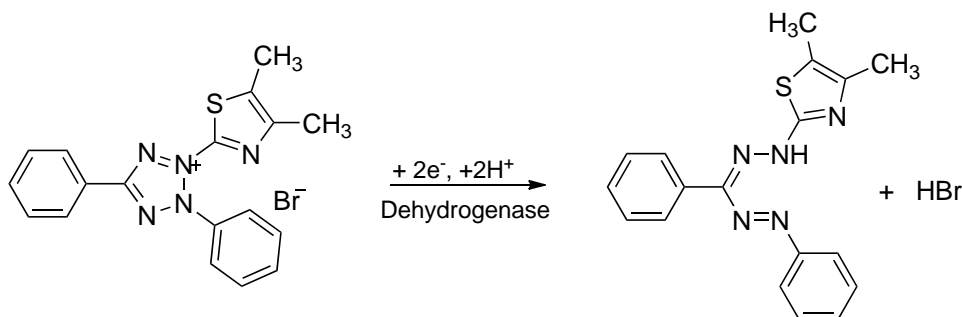
Nach dieser Vorinkubationsphase wurden in jedes Well zusätzlich 10  $\mu\text{l}$  einer Pheophorbid A Lösung pipettiert, sodass sich eine Endkonzentration des Farbstoffes von 1  $\mu\text{mol/l}$  ergab. Um die zelluläre Eigenfluoreszenz ermitteln zu können wurden zusätzlich mehrere Proben mit 10  $\mu\text{l}$  KHP anstelle des Substrates versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 120 min ( $37^\circ\text{C}$ ) wurde die Fluoreszenz nach Anregung bei 488 nm mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen (FL<sub>3</sub>, 650LP; 550 V und FL<sub>1</sub>, 530/30 nm; 550V). Dabei wurde wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben vorgegangen.

Basierend auf dem FSC-SSC Dotplot wurden wiederum lebende Einzelzellen selektiert und zur Auswertung herangezogen (vgl. Kapitel 3.4.1). Im Falle der Zelllinie MDCKII BCRP wurden aus dieser Population zusätzlich jene Zellen ausgewählt, die eine Fluoreszenz des mit ABCG2 gemeinsam exprimierten GFP (FL<sub>1</sub>, 530/30 nm; 550 V) aufwiesen (vgl. Kapitel 3.2.1). So war es möglich neben toten Zellen auch jene auszuschließen, die das gewünschte Zielprotein nicht in ausreichendem Maße exprimierten. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzwerte wurde anschließend in das Programm Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 kopiert und von sämtlichen Messwerten die ermittelte Eigenfluoreszenz der Zellen subtrahiert. Aus den so korrigierten Werten wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 sigmoide Konzentrations-Effekt Kurven erstellt.

## 3.5 Weitere funktionelle Methoden

### 3.5.1 MTT-Assay

Die Toxizität von zytostatisch wirksamen Arzneistoffen und diversen neuartigen Substanzen gegenüber verschiedenen Zelllinien wurde mit Hilfe des erstmalig von Mosmann *et al.* beschriebenen MTT-Assays ermittelt [154]. Dieser basiert auf der Tatsache, dass das wasserlösliche, gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT, Thiazolylblau) in lebenden Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem schwerlöslichen, blau gefärbten Formazan reduziert wird (vgl. Abbildung 3.7). Die Absorption des gebildeten Farbstoffes ist dabei proportional zur Zellvitalität.



**Abbildung 3.7:** Reaktionsschema der Reduktion des gelben MTT zum korrespondierenden blauviolett gefärbten Formazan.

### Durchführung

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte im Wesentlichen wie bei Müller *et al.* beschrieben [155]. Die verwendeten Zelllinien wurden zu diesem Zweck wie in Kapitel 3.2.2 dargestellt von einer Gewebekulturflasche abgelöst und gegebenenfalls subkultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl in der verwendeten Suspension ermittelt und diese nach einem weiteren Verdünnungsschritt in sterile 96-well Mikrotiterplatten mit flachem Boden überführt. Die eingesetzte Zellzahl wurde dabei so gewählt, dass sich nach 72 h Kultivierung in der unbehandelten Kontrolle eine Konfluenz von maximal 95 % ergab. In der Regel wurden dabei mit Hilfe einer Multikanalpipette 10 000 Zellen in einem Volumen von 90  $\mu\text{l}$  pro Well ausgesät. Damit die Zellen in den Platten anwachsen konnten, wurden diese für mehrere Stunden oder über Nacht im Inkubator gelagert (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ).

Nach dem Anheften der Zellen (mikroskopische Kontrolle) wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  einer zehnfach konzentrierten Lösung der Testsubstanzen in Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) zugegeben. Als Wachstums- oder Absterbekontrolle wurden zusätzlich Wells mit 10  $\mu\text{l}$  Natriumchlorid-Lösung bzw. DMSO beschickt. Dabei wurden die am Rande der Platte lokalisierten Vertie-

fungen nicht verwendet, da hier mit einer Verfälschung der Messergebnisse durch erhöhte Verdunstung des Mediums gerechnet werden musste. Anschließend wurden die Platten für weitere 72 h unter regulären Zellkulturbedingungen inkubiert.

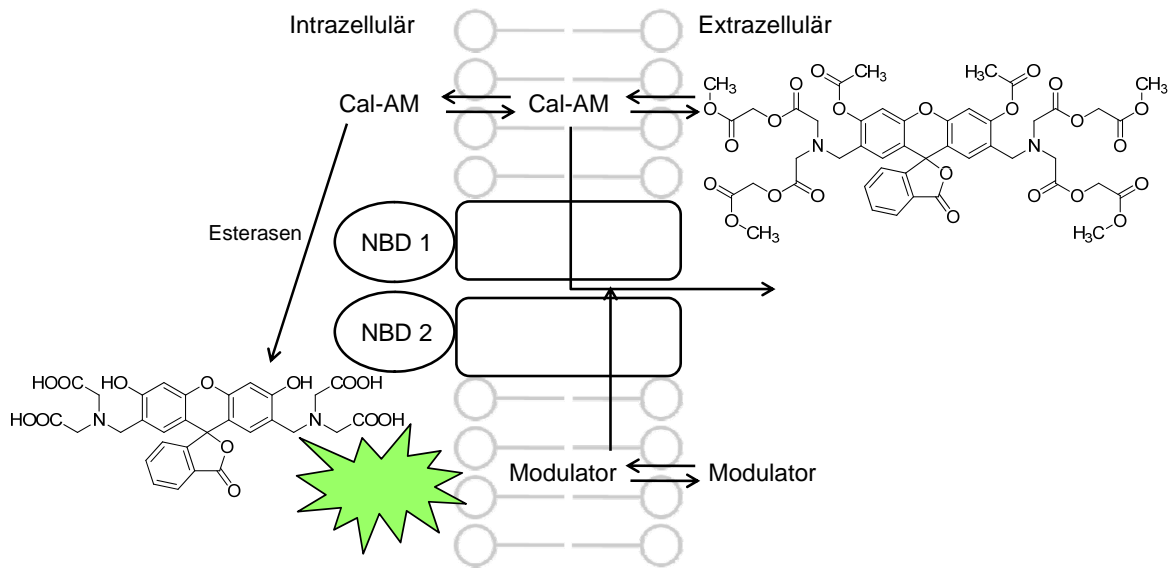
Eine Stunde vor dem Ende der Inkubationszeit wurden die Mikrotiterplatten aus dem Inkubator entnommen und in jede Vertiefung zusätzlich 20  $\mu$ l MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) pipettiert. Dann erfolgte eine weitere Inkubationsphase von ca. 60 min. Um die Bildung von größeren, zellschädigenden Formazan-Kristallen rechtzeitig erkennen zu können, wurden die Zellen dabei gelegentlich unter dem Mikroskop betrachtet. Schließlich wurde der Überstand aus den Platten entfernt und das gebildete schwerlösliche Formazan in 100  $\mu$ l Dimethylsulfoxid pro Well gelöst. Die Absorption des blauen Formazans bei 595 nm wurde dann mit Hilfe eines Fluostar<sup>®</sup> optima Microplaterereaders (BMG Lab Technologies) vermessen. Zusätzlich wurde die Hintergrundabsorption bei 710 nm ermittelt und diese von den Absorptionswerten des Farbstoffes subtrahiert.

Die so erhaltenen korrigierten Absorptionswerte wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration aufgetragen und mittels nicht-linearer Regression wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben sigmoide Konzentrations-Effekt-Kurven generiert. Hierzu wurde das Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 verwendet.

#### 3.5.2 Calcein-AM Assay

Der Calcein-AM Assay wurde eingesetzt, um die MDR modulierenden Eigenschaften potentieller neuer ABCB1- und ABCC1-Inhibitoren zu charakterisieren. Der Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) stellt ein Substrat sowohl von ABCB1 als auch von ABCC1 dar, welches aufgrund seiner Lipophilie leicht durch passive Diffusion in die Zelle gelangen kann. Intrazellulär wird Calcein-AM durch unspezifische Esterasen zum fluoreszierenden Calcein umgesetzt, welches aufgrund seiner mehrfach negativen Ladung die Zellmembran nicht überwinden kann und innerhalb der Zelle akkumuliert. Calcein stellt kein Substrat von ABCB1 dar, während es durch ABCC1 transportiert werden kann. Die Affinität von Calcein gegenüber diesem Transportprotein ist jedoch deutlich geringer, als die des AM-Esters [156].

In Zellen mit hoher ABCB1- oder ABCC1 Expression kann Calcein-AM durch beide Transporter effektiv aus der Zelle heraus transportiert werden. Da die Bindung des Substrates an das Protein vermutlich bereits innerhalb der Zytoplasmamembran stattfindet, steht intrazellulär somit nur eine geringe Menge des Esters zur Verfügung, die zum fluoreszierenden Calcein umgesetzt werden kann. Wird das betreffende Transportprotein jedoch durch einen geeigneten MDR-Modulator blockiert, kann Calcein-AM ungehindert in die Zelle gelangen,



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Calcein-AM Assays.

wo die zuvor beschriebene enzymatische Esterhydrolyse stattfindet. Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz folgt dabei einer Kinetik erster Ordnung, wobei die Steigung des initial linearen Kurvenabschnitts proportional zur Zunahme der intrazellulären Calcein-Konzentration ist. Somit kommt es in Anwesenheit des Inhibitors zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz [157]. Das grundlegende Funktionsprinzip des Calcein-AM Assays ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

### Durchführung

In einem ersten Schritt wurde eine zehnfach konzentrierte Verdünnungsreihe (Endkonzentration 0,01–10  $\mu\text{mol/l}$ ) der zu untersuchenden Testsubstanzen sowie einer geeigneten Standardsubstanz in KHP hergestellt. Für Untersuchungen an ABCB1 wurde in der Regel XR9577, im Falle von ABCC1 Ciclosporin als Standard eingesetzt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  in die Vertiefungen einer 96er-Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert.

Die verwendeten Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (T75) bis zu einer Konfluenz von maximal 90 % kultiviert und wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben von der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurde die Zellzahl in der erhaltenen Suspension ermittelt und die benötigte Menge Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dabei wurden für eine Mikrotiterplatte 3 Mio. Zellen eingesetzt. Diese wurden abzentrifugiert (10 000  $\times$  g, Shortspin), der Überstand entfernt und anschließend dreimal mit jeweils 1 ml KHP gewaschen. Das so erhaltene Zellpellet wurde wiederum in 1 ml KHP aufgenommen und in einer Pipettierschale mit weiteren 9 ml KHP gemischt. 90  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Multikanalpipette

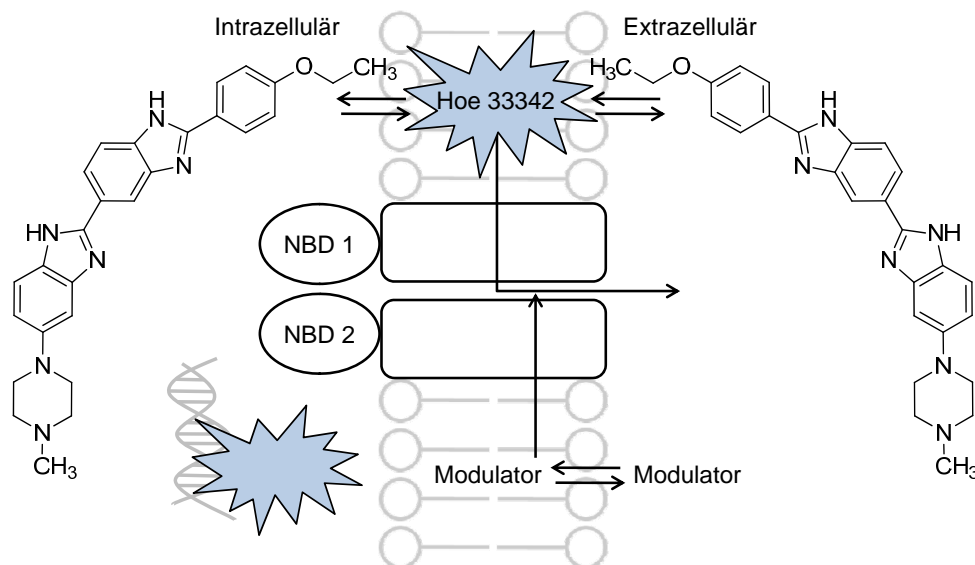
in die Vertiefungen der vorbereiteten Mikrotiterplatte überführt (27 000 Zellen pro Vertiefung) und diese für 15 bis 30 min bei 37 °C im Inkubator gelagert. Nach dem Ende dieser Inkubationszeit wurden pro Well 33 µl einer Calcein-AM-Lösung (1,25 µmol/l) zugesetzt, so dass sich eine Endkonzentration von 0,31 µmol/l Calcein-AM ergab. Die Mikrotiterplatten wurden sofort in einen auf 37 °C temperierten Microplatereader überführt und die intrazelluläre Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ext.}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$ ) für mindestens 40 min kontinuierlich gemessen.

Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden in das Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 transferiert und gegen die zugehörige Zeit aufgetragen. Durch lineare Regression wurde die Steigung des initial linearen Abschnitts der Fluoreszenz-Zeit-Kurve berechnet. Dabei konnten systematische Abweichungen von einem linearen Kurvenverlauf mit Hilfe des im Programm implementierten Runs-Tests festgestellt werden. Die ermittelten Steigungen wurden dann gegen die zugehörigen logarithmierten Modulatorkonzentrationen aufgetragen und eine Konzentrations-Effekt-Kurve generiert.

#### 3.5.3 Hoechst 33342 Akkumulationsassay

Das Bisbenzimidazol-Derivat Hoechst 33342 (Hoe 33342) ist ein Substrat sowohl von ABCB1 als auch von ABCG2 und kann somit zur funktionellen Charakterisierung beider Transporter verwendet werden. Die Verbindung weist, in Abhängigkeit des sie umgebenden Milieus, variable spektrale Eigenschaften auf. Im wässrigen Extrazellulärraum zeigt Hoechst 33342 lediglich eine überaus schwach ausgeprägte Fluoreszenz. Intrazellulär dagegen interkaliert die lipophile Substanz insbesondere in AT-reichen Sequenzabschnitten der DNA oder lagert sich in die Phospholipiddoppelschicht zellulärer Membranen ein. Beide Prozesse sind mit einer erheblichen Zunahme der Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 verbunden [158–160]. Der durch die zelluläre Anreicherung des Farbstoffs verursachte Fluoreszenzanstieg folgt dabei näherungsweise einer Kinetik erster Ordnung [161].

In Zellen, die eine Überexpression der oben genannten ABC-Transporter aufweisen, wird Hoechst 33342 effizient aus der Zelle heraus transportiert, es kann nur eine geringe zelluläre Fluoreszenz detektiert werden. In Anwesenheit geeigneter Hemmstoffe von ABCB1 oder ABCG2 dagegen kann die Substanz ungehindert in die Zelle diffundieren, was zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz führt (vgl. Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Hoechst 33342 Akkumulationsassays.

### Durchführung

Der Hoechst 33342 Akkumulationsassay wurde analog dem Calcein-AM Assay (Kapitel 3.5.2) durchgeführt. Nach der Herstellung der Verdünnungsreihen der Testsubstanzen wurden 10  $\mu\text{l}$  dieser Lösungen in die Vertiefungen einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte mit flachem Boden überführt. Als Standard-Inhibitor diente sowohl bei Untersuchungen an ABCB1 als auch an ABCG2 die Substanz XR9577.

Anschließend wurden die verschiedenen Zelllinien wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben geerntet, gezählt, gewaschen und die Zellsuspension auf die gewünschte Zelldichte eingestellt, bevor jeweils 90  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung in die vorbereitete Mikrotiterplatte pipettiert wurden (27 000 Zellen pro Well). Im Gegensatz zum Calcein-AM Assay wurde hier zusätzlich für jede getestete Substanz eine Reihe mit dem gleichen Volumen KHP anstelle der Zellsuspension beschickt. Diese ermöglichte beispielsweise das Erkennen einer potentiellen Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen sowie weiterer unspezifischer Effekte. Nach einer Präinkubationsphase von 15 bis 30 min wurden 20  $\mu\text{l}$  einer Lösung von Hoechst 33342 in KHP zugesetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  des Farbstoffes ergab, und die Platten zügig in einen auf 37 °C temperierten Microplaterereader überführt. Die Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ext.}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 460 \text{ nm}$ ) wurde über einen Zeitraum von 120 min kontinuierlich gemessen.

Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden in das Programm Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 kopiert und von den Messwerten jener Proben, die Zellen enthielten, die jeweils zugehörigen KHP-

Werte ohne Zellen subtrahiert. Die korrigierten Messwerte wurden dann gegen die Zeit aufgetragen und aus der erhaltenen Aufnahmekinetik mittels nicht-linearer Regression die intrazelluläre Fluoreszenz im Steady-State ermittelt (GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0). Diese wurde im Anschluss gegen den dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration aufgetragen und eine Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt (vgl. Kapitel 3.6.1).

#### 3.5.4 Bestimmung der ATPase-Aktivität von ABCB1

Der Einfluss potentieller MDR-Modulatoren auf die ATPase-Aktivität von aufgereinigtem ABCB1 kann durch kolorimetrische Quantifizierung des bei der Hydrolyse von Adenosintriphosphat gebildeten anorganischen Phosphates ( $P_i$ ) ermittelt werden. Dabei wird Phosphat zunächst im Säuren mit Ammoniummolybdat zu einer gelb gefärbten Heteropolysäure (Phosphomolybdat) umgesetzt [162, 163]. Diese ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen in der Lage, Komplexe mit verschiedenen basischen Farbstoffen, in diesem Falle Malachitgrün, zu bilden. Der Malachitgrün-Phosphomolybdat Komplex kann anschließend photometrisch detektiert werden. Das überschüssige Malachitgrün besitzt im gewählten sauren pH-Bereich eine hellgelbe Färbung, weshalb es die kolorimetrische Bestimmung bei 610 nm nicht stört [164].

#### Durchführung

Zur Herstellung von aufgereinigtem ABCB1 wurde das humane Protein in *S. cerevisiae* exprimiert, aufgereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert. Da das verwendete Protein von Dr. Anna Jacobs isoliert und zur Verfügung gestellt wurde, soll auf die exakte Vorgehensweise zur Gewinnung von ABCB1 an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Diese ist der Literatur zu entnehmen [165, 166].

Sämtliche benötigte Lösungen wurden unter Verwendung von Milli-Q-Wasser entsprechend der Angaben in den Tabellen 3.17 und 3.18 hergestellt. Für die Reaktionspuffer-Stammlösung wurde die benötigte Menge Tris in 90 ml Wasser gelöst, die EGTA-Lösung zugesetzt und der pH-Wert bei 37 °C mit Schwefelsäure (0,6 mol/l) eingestellt. Erst dann wurde Magnesiumsulfat zugesetzt und bei Raumtemperatur auf 100,0 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Malachitgrün-Lösung wurde Polyvinylalkohol unter Erhitzen (80 °C) in Wasser gelöst, nach dem Abkühlen auf 500,0 ml mit Wasser aufgefüllt und schließlich die benötigte Menge Malachitgrün gelöst. Die ATP-Lösung wurde wie in der Dissertation von Dr. Jens Meyer beschrieben hergestellt [126].

Am Versuchstag wurden zu 2,5 ml des zweifach konzentrierten Reaktionspuffers 100 µl Natriumazid-Lösung ( $c_{\text{end}} = 2 \text{ mmol/l}$ ) sowie die benötigte Menge der ATP-Lösung ( $c_{\text{end}} = 0$ –



**Tabelle 3.17:** Lösungen für die Bestimmung der ATPase-Aktivität von ABCB1.

<b>Reaktionspuffer-Stammlösung (2x)</b>		pH 7,4 (37 °C)
0,97 g	Tris	80 mmol/l
0,74 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat	30 mmol/l
0,1 ml	EGTA-Na-Lösung (200 mmol/l)	0,2 mmol/l
ad 100,0 ml	Milli-Q-Wasser	
<b>EGTA-Na-Lösung, 200 mmol/l</b>		pH 8,0 (RT)
38,04 g	EGTA-Na	200 mmol/l
ad 500,0 ml	Milli-Q-Wasser	
<b>Natriumazid-Lösung, 100 mmol/l</b>		
6,5 mg	Natriumazid	100 mmol/l
ad 1,00 ml	Milli-Q-Wasser	
<b>Phosphat-Stammlösung, 1 mmol/l</b>		
1,8 mg	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	1,0 mmol/l
ad 10,0 ml	Milli-Q-Wasser	
<b>EDTA-Na-Lösung, 8 mmol/l</b>		pH 8,0 (RT)
1,2 g	EDTA-Na	8,0 mmol/l
ad 500,0 ml	Milli-Q-Wasser	

10 mmol/l) gegeben und mit Milli-Q-Wasser auf 5 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Weiterhin wurde eine ausreichende Anzahl an Glasröhrchen auf Eis gestellt und mit 1 ml EDTA-Lösung befüllt. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden (0–25 nmol  $P_i$ ) wurde das jeweils benötigte Volumen der Phosphat-Stammlösung in Glasröhrchen vorgelegt, mit kalter EDTA-Lösung zu 1 ml aufgefüllt und schließlich 50  $\mu$ l des Reaktionspuffers zugegeben.

Anschließend wurden 2,5  $\mu$ l einer 100fach konzentrierten Lösung der zu untersuchenden Testsubstanzen in Dimethylsulfoxid in 1,5 ml Eppendorfgläsern vorgelegt, mit dem Reaktionspuffer auf 250  $\mu$ l aufgefüllt und die Ansätze auf 37 °C temperiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Addition von etwa 1  $\mu$ g aufgereinigtem ABCB1 gestartet. Nach 0, 30, 60 und 90 min wurden jeweils 50  $\mu$ l aus den Ansätzen entnommen und in die gekühlten Glasröhrchen mit EDTA-Lösung überführt. Nach dem Ende der Reaktion wurden zu jeder Probe, einschließlich jener für die Kalibriergerade, 200  $\mu$ l Ammoniummolybdat-Lösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min (Wasserbad, RT) wurden 200  $\mu$ l Malachitgrün-Lösung zugesetzt und für weitere 20 min inkubiert. Schließlich wurden 200  $\mu$ l Schwefelsäure (4 mol/l) zugegeben und die Absorption bei 610 nm vermessen.

**Tabelle 3.18:** Detektionsreagenzien für die Bestimmung der ATPase-Aktivität von ABCB1.

<b>Ammoniummolybdat-Lösung</b>		
8,75 g	Ammoniummolybdat Tetrahydrat	1,75 % (m/V)
87,5 ml	Schwefelsäure (konz.)	12,6 mol/l
ad 500,0 ml	Milli-Q-Wasser	
<b>Malachitgrün-Lösung</b>		
175 mg	Malachitgrün Hydrochlorid	0,04 % (m/V)
1,75 g	Polyvinylalkohol	0,35 % (m/V)
ad 500,0 ml	Milli-Q-Wasser	
<b>Schwefelsäure, 4 mol/l</b>		
111 ml	Schwefelsäure (konz.)	4,0 mol/l
ad 500,0 ml	Milli-Q-Wasser	

Die ermittelten Absorptionswerte wurden gegen die zugehörigen Inkubationszeiten aufgetragen, wobei die mittels linearer Regression bestimmte Steigung der resultierenden Geraden der Reaktionsrate entsprach ( $m_r$ ). Aus dieser konnte unter Berücksichtigung der Steigung der Kalibriergeraden ( $m_{cal}$ ) sowie der Konzentration ( $c_{ABCB1}$ ) und des Volumens ( $V_{ABCB1}$ ) der eingesetzten Proteinlösung die spezifische ATPase-Aktivität des ABCB1 ermittelt werden (Gleichung 3.3).

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{m_r}{m_{cal}} \cdot \frac{5}{V_{ABCB1} \cdot c_{ABCB1}} \quad [\mu\text{mol P}_i/\text{mg}/\text{min}] \quad (3.3)$$

Die so ermittelten Aktivitätswerte konnten für die Erstellung von Konzentrations-Effekt-Kurven oder für kinetische Betrachtungen (vgl. Kapitel 3.6.1 und 3.6.4) herangezogen werden.

## 3.6 Statistische und mathematische Methoden

### 3.6.1 Analyse von Konzentrations-Effekt-Kurven

Zur Erstellung von Konzentrations-Effekt-Kurven wurde eine Regression unter Verwendung der 4-Parameter-logistischen Gleichung durchgeführt (Gleichung 3.4). Diese beschreibt eine sigmoide Kurve, mit der sich der konzentrationsabhängige Effekt eines Modulators an seiner Zielstruktur darstellen lässt [167].

$$y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log c) \cdot n_H}} \quad (3.4)$$

Hierbei stellt der Parameter „Bottom“ den in Abwesenheit eines Modulators ermittelten Messwert dar. Der Topwert bezeichnet den durch die Testsubstanz verursachten maximalen Effekt. Der Hillkoeffizient ( $n_H$ ) gibt die Steigung im Wendepunkt der sigmoiden Kurve an. Dieser erlaubt weiterhin gewisse Rückschlüsse hinsichtlich möglicher kooperativer Effekte am Zielprotein. Der  $EC_{50}$ -Wert stellt jene Konzentration der Testsubstanz dar, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird. Dieser wird im Wendepunkt der Kurve ermittelt und erlaubt den Vergleich unterschiedlicher Modulatoren. Im Falle einer inhibitorisch wirksamen Verbindung wird die halbmaximale Hemmkonzentration auch als  $IC_{50}$ -Wert bezeichnet. Bei Untersuchungen zur Zytotoxizität kann alternativ der sogenannte  $GI_{50}$ -Wert angegeben werden, der die Konzentration des Zytostatikums angibt, die zu einer halbmaximalen Wachstumshemmung ( $GI = \text{Growth Inhibition}$ ) führt.

Die Erstellung der Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte unter Verwendung des Programms GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0. Hierbei konnte die Regression alternativ unter Verwendung der vereinfachten 3-Parameter-logistischen Gleichung, in der der Hillkoeffizient als 1 angenommen wird, erfolgen, wenn deren Eignung zuvor mittels F-Test (Gleichung 3.5) gezeigt werden konnte [167].

$$F = \frac{(ss_{\text{null}} - ss_{\text{alternativ}})/ss_{\text{alternativ}}}{(df_{\text{null}} - df_{\text{alternativ}})/df_{\text{alternativ}}} \quad (3.5)$$

Hierbei stellt „ $ss$ “ die Summe der Abweichungsquadrate und „ $df$ “ die Anzahl der Freiheitsgrade für die Nullhypothese (Eignung des einfacheren Modells) und die Alternativhypothese (Zutreffen des komplexeren Modells) dar. Der F-Test wurde hier mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt.

### 3.6.2 Resistenzfaktor und Sensitivierungsfaktor

Die relative Unempfindlichkeit einer resistenten Zelllinie gegenüber einer zytotoxischen Substanz kann mit Hilfe des Resistenzfaktors ( $F_R$ ) quantifiziert werden. Dieser ist definiert als der Quotient der  $GI_{50}$ -Werte der Verbindung in der resistenten und der zugehörigen sensitiven Zelllinie.

$$F_R = \frac{GI_{50}(\text{res.})}{GI_{50}(\text{sens.})} \quad (3.6)$$

In Analogie zu [168] wurden die  $pGI_{50}$ -Werte der untersuchten Substanzen mittels des in Kapitel 3.5.1 beschriebenen MTT-Assays ( $n=3$ ) ermittelt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der einzelnen Werte bestimmt. Der Resistenzfaktor wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$F_R = 10^{(\overline{pGI_{50}(\text{sens.})} - \overline{pGI_{50}(\text{res.})})} \quad (3.7)$$

Anschließend wurde unter Berücksichtigung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes der Gesamtfehler des Resistenzfaktors ermittelt:

$$\text{Gesamtfehler} = \sqrt{(s_{pGI_{50}(\text{res.})})^2 + (s_{pGI_{50}(\text{sens.})})^2} \quad (3.8)$$

Die Standardabweichung des Resistenzfaktors berechnet sich dann wie folgt:

$$s = \ln 10 \cdot F_R \cdot \text{Gesamtfehler} \quad (3.9)$$

Der Einfluss eines Modulators auf die ABC-Transporter vermittelte Resistenz gegenüber einer zytotoxischen Substanz kann mit Hilfe des Sensitivierungsfaktors (Dose-modifying factor, DMF) quantifiziert werden. Dieser ist definiert als der Quotient der  $GI_{50}$ -Werte des Zytostatikums in An- und Abwesenheit des Modulators. Werte  $>1$  deuten dabei auf eine Inhibition, Werte  $<1$  auf eine Aktivierung des Transports hin.

$$DMF = \frac{GI_{50}}{GI_{50}(\text{Modulator})} \quad (3.10)$$

Die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung des Sensitivierungsfaktors erfolgte in Analogie zum Resistenzfaktor (Gleichungen 3.7-3.9)

### 3.6.3 Berechnung der Pumpgeschwindigkeit von ABC-Transportern

Die Transportaktivität eines ABC-Transporters kann gemäß [168] rechnerisch aus den in den entsprechenden Akkumulationsassays erhaltenen Fluoreszenzwerten ermittelt werden. Die Basis dieser Betrachtung stellt die Tatsache dar, dass im Steady-State ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom ( $v_{\text{in}}$  und  $v_{\text{out}}$ ) des Substrates ( $S$ ) herrscht:

$$v_{\text{in}} = v_{\text{out}} \quad (3.11)$$

Dabei gelangt das Substrat ausschließlich durch passive Diffusion in die Zelle, während der Ausstrom sowohl durch Diffusion als auch durch den ABC-Transporter vermittelten aktiven Efflux möglich ist ( $c_{\text{out}}$  und  $c_{\text{in}}$ , extra- und intrazelluläre Substratkonzentration):

$$c_{\text{out}} \cdot k_{\text{diff}} = c_{\text{in}} \cdot (k_{\text{diff}} + k_{\text{ABC}}) \quad (3.12)$$

Für die intrazelluläre Substratkonzentration ergibt sich damit:

$$c_{\text{in}} = \frac{k_{\text{diff}} \cdot c_{\text{out}}}{k_{\text{diff}} + k_{\text{ABC}}} \quad (3.13)$$

Der Topwert einer Konzentrations-Effekt-Kurve repräsentiert jenen Zustand, in dem der entsprechende Transporter vollständig gehemmt ist. Es ergibt sich somit mit  $k_{\text{ABC}} = 0$  der folgende Zusammenhang:

$$c_{\text{in}} = c_{\text{out}} = \textit{Top} \quad (3.14)$$

Im Gegensatz dazu besitzt der Transporter an jedem anderen Punkt der Konzentrations-Effekt-Kurve eine definierte Aktivität, sodass  $k_{\text{ABC}}$  in die entsprechende Berechnung einbezogen wird. „Fluo“ bezeichnet dabei die jeweils gemessene intrazelluläre Fluoreszenz:

$$c_{\text{in}} = \frac{k_{\text{diff}} \cdot c_{\text{out}}}{k_{\text{diff}} + k_{\text{ABC}}} = \textit{Fluo} \quad (3.15)$$

Werden Top- und Fluoreszenzwert zueinander ins Verhältnis gesetzt ergibt sich nach Umformung:

$$\frac{\textit{Top}}{\textit{Fluo}} - 1 = \frac{k_{\text{ABC}}}{k_{\text{diff}}} = k'_{\text{ABC}} \quad (3.16)$$

Somit lässt sich mittels Gleichung 3.16 das Verhältnis des aktiven Transporter vermittelten Efflux zur passiven Diffusion als Maß für die relative Pumpaktivität des Proteins für jeden Punkt einer Konzentrations-Effekt-Kurve berechnen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten enzymkinetischen Betrachtungen müssen die in den unterschiedlichen Akkumulationsassays erhaltenen Fluoreszenzwerte des Weite-ren so transformiert werden, dass sie proportional zur Transportgeschwindigkeit sind. Dies geschah durch Einsetzen in Gleichung 3.17, wobei  $c_{\text{out}}$  der jeweils eingesetzten Substratkonzentration entspricht.

$$v = c_{\text{out}} - c_{\text{in}} = c(\text{Substrat}) - c_{\text{in}} \quad (3.17)$$

Die intrazelluläre Substratkonzentration berechnet sich dabei gemäß der folgenden Gleichung:

$$c_{\text{in}} = c(\text{Substrat}) \cdot \frac{\text{Fluo}}{\text{Top}} \quad (3.18)$$

### 3.6.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Hydrolyse von ATP an den NBDs der ABC-Transporter stellt eine enzymatische Reaktion dar, die einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Aber auch der Transport von Substraten durch ABC-Proteine kann durch die Gesetzmäßigkeiten der Enzymkinetik beschrieben werden [169].

Die Kinetik einer enzymatischen Reaktion wird durch die Michaelis-Menten Gleichung charakterisiert [170]:

$$\frac{v}{v_{\text{max}}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3.19)$$

Diese beschreibt eine hyperbole Kurve, die sich mit steigender Substratkonzentration ( $[S]$ ) einer maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) annähert. Die Michaelis-Konstante  $K_m$  entspricht dabei jener Substratkonzentration, welche eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt und stellt damit ein Maß für die Affinität des Substrates gegenüber dem Enzym dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten  $K_m$ - und  $v_{\text{max}}$ -Werte für Mg-ATP wurden durch Regression unter Verwendung von Gleichung 3.19 mit Hilfe des Programms GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 erhalten.

### 3.6.4.1 Charakterisierung von Inhibitoren

Substanzen, die in der Lage sind, eine bestimmte enzymatische Reaktion zu hemmen, können je nach Art ihrer Interaktion mit dem Protein in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden.

#### Kompetitive Hemmung

Ein kompetitiver Inhibitor bindet an das freie Enzym unter Bildung eines katalytisch inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplexes und verhindert so die Bindung und Umsetzung des eigentlichen Substrates. Unter Einbeziehung der Affinität des Inhibitors ( $K_i$ ) ergibt sich die folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3.20)$$

Die relative Umsetzungsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors lässt sich demnach unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.19 und 3.20 nach Gleichung 3.21 berechnen. Die Parameter  $v_i$  und  $v_0$  stellen hierbei die Reaktionsgeschwindigkeit in An- und Abwesenheit des Hemmstoffs dar.

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3.21)$$

Ein wesentliches Charakteristikum des kompetitiven Interaktionstyps stellt die Tatsache dar, dass der Inhibitor durch eine unendlich hohe Konzentration des Substrates verdrängt werden kann, und dieser somit keinen Einfluss auf die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  besitzt. Dagegen kommt es in Anwesenheit des Inhibitors zu einem Anstieg des apparenten  $K_m$ -Wertes [170].

#### Nicht-kompetitive Hemmung

Die nicht-kompetitive Enzymhemmung ist durch das Vorliegen unterschiedlicher Bindungsstellen von Substrat und Inhibitor an der Zielstruktur gekennzeichnet. Hierbei kann der Hemmstoff sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden. Auch das Substrat kann zusätzlich an den Enzym-Inhibitor-Komplex binden, weshalb hier ein Verdrängung des Inhibitors nicht möglich ist. In allen Fällen wird hier ein katalytisch inaktiver Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex erhalten.

Der nicht-kompetitive Interaktionstyp wird durch die folgende Geschwindigkeitsgleichung beschrieben:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (3.22)$$

Aus dieser und Gleichung 3.19 lässt sich auch hier die relative Umsetzungsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors berechnen:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{(K_m + [S]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{K_i}{K_i + [I]} \quad (3.23)$$

Aus Gleichung 3.23 geht hervor, dass in diesem Fall die Hemmung unabhängig von der eingesetzten Substratkonzentration ist. Typischerweise kommt es in Anwesenheit eines nicht-kompetitiven Inhibitors zu einer Abnahme der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ), da immer ein inaktiver Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex vorliegt. Im Gegensatz dazu bleibt die apparente Affinität des Substrates gegenüber dem Protein ( $K_m$ ) konstant [170].

### Unkompetitive Hemmung

Im Falle der selteneren unkompetitiven Hemmung kann der Inhibitor lediglich an den Enzym-Substrat-Komplex, nicht jedoch an das freie Enzym binden, sodass auch hier keine Verdrängung des Hemmstoffs durch das Substrat erfolgen kann.

Die folgende Geschwindigkeitsgleichung beschreibt die unkompetitive Inhibition:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (3.24)$$

In Analogie zu den zuvor beschriebenen Fällen ergibt sich damit Gleichung 3.25 zur Berechnung der relativen Geschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors aus den Gleichungen 3.24 und 3.19.

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (3.25)$$

Auch hier wird eine Abnahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) beobachtet. Im Gegensatz zur nicht-kompetitiven Inhibition führt ein unkompetitiver Hemmstoff jedoch



zusätzlich zu einer Abnahme des apparenten  $K_m$ -Wertes, da in seiner Anwesenheit Enzym-Substrat-Komplex aus dem Gleichgewicht entzogen wird und das Substrat scheinbar stärker an das verbliebene Enzym binden kann [170].

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich grundsätzlich auch Aktivatoren durch enzymkinetische Modelle beschreiben lassen. Darauf wird in Kapitel 7.3 ausführlich eingegangen.

### 3.6.4.2 Linearisierungsverfahren

Wie bereits erwähnt, ergibt die grafische Darstellung der Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 3.19) bei Auftragung der Umsetzungsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration eine hyperbole Kurve, die sich  $v_{\max}$  annähert. Für die Ermittlung der kinetischen Parameter einer enzymatischen Reaktion ist diese Darstellung jedoch wenig praktikabel: Einerseits unterliegt die Anpassung der Kurve an die Messwerte bei einer realen Fehlerstreuung einer großen Unsicherheit, andererseits können mögliche Abweichungen vom hyperbolischen Kurvenverlauf, wie sie beispielsweise im Falle kooperativer Effekte auftreten, nur schlecht erkannt werden. Des Weiteren ist für eine zuverlässige Bestimmung von sowohl  $v_{\max}$  als auch  $K_m$  eine sehr große Zahl an Messpunkten notwendig, wobei insbesondere hohe Substratkonzentrationen nahe  $v_{\max}$  aufgrund der begrenzten Löslichkeit vieler Substanzen in der Realität schwer zu erreichen sind [171].

Daher existieren unterschiedliche Linearisierungen der Michaelis-Menten Gleichung aus deren grafischer Auftragung die entsprechenden Parameter zuverlässiger abschätzbar sind. Die bekanntesten Linearisierungen stellen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk sowie das Hanes-Woolf Diagramm dar, welche nachfolgend kurz erläutert werden sollen:

Bei der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk ( $1/v$  gegen  $1/[S]$ , siehe Gleichung 3.26) können die Werte für  $v_{\max}$  und  $K_m$  direkt aus dem Ordinaten- bzw. Abszissenschnittpunkt der Geraden ermittelt werden. Einen entscheidenden Nachteil dieses Verfahrens stellt jedoch die Ungleichverteilung des relativen Fehlers bei realen Daten dar. Bereits kleine absolute Fehler bei niedrigen Substratkonzentrationen besitzen hier einen sehr starken Einfluss auf den Verlauf der resultierenden Geraden während der entsprechende relative Fehler bei hohen Konzentrationen sehr gering ausfällt [171].

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (3.26)$$

Eine gleichmäßige Verteilung des relativen Fehlers tritt hingegen im Falle der Linearisierung nach Hanes-Woolf ( $[S]/v$  gegen  $[S]$ , Gleichung 3.27) auf. Diesem Vorteil steht jedoch die

Tatsache gegenüber, dass die Variablen hier nicht eindeutig trennbar sind, da die Substratkonzentration in die auf beiden Achsen aufgetragenen Werte eingeht. Die reziproke Steigung der Geraden entspricht hier  $v_{\max}$  während  $K_m$  aus dem Betrag des Abszissenschnittpunktes ermittelt werden kann [171].

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S] + \frac{K_m}{v_{\max}} \quad (3.27)$$

Diese Verfahren erlauben außerdem die einfache grafische Analyse von Inhibitionsdaten, da anhand des unter Verwendung verschiedener Inhibitorkonzentrationen erhaltenen Geradenmusters die klassischen Hemmtypen in der Regel gut unterschieden werden können (siehe Abbildung 3.10): Bei einer kompetitiven Hemmung liegt der Schnittpunkt der für verschiedene Inhibitorkonzentrationen ermittelten Geraden im Lineweaver-Burk Diagramm auf der Ordinate, während bei einer nicht-kompetitiven Inhibition ein gemeinsamer Schnittpunkt links davon erhalten wird. Der unkompetitive Hemmtyp zeichnet sich in dieser Darstellung durch die Parallelität der Geraden aus. In der Darstellung nach Hanes-Woolf hingegen wird für diese Art der Inhibition ein Geradenschnittpunkt auf der Ordinate erhalten. Nicht-kompetitive Inhibitoren führen hier zu einem Schnittpunkt im zweiten Quadranten, während bei einer kompetitiven Hemmung parallel verlaufende Geraden erhalten werden [170].

### 3.6.4.3 Direkt-lineare Darstellung

Eine weitere Möglichkeit zur einfachen grafischen Bestimmung enzymkinetischer Parameter stellt die 1974 von Eisenthal und Cornish-Bowden vorgeschlagene direkt-lineare Auftragung dar, die im Folgenden vorgestellt und hinsichtlich ihrer Eignung für die enzymkinetische Betrachtung von ABC-Transportern bewertet werden soll.

Für diese Darstellung wird die klassische Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 3.19) so umgeformt, dass sie formal einer Geradengleichung mit den hypothetischen Variablen  $v_{\max}$  und  $K_m$  entspricht [172]:

$$v_{\max} = \frac{v}{[S]} \cdot K_m + v \quad (3.28)$$

Für die grafische Analyse wird auf der Abszisse die Substratkonzentration mit negativem Vorzeichen  $-[S]$  sowie auf der Ordinate die zugehörige Geschwindigkeit  $v$  aufgetragen und eine Gerade durch die entsprechenden Punkte gelegt. Für mehrere unterschiedliche Substratkonzentrationen wird so eine charakteristische Geradenschar mit einem einzigen Schnittpunkt

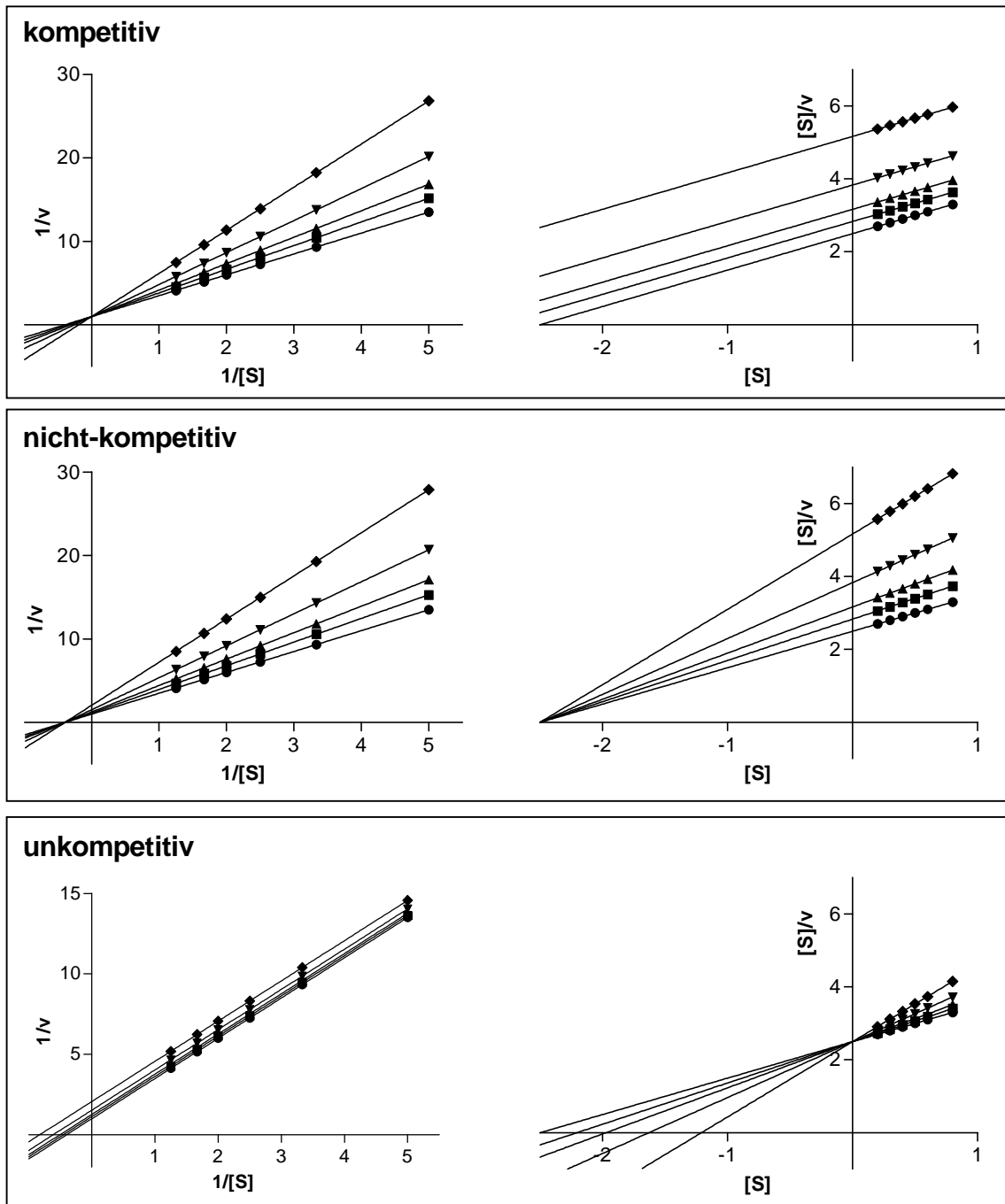
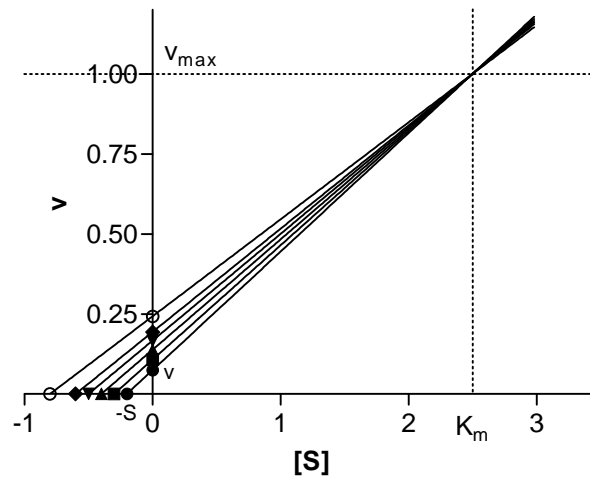


Abbildung 3.10: Charakteristische Geradenmuster für die kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibition in den Auftragungen nach Lineweaver-Burk (links) und Hanes-Woolf (rechts).



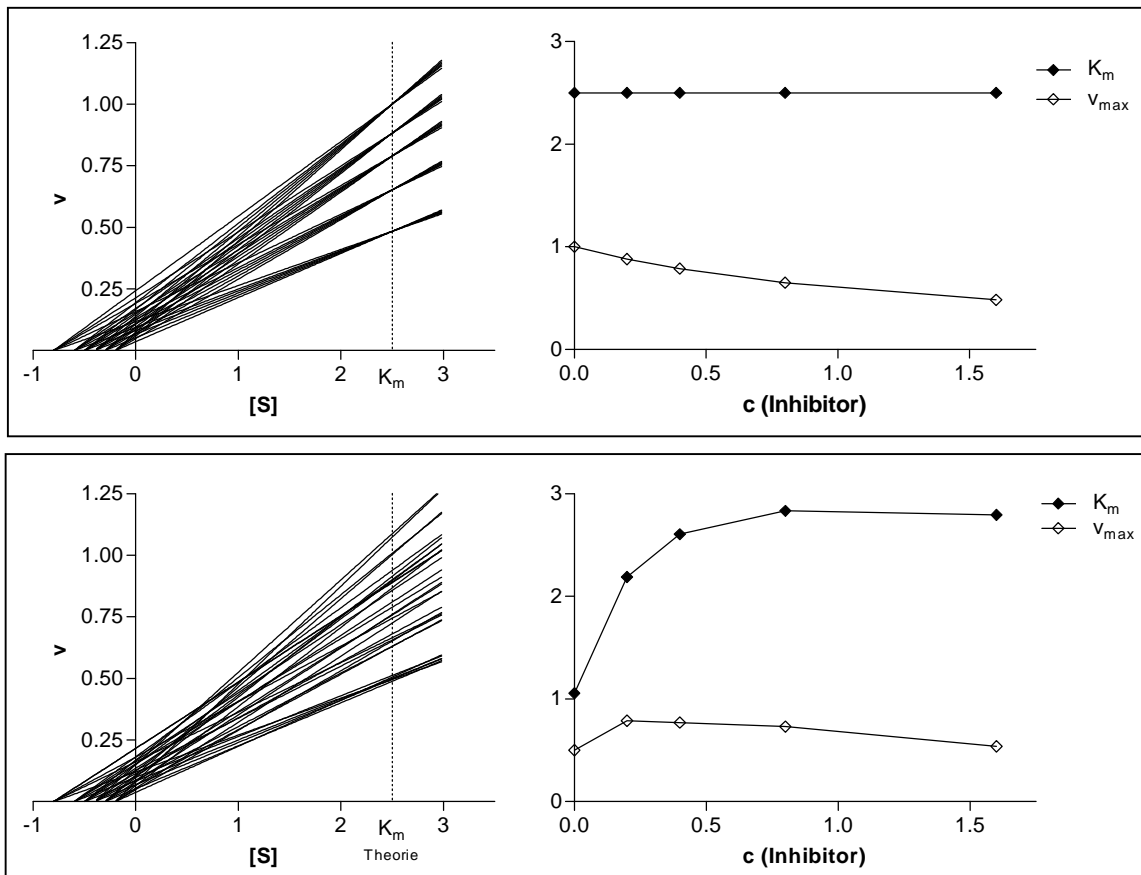
**Abbildung 3.11:** Exemplarische direkt-lineare Darstellung enzymkinetischer Daten.

erhalten, aus dessen Koordinaten die Parameter  $v_{\max}$  und  $K_m$  direkt abgelesen werden können (siehe Abbildung 3.11). Da im Falle realer Daten aufgrund der Fehlerstreuung jedoch nicht exakt ein Schnittpunkt zu erwarten ist, werden die kinetischen Parameter in diesen Fällen aus dem Median aller berechneten Einzelschnittpunkte ermittelt [172].

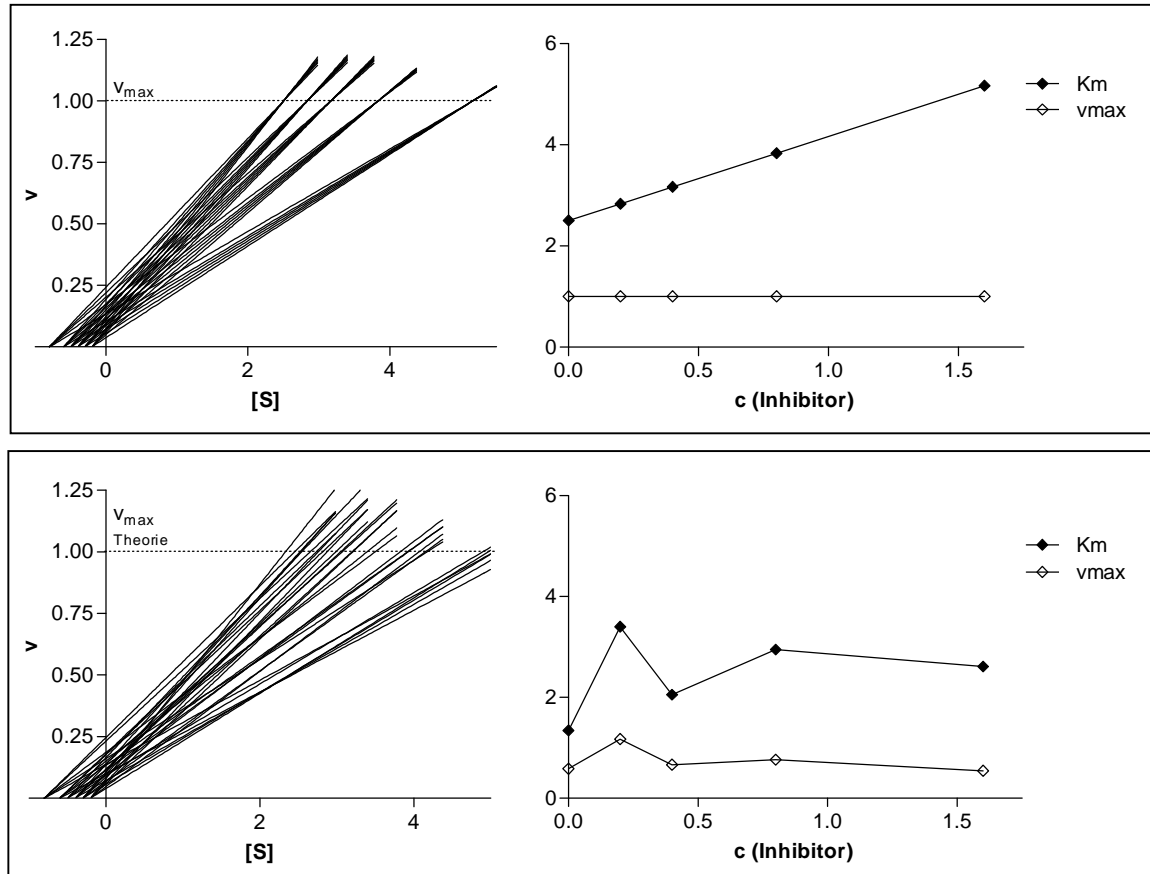
Der Vorteil dieser Methode liegt in der sehr einfachen Durchführbarkeit, da die experimentell ermittelten Werte ohne weitere Umrechnungen direkt aufgetragen werden können. Im Gegensatz zur klassischen hyperbolen Darstellung der Michaelis-Menten Gleichung sind hier des Weiteren zur zuverlässigen Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_m$  keine Messpunkte bei sehr hohen – schlecht löslichen oder das Enzym schädigenden – Substratkonzentrationen erforderlich.

Zusätzlich können mit der direkt-linearen Darstellung einige der Schwachpunkte der in Abschnitt 3.6.4.2 beschriebenen Linearisierungsverfahren – insbesondere der doppelt reziproken Darstellung – umgangen werden. So sollen bei dieser Methode unter anderem auch einzelne Ausreißer deutlicher erkennbar sein [173].

In Anwesenheit eines Inhibitors können charakteristische Verschiebungen des Geradenschnittpunktes beobachtet werden. So äußert sich beispielsweise die durch einen nicht-kompetitiven Hemmstoff verursachte konzentrationsabhängige Reduktion von  $v_{\max}$  bei konstanter  $K_m$  in einer vertikalen Verlagerung des Geradenschnittpunktes (siehe Abbildung 3.12, oben links). Die aus den Schnittpunkten bei verschiedenen hypothetischen Inhibitorkonzentrationen ermittelten Werte für  $v_{\max}$  und  $K_m$  sind ebenfalls in Abbildung 3.12 (oben rechts) dargestellt. Auch hier ist eine Abnahme der Maximalgeschwindigkeit bei konstanter Affinität erkennbar. Für einen kompetitiven Inhibitor würde sich entsprechend eine horizontale Verschiebung des Geradenschnittpunktes ergeben, welche die reduzierte apparente  $K_m$  bei unveränderter  $v_{\max}$  repräsentiert (siehe Abbildung 3.13, oben links).



**Abbildung 3.12:** Exemplarisches direkt-lineares Diagramm des nicht-kompetitiven Inhibitionstyps (links) sowie der aus den Schnittpunkten berechneten Werte für  $v_{max}$  und  $K_m$  in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen (rechts). Dargestellt ist der theoretische Verlauf (oben) sowie die gleichen Werte unter Berücksichtigung eines zufälligen Fehlers von 5% (unten).



**Abbildung 3.13:** Exemplarisches direkt-lineares Diagramm des kompetitiven Inhibitionstyps (links) sowie der aus den Schnittpunkten berechneten Werte für  $v_{max}$  und  $K_m$  in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen (rechts). Dargestellt ist der theoretische Verlauf (oben) sowie die gleichen Werte unter Berücksichtigung eines zufälligen Fehlers von 5% (unten).

Um die Eignung der direkt-linearen Darstellung für die enzymkinetische Untersuchung von ABC-Transportern zu beurteilen, wurden die in Abbildung 3.12 (oben) dargestellten theoretischen Geschwindigkeitswerte zusätzlich unter Berücksichtigung eines zufällig generierten relativen Fehlers von mindestens 5 % berechnet und nach der direkt-linearen Methode ausgewertet. Die entsprechenden Darstellungen sind ebenfalls in Abbildung 3.12 (unten) erkennbar.

Es wird deutlich, dass sich unter Verwendung dieser fehlerbehafteten Geschwindigkeitswerte innerhalb der für eine definierte Inhibitorkonzentration erhaltenen Geradenscharen mehrere zum Teil deutlich voneinander verschiedene Schnittpunkte ergeben (Abbildung 3.12, unten links). Anhand dieser Darstellung ist ebenfalls nicht eindeutig erkennbar, welche der Geraden Ausreißer darstellen und somit von der Auswertung ausgeschlossen werden sollten. In Analogie zu der in der Literatur vorgeschlagenen Vorgehensweise [172] wurden daher sämtliche Einzelschnittpunkte berechnet und unter Ausschluss jener, die nicht innerhalb des ersten Quadranten lagen, deren Median ermittelt. Die so für  $v_{\max}$  und  $K_m$  erhaltenen Werte sind in Abbildung 3.12 unten rechts dargestellt. In diesem Diagramm ist jedoch weder die zu erwartende Abnahme von  $v_{\max}$  noch die konstant bleibende  $K_m$  erkennbar, welche zur Identifikation des nicht-kompetitiven Interaktionstyps dienen würde. Im Falle eines kompetitiven Inhibitors (siehe Abbildung 3.13, unten) werden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Somit scheint die direkt-lineare Darstellung für die Analyse stark fehlerbehafteter Daten, wie sie in funktionellen zellbasierten Testsystemen erhalten werden, weniger geeignet zu sein. Bereits bei einem relativen Fehler von nur 5 % ist der Interaktionstyp des Inhibitors mit dem Zielprotein nicht eindeutig zu ermitteln, wobei bei den in realen Experimenten erhaltenen Daten von noch größeren Schwankungen ausgegangen werden muss. Das klassische Verfahren nach Lineweaver-Burk liefert trotz seiner Schwächen im Gegensatz dazu unter diesen Bedingungen weiterhin relativ eindeutig auswertbare Diagramme (ohne Abbildung). Aus diesem Grund wurden die innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführten enzymkinetischen Experimente hauptsächlich nach der Methode von Lineweaver-Burk ausgewertet.





# 4 Charakterisierung von Zelllinien und Etablierung funktioneller Methoden zur Untersuchung von ABC-Transportern

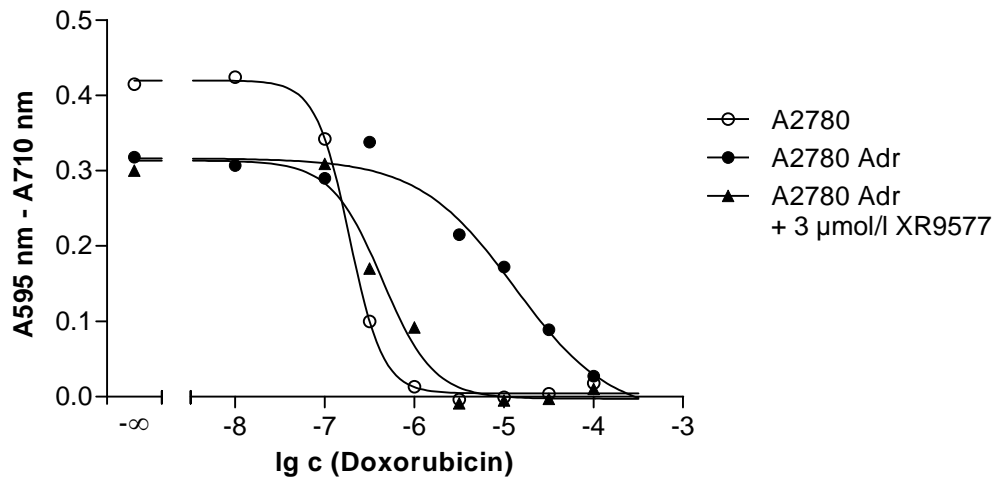
## 4.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

### 4.1.1 Resistenzspektrum der eingesetzten Zellen

Zunächst sollten die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihres Resistenzspektrums charakterisiert, und somit ihre Eignung für die funktionelle Untersuchung der jeweiligen Transporter belegt werden. Zu diesem Zweck wurde die Sensitivität der einzelnen Zelllinien gegenüber einer Reihe toxischer Substanzen, welche typische Substrate verschiedener ABC-Transporter darstellen, mit Hilfe des in Kapitel 3.5.1 beschriebenen MTT-Assays ermittelt. Dabei waren unter den verwendeten Testsubstanzen neben mehreren zytostatisch wirksamen Arzneistoffen auch die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342. Aus den für die resistenten und zugehörigen sensitiven Zelllinien erhaltenen  $pGI_{50}$ -Werten wurde wie in Kapitel 3.6.2 dargestellt der Resistenzfaktor ( $F_R$ ) berechnet. Dieser stellt ein Maß für die relative Unempfindlichkeit einer Zelllinie gegenüber einer definierten zytotoxischen Substanz dar.

#### 4.1.1.1 A2780 Adr und CHO-K1 M403

Für funktionelle Untersuchungen an ABCB1 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich die mit Doxorubicin selektionierte Ovarialkarzinomzelllinie A2780 Adr sowie die zugehörige sensitive Zelllinie A2780 verwendet. In Abbildung 4.1 sind exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven des Zytostatikums Doxorubicin, die mit Hilfe der genannten Zelllinien generiert wurden, dargestellt. Die deutliche Rechtsverschiebung der Kurve von A2780 Adr ( $pGI_{50} = 4,95$ ) im Vergleich zur sensitiven Zelllinie ( $pGI_{50} = 6,73$ ) bringt dabei eine geringere Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum zum Ausdruck. Der Resistenzfaktor beträgt in diesem Beispiel 59,4.

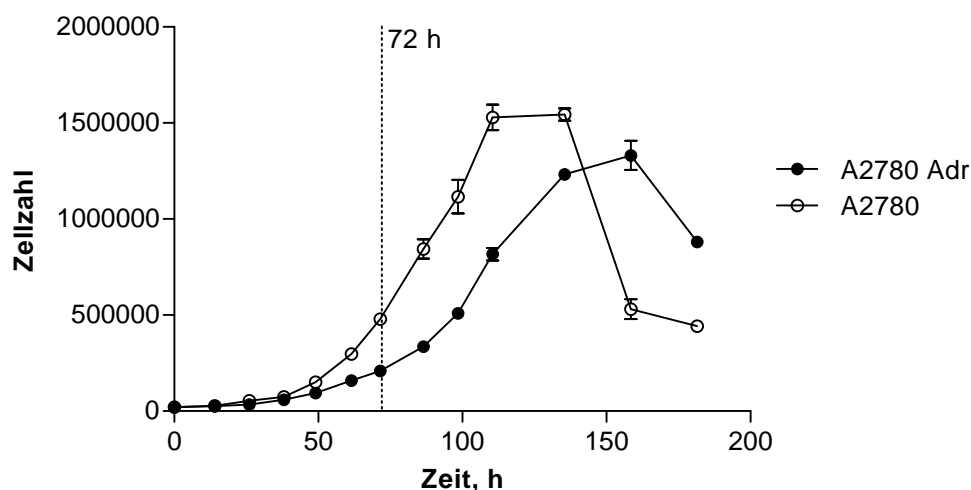


**Abbildung 4.1:** Repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurven von Doxorubicin erhalten im MTT-Assay mit A2780 und A2780 Adr. Der Resistenzfaktor beträgt 59,4;  $pGI_{50}(A2780\text{ Adr}) = 4,95$ ,  $pGI_{50}(A2780) = 6,73$ . Die Resistenz von A2780 Adr gegenüber Doxorubicin wird durch  $3\ \mu\text{mol/l}$  XR9577 fast vollständig aufgehoben ( $pGI_{50} = 6,36$ ).

Die Zugabe des potenten ABCB1-Inhibitors XR9577 führt zur fast vollständigen Aufhebung der Doxorubicin-Resistenz von A2780 Adr, was sich in einer Linksverschiebung der zugehörigen Konzentrations-Effekt-Kurve äußert. Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer ABCB1 vermittelten Resistenz gegenüber Doxorubicin. Im Falle der sensitiven Zelllinie ist dagegen kein Einfluss von XR9577 zu beobachten. Die zugehörige Kurve ist in Abbildung 4.1 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

In diesem Beispiel fällt jedoch auf, dass die gemessenen Absorptionswerte der unbehandelten Kontrolle im Falle von A2780 Adr deutlich unterhalb derer von A2780 liegen. Dies könnte sowohl auf ein langsames Wachstum der resistenten Zellen als auch auf eine schnellere Umsetzung des MTT in der sensitiven Zelllinie zurückzuführen sein. Da sich insbesondere die zweitgenannte Möglichkeit negativ auf die Aussagekraft derartiger Experimente auswirken könnte, sollte dieser Sachverhalt näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Wachstumskinetik der beiden Zelllinien A2780 Adr und A2780 aufgenommen (vgl. Abbildung 4.2). Diese weist einen typischen Verlauf mit einer kurzen lag-Phase, die schnell in die exponentielle Wachstumsphase übergeht, auf. Ist eine bestimmte maximale Zelldichte erreicht beginnen die Zellen nach etwa 110 h abzusterben.

Es zeigt sich, dass die sensitiven Zellen eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen, als die resistente Zelllinie A2780 Adr. Dies spiegelt sich in der aus dem exponentiell verlaufenden Teil der Kinetik berechneten Populationsverdopplungszeit wieder. Diese liegt im Fall von A2780 bei 17,3 h während für die resistente Zelllinie ein etwas höherer Wert von 20,8 h ermittelt wurde.

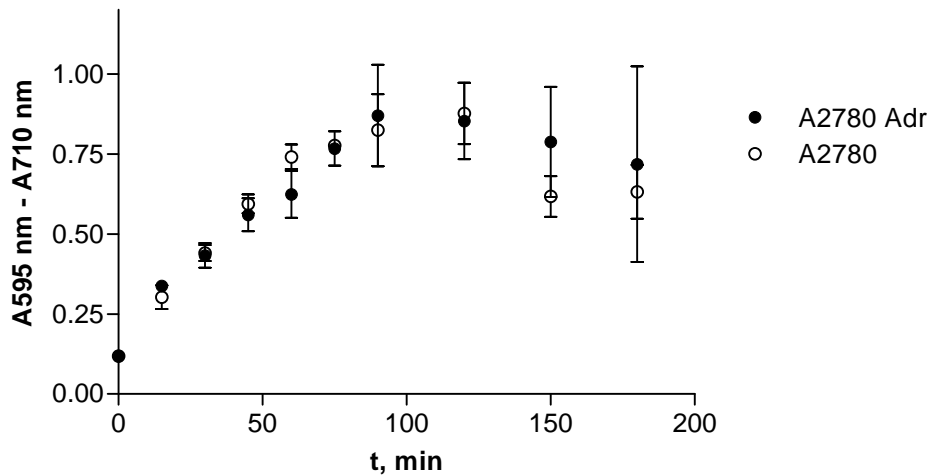


**Abbildung 4.2:** Wachstumskinetik der Zelllinien A2780 und A2780 Adr. Die gestrichelte Linie markiert eine Wachstumsdauer von 72 h. Dies entspricht der Inkubationszeit des MTT-Assays.

Ein ähnliches Verhalten wurde beispielsweise auch von van Hattum *et al.* im Falle zweier durch kontinuierliche Selektion mit dem Camptothecin-Derivat BNP 1350 gewonnener A2780 Tochterzelllinien beobachtet. Die resistenten Zellen, die sich teilweise durch eine Überexpression des ebenfalls MDR-assoziierten ABC-Transporters ABCG2 auszeichneten, zeigten eine etwas geringere Proliferationsgeschwindigkeit, als die parenterale Zelllinie A2780. Die für A2780 in dieser Quelle ermittelte Populationsverdopplungszeit von etwa 11 h liegt dabei in der Größenordnung, des für diese Zelllinie im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Wertes [174].

Aus diesen Beobachtungen kann jedoch nicht unmittelbar auf einen alleinigen Einfluss der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen auf die erhaltenen Absorptionswerte geschlossen werden. Daher wurde nachfolgend überprüft, ob die Zelllinien A2780 und A2780 Adr sich zusätzlich durch eine unterschiedlich schnelle Umsetzung des MTT auszeichnen. Hierzu wurden jeweils 100 000 Zellen beider Zelllinien in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte ausgesät. Nachdem diese sich angeheftet hatten (ca. 6 h), wurde die MTT-Lösung zugegeben, die Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit DMSO lysiert und die Absorption wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben gemessen.

In Abbildung 4.3 sind die ermittelten Absorptionswerte gegen die zugehörige Inkubationszeit aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass diese in beiden Zelllinien bis zu einer Inkubationszeit von 90 min praktisch identisch ansteigen. Bei längeren Inkubationszeiten unterliegen die Werte extremen Schwankungen und beginnen wieder zu fallen. Dies ist vermutlich auf die Bildung zellschädigender größerer Formazan-Kristalle zurückzuführen, da in diesen Proben bereits beim Entfernen des Überstandes vor der Lyse mit DMSO ein deutliches Ablösen der



**Abbildung 4.3:** Umsetzung von MTT zum korrespondierenden Formazan in A2780 und A2780 Adr Zellen (100 000 pro Well). Aufgetragen ist die Absorption (Mittelwert  $\pm$  SD von Triplikaten) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit MTT.

Zellen von der Mikrotiterplatte beobachtet werden kann.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung des MTT zum Formazan in beiden Zelllinien gleich schnell abläuft. Die nach 72 h im MTT-Assay beobachtete Differenz der Absorptionswerte der Wachstumskontrollen ist ausschließlich auf ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der beiden Zelllinien zurückzuführen. Da in der Literatur eine Abhängigkeit der intrazellulären Zytostatika-Konzentration - und somit auch der Zytotoxizität - von der initial ausgesäten Zellzahl beschrieben wird, wurde auf eine entsprechende Anpassung verzichtet und die gleiche Menge der unterschiedlichen Zelllinien verwendet [175, 176].

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sind die im MTT-Assay erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven jedoch in der Regel in normalisierter Form dargestellt. Dabei wurde die Absorption in der unbehandelten Kontrolle als 100 %, die in der Absterbekontrolle (10 % DMSO, V/V) als 0 % Zellvitalität angenommen.

In Tabelle 4.1 sind die an den Zelllinien A2780 und A2780 Adr ermittelten  $pGI_{50}$ -Werte und die daraus berechneten Resistenzfaktoren verschiedener zytotoxisch wirksamer Substanzen aufgeführt. Mit Ausnahme von Mitoxantron und Methotrexat unterscheiden sich die  $pGI_{50}$ -Werte der Substanzen zwischen den beiden Zelllinien signifikant. Doxorubicin, Vinblastin, Colchicin, Paclitaxel sowie die Farbstoffe Hoechst 33342 und Rhodamin 123 sind bekannte Substrate von ABCB1, wohingegen Methotrexat nicht transportiert wird [28, 36]. Diese Kreuzresistenz gegenüber strukturell und funktional unterschiedlichen Zytostatika stellt ein charakteristisches Merkmal der ABCB1 vermittelten MDR dar [177, 178]. Das Anthrachinon-Derivat Mitoxantron stellt bezüglich dieses Sachverhaltes eine Ausnahme dar, auf die im weiteren Verlauf noch ausführlicher eingegangen werden soll (vgl. Seite 84).

**Tabelle 4.1:** Resistenzfaktoren ( $F_R$ ) der Zelllinie A2780 Adr gegenüber verschiedenen Zytostatika. Die angegebenen  $pGI_{50}$ -Werte wurden mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt ( $n=3$ ).

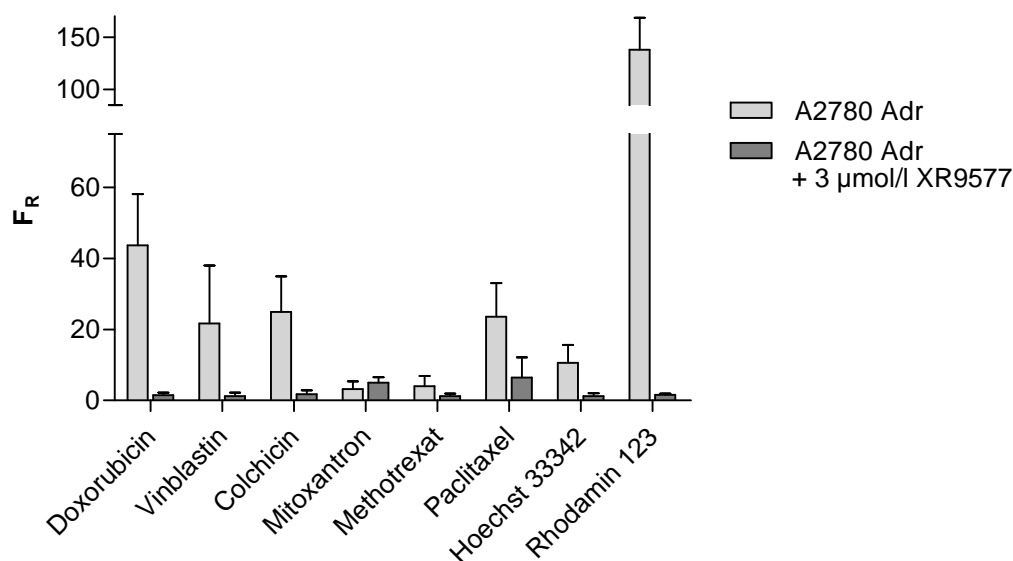
Substanz	$pGI_{50}$ (A2789 Adr) $\pm$ SD	$pGI_{50}$ (A2780) $\pm$ SD	$F_R \pm$ SD
Doxorubicin	5,05 $\pm$ 0,13	6,69 $\pm$ 0,06	43,7 $\pm$ 14,5
Vinblastin	6,04 $\pm$ 0,11	7,38 $\pm$ 0,31	21,7 $\pm$ 16,3
Colchicin	6,48 $\pm$ 0,07	7,88 $\pm$ 0,16	25,0 $\pm$ 9,95
Mitoxantron	6,22 $\pm$ 0,27	6,73 $\pm$ 0,11	3,22 $\pm$ 2,18
Methotrexat	7,38 $\pm$ 0,24	7,98 $\pm$ 0,21	3,98 $\pm$ 2,95
Paclitaxel	6,23 $\pm$ 0,16	7,61 $\pm$ 0,07	23,6 $\pm$ 9,53
Hoechst 33342	4,67 $\pm$ 0,08	5,72 $\pm$ 0,19	10,6 $\pm$ 5,05
Rhodamin 123	3,89 $\pm$ 0,05	5,94 $\pm$ 0,08	137 $\pm$ 30,6

Die größten Resistenzfaktoren wurden für den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 ( $F_R = 137$ ) und das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin ( $F_R = 43,7$ ) ermittelt. Dagegen ist die Resistenz von A2780 Adr gegenüber Hoechst 33342 ( $F_R = 10,6$ ) deutlich schwächer ausgeprägt.

Offenbar können die verschiedenen Substrate durch ABCB1 unterschiedlich effizient aus der Zelle heraustransportiert werden. Aus dieser Beobachtung kann jedoch nicht unmittelbar auf eine unterschiedliche Affinität der Substanzen gegenüber dem Protein geschlossen werden, da neben dieser auch weitere Faktoren eine Rolle für den ABCB1 vermittelten Transport spielen. Da die Bindung von Substraten und Modulatoren an den Transporter vermutlich innerhalb der Zytoplasmamembran stattfindet [45, 48, 50], ist insbesondere die Lipophilie, und damit die Membrangängigkeit der Substanzen ein wichtiger den Transportvorgang beeinflussender Parameter. So wurde von Seelig *et al.* postuliert, dass die Verteilung eines Substrates in die Membran den für dessen Bindung an den Transporter geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [179]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Resistenzfaktor ABCB1 überexprimierender Zellen gegenüber einer Serie von Anthrazyklin-Derivaten primär durch den passiven Einstrom des Substrates in die Zelle bestimmt wird. Der aktive Auswärtstransport durch den ABC-Transporter spielte hier nur eine untergeordnete Rolle [180].

Das Vorliegen einer Kreuzresistenz gegenüber bestimmten toxischen Substanzen deutet auf die Anwesenheit von ABCB1 in den Doxorubicin selektierten Zellen hin. Die Behandlung mit dem Zytostatikum kann jedoch ebenfalls eine Überexpression anderer ABC-Transporter oder auch die Ausbildung weiterer spezifischer und unspezifischer Resistenzmechanismen induzieren [27, 181]. Aus diesem Grund wurde nachfolgend untersucht, ob – ähnlich wie zuvor für Doxorubicin beschrieben – die Sensitivität der resistenten Zelllinie gegenüber den übrigen toxischen Verbindungen durch die Behandlung mit einem Hemmstoff von ABCB1 erhöht werden kann.

Die Resistenz von A2780 Adr gegenüber den zuvor genannten Substanzen wird durch den



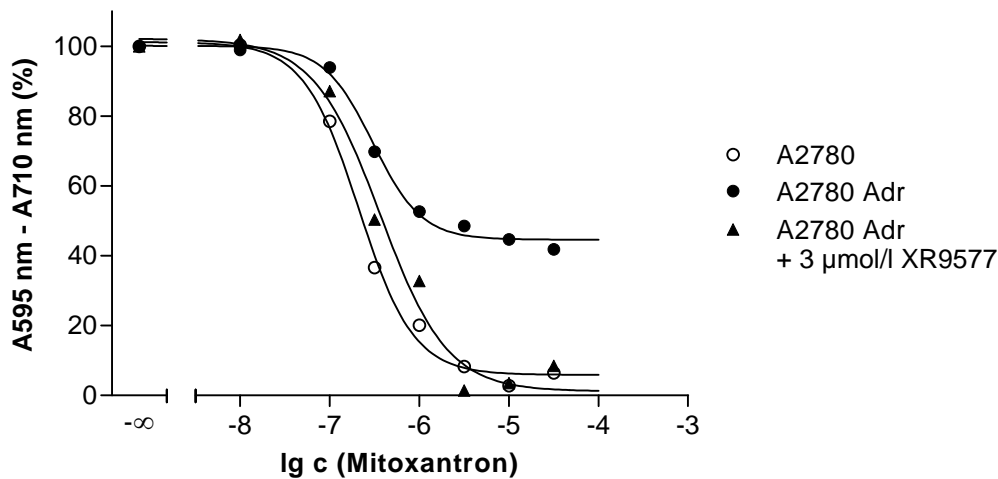
**Abbildung 4.4:** Resistenzfaktoren ( $F_R$ ) der Zelllinie A2780 Adr gegenüber unterschiedlichen Zytostatika in An- und Abwesenheit von 3  $\mu\text{mol/l}$  XR9577. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Zusatz des ABCB1 Inhibitors XR9577 vollständig aufgehoben. Dabei kann kein Einfluss des Modulators auf die Empfindlichkeit der sensitiven Zelllinie beobachtet werden. Die in An- und Abwesenheit einer definierten nicht toxischen Konzentration XR9577 (3  $\mu\text{mol/l}$ ) ermittelten Resistenzfaktoren von A2780 Adr sind in Abbildung 4.4 grafisch dargestellt.

Ein abweichendes Verhalten kann im Falle des Anthrachinonderivates Mitoxantron beobachtet werden. Obwohl die Substanz in der Literatur als Substrat von ABCB1 ausgewiesen ist [28, 36], kann im MTT-Assay kein signifikanter Unterschied zwischen den  $\text{pGI}_{50}$ -Werten von A2780 ( $\text{pGI}_{50} = 6,68$ ) und A2780 Adr ( $\text{pGI}_{50} = 6,52$ ) detektiert werden (vgl. Abbildung 4.5). Es fällt jedoch auf, dass die Zellen der resistenten Zelllinie durch Mitoxantron in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{mol/l}$  nicht vollständig abgetötet werden können, was auf eine gewisse Unempfindlichkeit gegenüber dem Zytostatikum hindeutet. Durch Zugabe von XR9577 (3  $\mu\text{mol/l}$ ) kommt es zwar nicht zu einer signifikanten Veränderung des  $\text{pGI}_{50}$ -Wertes, es kann jedoch ein vollständiges Absterben der A2780 Adr Zellen herbeigeführt werden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Zelllinie A2780 Adr auch gegenüber Mitoxantron eine gewisse ABCB1 vermittelte Resistenz aufweist. Diese ist jedoch nicht so eindeutig ausgeprägt, wie die gegenüber den zuvor beschriebenen Substanzen.

Insgesamt weist die Zelllinie A2780 Adr somit ein für ABCB1 typisches Resistenzspektrum auf, was auf eine Überexpression dieses ABC-Transporters hindeutet.

Neben den beiden zuvor beschriebenen wurde für funktionelle Untersuchungen an ABCB1 zusätzlich die mit dem humanen *ABCB1* Gen transfizierte Zelllinie CHO-K1 M403 verwendet.



**Abbildung 4.5:** Konzentrations-Effekt-Kurven von Mitoxantron erhalten im MTT-Assay mit A2780 und A2780 Adr. Die für A2780 Adr und A2780 ermittelten  $\text{pGI}_{50}$ -Werte weisen keine signifikante Differenz auf;  $\text{pGI}_{50}(\text{A2780 Adr}) = 6,52$ ,  $\text{pGI}_{50}(\text{A2780}) = 6,68$ . Durch Zugabe von 3  $\mu\text{mol/l}$  XR9577 kommt es zum vollständigen Absterben der A2780 Adr Zellen;  $\text{pGI}_{50} = 6,43$ .

Diese sowie die mit dem entsprechenden Leervektor transfizierte Zelllinie CHO-K1 pcDNA wurde von Dr. Jens Meyer hergestellt [126] und sollte nun ebenfalls hinsichtlich ihres MDR-Phänotyps charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde auch die Sensitivität der beiden Zelllinien gegenüber der zuvor beschriebenen Auswahl zytotoxischer Verbindungen mittels MTT-Assay bestimmt. Die so erhaltenen  $\text{pGI}_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Hierbei fällt zunächst auf, dass der Folsäure-Antagonist Methotrexat in dem verwendeten Konzentrationsbereich praktisch keine Toxizität gegenüber beiden Zelllinien aufweist. Hierfür könnte einer der vielen bekannten Resistenzmechanismen für Methotrexat wie z.B. Mutationen der Dihydrofolatreduktase, geringere Aufnahme in die Zelle (Folat-Carrier-Downregulation) oder eine verringerte intrazelluläre Akkumulation (verminderte Polyglutamatbildung) verantwortlich sein [182]. Der exakte Grund für die offensichtlich intrinsische Methotrexat-Resistenz der CHO-K1 Zellen ist jedoch nicht bekannt und nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Des Weiteren kann hier – im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen humanen Zelllinien – für keine der übrigen Testsubstanzen ein signifikanter Unterschied zwischen den  $\text{pGI}_{50}$ -Werten der beiden Zelllinien festgestellt werden. Somit weisen die mit *ABCB1* transfizierten Zellen wider Erwarten keine im Vergleich zu CHO-K1 pcDNA erhöhte Resistenz gegenüber den untersuchten klassischen *ABCB1* Substraten auf. Es fällt jedoch auf, dass beide Zelllinien eine relativ geringe Sensitivität gegenüber den Zytostatika aufweisen. So tolerieren beide CHO-Zelllinien bis zu zehnfach höhere Konzentrationen der Testsubstanzen als beispielsweise die sensitive Ovarialkarzinomzelllinie A2780. Dies deutet – neben dem für Methotrexat – auf einen weiteren intrinsischen Resistenzmechanismus der CHO-K1 Zellen hin. Die Tatsache,

**Tabelle 4.2:** Für die Zelllinien CHO-K1 M403 und CHO-K1 pcDNA gemessene  $pGI_{50}$ -Werte verschiedener Zytostatika. Die Werte wurden mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt (n=3, wenn nicht anders gekennzeichnet).

Substanz		$pGI_{50}(M403) \pm SD$	$pGI_{50}(pcDNA) \pm SD$
Doxorubicin		5,60 $\pm$ 0,09	5,76 $\pm$ 0,08
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	6,69 $\pm$ 0,26	6,78 $\pm$ 0,34
Vinblastin		6,50 $\pm$ 0,10	7,06 $\pm$ 0,21
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	7,10 (n=1)	7,13 (n=1)
Colchicin		6,41 $\pm$ 0,19	6,67 $\pm$ 0,13
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	7,36 $\pm$ 0,08	7,23 $\pm$ 0,06
Mitoxantron		6,40 $\pm$ 0,06	6,40 $\pm$ 0,12
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	6,65 $\pm$ 0,35	6,93 $\pm$ 0,31
Methotrexat		k.E. <sup>a</sup>	k.E. <sup>a</sup>
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	k.E. <sup>a</sup>	k.E. <sup>a</sup>
Paclitaxel		6,08 $\pm$ 0,20	6,47 $\pm$ 0,16
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	7,12 $\pm$ 0,18	7,41 $\pm$ 0,25
Hoechst 33342		5,06 $\pm$ 0,09	5,36 $\pm$ 0,04
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	5,67 $\pm$ 0,06	5,72 $\pm$ 0,20
Rhodamin 123		3,70 (n=1)	4,07 (n=1)
	+ 3 $\mu$ mol/l XR9577	5,60 (n=1)	5,70 (n=1)

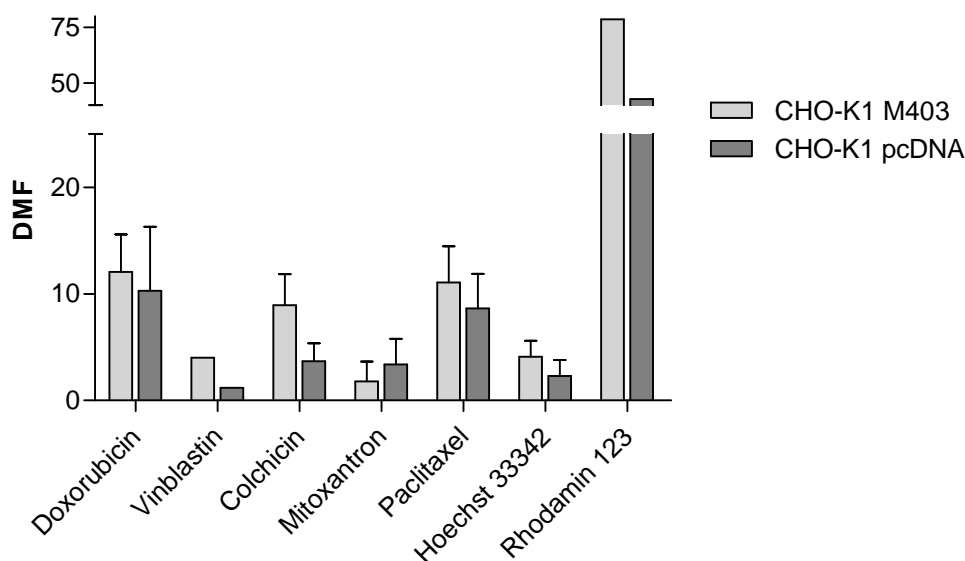
<sup>a</sup> keine Toxizität bis 100  $\mu$ mol/l

dass dieser Effekt bei mehreren verschiedenen Substanzen beobachtet wird, kann auf die physiologische Expression von ABCB1 oder eines verwandten ABC-Transporters hindeuten.

Um diesen Sachverhalt näher zu beleuchten, wurde in Analogie zu A2780 und A2780 Adr die Toxizität der Zytostatika in Anwesenheit des ABCB1-Inhibitors XR9577 (3  $\mu$ mol/l) bestimmt. Die erhaltenen  $pGI_{50}$ -Werte sind ebenfalls in Tabelle 4.2 aufgeführt. Bei Zugabe des Inhibitors kommt es zu einer Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven vieler Substanzen hin zu höheren  $pGI_{50}$ -Werten, die etwa in der Größenordnung der an A2780 ermittelten Werte liegen. Der Einfluss von XR9577 kann in Form des Sensitivierungsfaktors (Dose-modifying factor, DMF) quantifiziert werden. Dieser ist ähnlich dem Resistenzfaktor definiert als der Quotient aus den  $GI_{50}$ -Werten in An- und Abwesenheit des Modulators (vgl. Kapitel 3.6.2), wobei Werte  $> 1$  auf eine Verringerung der Resistenz durch den Inhibitor hindeuten. Die für XR9577 berechneten Werte in den Zelllinien CHO-K1 M403 und CHO-K1 pcDNA sind in Abbildung 4.6 grafisch dargestellt.

Im Falle von Doxorubicin, Vinblastin, Colchicin, Paclitaxel, Hoechst 33342 und Rhodamin 123 können für XR9577 in beiden Zelllinien Sensitivierungsfaktoren  $> 1$  bestimmt wer-





**Abbildung 4.6:** Aus den  $pGI_{50}$ -Werten in Tabelle 4.2 berechnete Sensitivierungsfaktoren (DMF) des ABCB1-Inhibitors XR9577 gegenüber verschiedenen Zytostatika bestimmt an den Zelllinien CHO-K1 M403 und CHO-K1 pcDNA.

den. Demnach wird die relative Unempfindlichkeit der Zellen durch einen Prozess verursacht, der durch XR9577 gehemmt werden kann. Da dies bei all jenen Substanzen der Fall ist, die zuvor mit Hilfe von A2780 Adr als Substrate von ABCB1 identifiziert werden konnten, ist es sehr wahrscheinlich, dass neben CHO-K1 M403 auch die mit dem Leervektor transfizierte Zelllinie CHO-K1 pcDNA eine Expression dieses Transporters aufweist. Weiterhin unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass genau für jene Testsubstanzen, gegenüber denen A2780 Adr Zellen die größte Resistenz aufweisen (Rhodamin 123, Doxorubicin), die größten Sensitivierungsfaktoren ermittelt wurden. Dagegen ist die durch XR9577 verursachte Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Hoechst 33342, welches mit 10,6 bei A2780 Adr den geringsten Resistenzfaktor ergab, am schwächsten ausgeprägt.

Bei Betrachtung der Sensitivierungsfaktoren fällt weiterhin auf, dass die für die mit dem Leervektor transfizierte Zelllinie bestimmten Werte im Falle der oben genannten ABCB1-Substrate immer unterhalb derer für CHO-K1 M403 liegen. Aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte und deren starker Streuung sind diese Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant. Dennoch könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass in der mit dem *ABCB1* Gen transfizierten Zelllinie insgesamt eine höhere ABCB1 Expression vorliegt, als in CHO-K1 pcDNA. Die in CHO-K1 Zellen möglicherweise bereits physiologisch enthaltene Menge an Hamster-ABCB1 scheint jedoch die des durch Transfektion eingebrachten humanen Proteins deutlich zu übertreffen.

Hinweise auf eine Expression von ABCB1 in der Zelllinie CHO-K1 finden sich auch in der

Literatur. Gupta *et al.* konnten nachweisen, dass die CHO-Zelllinie sich durch eine im Vergleich mit mehreren humanen Zelllinien verminderte intrazelluläre Akkumulation und Toxizität des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123 auszeichnet. Für Rhodamin B, welches als Carbonsäure kein Substrat von ABCB1 darstellt, wurden dagegen keine Unterschiede detektiert [183]. Weiterhin konnte für CHO-K1 eine Resistenz gegenüber einer Reihe typischer ABCB1-Substrate festgestellt werden, die durch Zusatz von Verapamil aufgehoben wurde. Der direkte Nachweis des Proteins in dieser Zelllinie gelang jedoch nicht [184].

Insgesamt weisen die Sensitivierungsfaktoren der CHO-Zelllinien einen wesentlich geringeren Wert auf, als die Resistenzfaktoren von A2780 Adr (vgl. Tabellen 4.1 und 4.2). Wird die Überexpression von ABCB1 als alleiniger Resistenzmechanismus einer Zelllinie angesehen, können beide Werte zur Beurteilung des ABCB1 Expressionsstatus direkt miteinander verglichen werden. Diese Grundvoraussetzung ist hier erfüllt, da die Mehrfachresistenz in A2780 Adr durch den Zusatz von XR9577 vollständig aufgehoben werden kann. Die im Vergleich zu A2780 Adr recht geringen Sensitivierungsfaktoren der CHO-Zellen deuten somit darauf hin, dass die Gesamtexpression von ABCB1 in diesen deutlich geringer ist, als in der humanen Zelllinie.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die durch Selektion mit Doxorubicin erhaltene Zelllinie A2780 Adr als auch die mit humaner *ABCB1* cDNA transfizierte Zelllinie CHO-K1 M403 ein für die Überexpression von ABCB1 typisches Resistenzspektrum aufweist. Hierbei ist jedoch davon auszugehen, dass auch in der untransfizierten Zelllinie CHO-K1 bereits eine gewisse Expression einer Nager-Isoform dieses ABC-Transporters vorliegt. Dieser Sachverhalt soll in Kapitel 4.1.2 genauer beleuchtet werden.

#### 4.1.1.2 2008 MRP1 und MDCKII BCRP

Für funktionelle Untersuchungen an ABCC1 bzw. ABCG2 wurden die Zelllinien 2008 MRP1 bzw. MDCKII BCRP verwendet. Auch diese sollten mittels MTT-Assay bezüglich ihres MDR-Phänotyps charakterisiert werden, wozu die bereits zuvor für ABCB1 verwendete Auswahl an zytotoxischen Substanzen eingesetzt wurde.

Die mit dem *ABCC1* Gen transfizierte humane Ovarialkarzinomzelllinie 2008 MRP1 fand für die funktionelle Testung an ABCC1 Verwendung. Die an dieser und der zugehörigen sensitiven Zelllinie 2008 ermittelten  $pGI_{50}$ -Werte und Resistenzfaktoren sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Es fällt auf, dass lediglich für das auch in der Literatur als Substrat eingestufte Doxorubicin eine – wenn auch geringfügig – verminderte Sensitivität der transfizierten Zelllinie gegenüber dem Zytostatikum detektiert werden kann ( $F_R = 5,96$ )[54, 91]. Im Fal-

**Tabelle 4.3:** Resistenzfaktoren ( $F_R$ ) der Zelllinie 2008 MRP1 gegenüber verschiedenen Zytostatika. Die angegebenen  $pGI_{50}$ -Werte wurden mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt ( $n=3$ ).

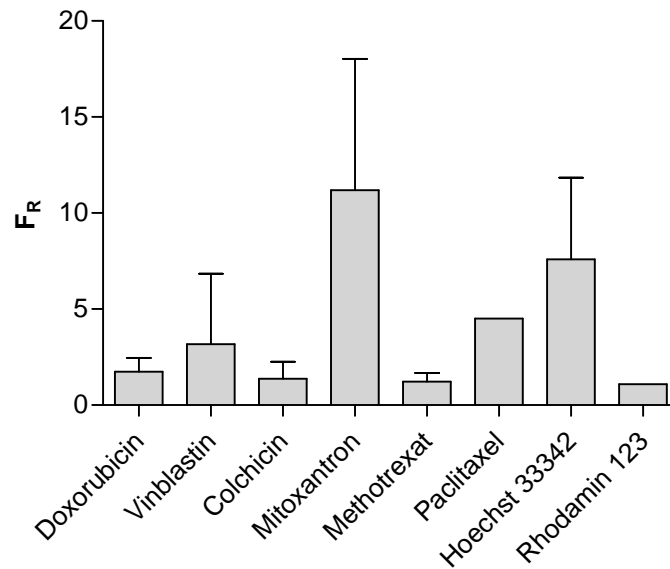
Substanz	$pGI_{50}(2008\ MRP1) \pm SD$	$pGI_{50}(2008) \pm SD$	$F_R \pm SD$
Doxorubicin	$5,55 \pm 0,03$	$6,33 \pm 0,10$	$5,96 \pm 1,46$
Vinblastin	$7,09 \pm 0,08$	$7,26 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,35$
Colchicin	$6,93 \pm 0,06$	$7,36 \pm 0,16$	$2,67 \pm 1,03$
Mitoxantron	$6,39 \pm 0,08$	$6,73 \pm 0,25$	$2,17 \pm 1,32$
Methotrexat	$7,32 \pm 0,01$	$7,25 \pm 0,10$	$0,86 \pm 0,20$
Paclitaxel	$7,62 \pm 0,08$	$7,63 \pm 0,16$	$1,02 \pm 0,42$
Hoechst 33342	$5,85 \pm 0,04$	$5,96 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,21$
Rhodamin 123	$5,21 \pm 0,08$	$5,52 \pm 0,21$	$2,04 \pm 1,05$

le von Vinblastin und Methotrexat ist dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den  $pGI_{50}$ -Werten messbar.

Für das Folsäure-Analogon Methotrexat konnten verschiedene Autoren zwar einen aktiven Transport in ABCC1-haltigen Membranvesikeln detektieren, eine ABCC1 vermittelte Resistenz gegenüber der Substanz war jedoch unter ähnlichen Bedingungen wie den hier verwendeten (72 h Zytotoxizitätsassay) nicht nachweisbar [130, 185].

Methotrexat wird nach seiner aktiven Aufnahme in die Zelle durch die enzymatische Bildung von Polyglutamaten metabolisiert, wobei dessen zytotoxische Wirkung erhalten bleibt bzw. durch intrazelluläre Akkumulation der Metabolite zusätzlich verstärkt wird [186]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese während der 72-stündigen Inkubationszeit gebildeten Metabolite keine Substrate von ABCC1 darstellen, weshalb nach diesem Zeitraum keine durch den Transporter herbeigeführte Resistenz zu beobachten ist [130, 187]. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung von Hooijberg *et al.*, dass bei einer verkürzten Inkubationszeit von nur 4 h, während der noch keine vollständige Umsetzung zu Polyglutamaten stattfinden kann, eine deutlich verminderte Sensitivität der ABCC1 exprimierenden Zelllinie 2008 MRP1 gegenüber Methotrexat detektiert wurde [130]. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für weitere mit ABCC1 eng verwandte Transporter wie z.B. ABCC2, ABCC3 und ABCC5 belegt werden [130, 187, 188]. Dementsprechend ist es mit dem hier gewählten Versuchsaufbau nicht möglich, den ABCC1 vermittelten Transport von Methotrexat auf Resistenzebene nachzuweisen.

Neben den Anthrazyklinen und Folsäure-Analoga stellen die Mitosehemmstoffe aus der Gruppe der *Vinca*-Alkaloide weitere literaturbekannte Substrate von ABCC1 dar. Innerhalb der hier durchgeführten Versuchsreihe kann jedoch keine Resistenz der Zelllinie 2008 MRP1 gegenüber Vinblastin – einem Vertreter dieser Klasse – nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4.3).



**Abbildung 4.7:** Resistenzfaktoren der Zelllinie MDCKII BCRP gegenüber verschiedenen Zytostatika. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.

Zwar konnten Loe *et al.* zeigen, dass Vinblastin – ähnlich wie das eindeutig als Substrat identifizierte Vincristin – in der Lage ist, den ABCC1 vermittelten Transport von Leukotrienen  $C_4$  in Plasmamembranvesikeln zu hemmen [189], auf zellulärer Ebene scheint der potentielle Substratcharakter der Substanz jedoch eher von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die von verschiedenen Autoren publizierte Resistenzfaktoren unterschiedlicher mit dem humanen *ABCC1* Gen transfizierter Zelllinien gegenüber Vinblastin sind insgesamt äußerst gering [190, 191]. Die Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber Vincristin und auch Doxorubicin war hier deutlich stärker ausgeprägt, weshalb unter Berücksichtigung des innerhalb der vorliegenden Arbeit ermittelten sehr geringen Resistenzfaktors von 2008 MRP1 gegenüber Doxorubicin ( $F_R = 5,96$ ) davon ausgegangen werden kann, dass die Vinblastin-Resistenz der genannten Zellen zu schwach ausgeprägt ist, um unter diesen Versuchsbedingungen detektiert zu werden.

Im Falle der übrigen untersuchten Chemotherapeutika und Fluoreszenzfarbstoffe, die alle keine Substrate von ABCC1 darstellen, können erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede der  $pGI_{50}$ -Werte in den Zelllinien 2008 und 2008 MRP1 detektiert werden. Somit weist auch das Resistenzspektrum dieser Zelllinie auf die Expression des gewünschten Zielproteines hin.

Für funktionelle Untersuchungen an ABCG2 wurde die mit dem humanen *ABCG2* Gen (Wildtyp R482) transfizierte Zelllinie MDCKII BCRP verwendet. Die mittels MTT-Assay ermittelten Resistenzfaktoren dieser Zellen gegenüber den ausgewählten zytotoxischen Substanzen sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Zelllinie MCF/MX wurde ausschließlich für

die Charakterisierung der in Anhang E beschriebenen Substanzen verwendet und soll hier nicht näher betrachtet werden.

Es ist eindeutig eine Resistenz der *ABCG2* transfizierten Zellen gegenüber den auch in der Literatur als Substrate beschriebenen Verbindungen Mitoxantron und Hoechst 33342 zu erkennen [28, 36]. Für die übrigen Testsubstanzen konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den  $pGI_{50}$ -Werten in MDCKII BCRP Zellen und der entsprechenden parenteralen Zelllinie MDCKII detektiert werden. Diese Beobachtung war zu erwarten, da die Mitosehemmstoffe Vinblastin, Colchicin und Paclitaxel keine Substrate von ABCG2 darstellen. Rhodamin 123 und Doxorubicin werden ausschließlich durch zwei ABCG2 Mutanten (R482T und R482G) transportiert, die in einigen durch Selektion mit unterschiedlichen Zytostatika gewonnenen resistenten Zelllinien nachgewiesen werden konnten [36, 92]. Da MDCKII BCRP Zellen durch Einbringen der entsprechenden Wildtyp-cDNA erzeugt wurden, sollte in diesem Falle auch keine verringerte Sensitivität gegenüber den genannten Substanzen zu beobachten sein [92, 134].

In diesem Zusammenhang stellt der Folsäure-Antagonist Methotrexat eine Ausnahme dar. Für diese Substanz kann keine verringerte Sensitivität der MDCKII BCRP Zellen detektiert werden, obwohl laut Literatur sowohl Methotrexat als auch – im Gegensatz zu ABCC1 – die intrazellulär gebildeten Di- und Triglutamate durch Wildtyp-ABCG2 transportiert werden sollen [93, 192, 193]. Jedoch wurde durch Volk *et al.* beschrieben, dass zum einen die ABCG2 vermittelte Resistenz gegenüber dieser Verbindung deutlich schwächer ausgeprägt ist, als die gegenüber Mitoxantron, zum anderen wiesen mit *ABCG2* transfizierte Zellen insgesamt geringere Resistenzfaktoren auf, als die in den genannten Publikationen untersuchten selektionierten Zelllinien [194]. Da auch der in dieser Arbeit für Mitoxantron ermittelte Resistenzfaktor ( $F_R = 11,2$ ) vergleichsweise klein ist, erscheint es wahrscheinlich, dass in dem hier gewählten Ansatz eine möglicherweise ABCG2 vermittelte Resistenz gegenüber Methotrexat in MDCKII BCRP Zellen nicht detektierbar ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die mit dem humanen ABCG2 Gen transfizierte Zelllinie MDCKII BCRP ein für die Überexpression dieses Transporters typisches Resistenzspektrum aufweist. Dies trifft – mit gewissen Einschränkungen – auch auf die Zelllinie 2008 MRP1 zu. Hier wäre es sinnvoll die erhaltenen Ergebnisse durch die Untersuchung weiterer spezifischer ABCC1 Substrate zusätzlich abzusichern. Insgesamt ist somit davon auszugehen, dass die genannten Zellen die gewünschten Proteine in ausreichender Menge exprimieren. Die ermittelten Resistenzfaktoren gegenüber den als Substrat identifizierten zytotoxischen Substanzen sind im Vergleich zu literaturbekannten selektionierten Zelllinien jedoch eher gering.

## 4.1.2 Untersuchung der ABCB1 Expression

Da der Fokus dieser Arbeit primär auf der funktionellen Untersuchung des Transporters ABCB1 lag, wurden nur die entsprechenden Zelllinien intensiver charakterisiert. Dabei sollte in erster Linie die Expression des gewünschten Zielproteins in den Zellen nachgewiesen werden.

### 4.1.2.1 Nachweis von humanem ABCB1 mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper 17F9

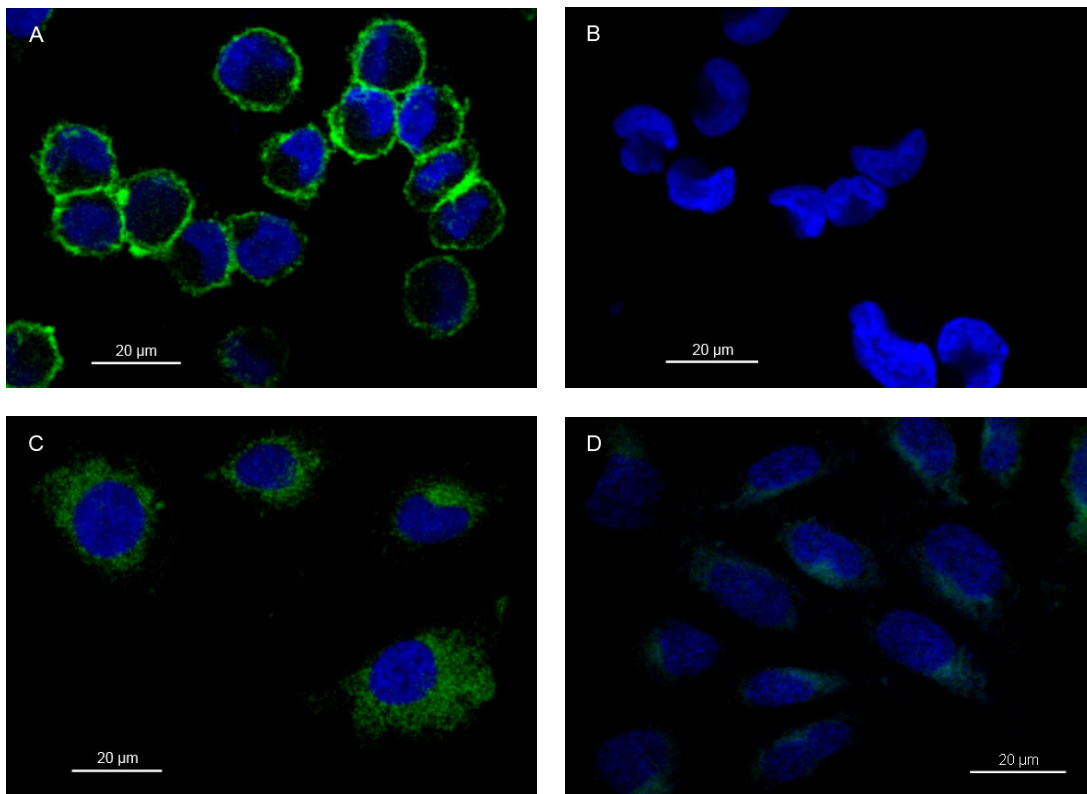
Um das Vorhandensein von ABCB1 in den verschiedenen Zelllinien zu verifizieren, wurde zunächst der FITC-markierte monoklonale Antikörper 17F9 (Maus IgG<sub>2b</sub>) eingesetzt. Dieser bindet selektiv an ein extrazelluläres Epitop des humanen Proteins und ist somit gut für den Nachweis von ABCB1 in lebenden Zellen geeignet [145]. Die Kopplung des Antikörpers mit Fluoresceinisothiocyanat ermöglicht zusätzlich dessen direkte Detektion mittels Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer.

In Abbildung 4.8 sind Präparate der untersuchten Zelllinien dargestellt, in denen ABCB1 mit dem zuvor genannten Antikörper angefärbt wurde. Diese wurden wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben hergestellt und mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes betrachtet und dokumentiert.

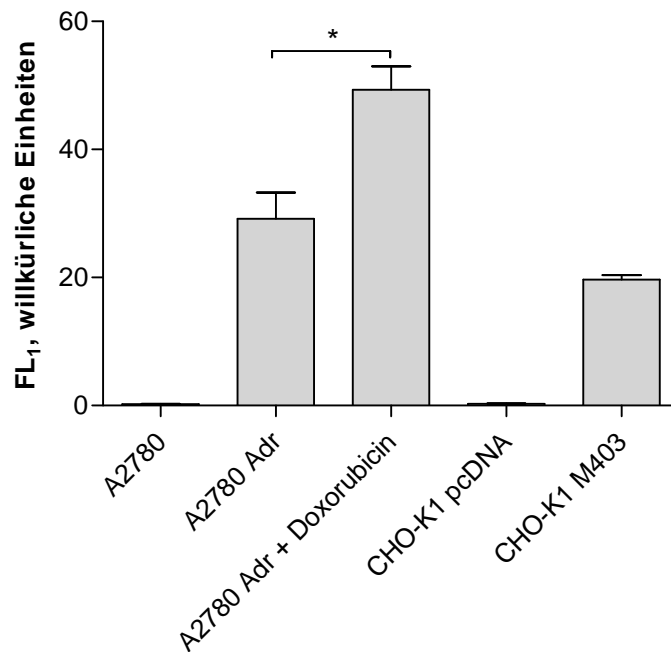
Im Falle der mit Doxorubicin selektionierten Zelllinie A2780 Adr (Abbildung 4.8, A) ist eindeutig das Vorhandensein von ABCB1 in der Zytoplasmamembran (in grün dargestellt) nachweisbar. In der zugehörigen sensitiven Zelllinie A2780 ist dagegen kein ABCB1 vorhanden (B). In der entsprechenden Darstellung sind lediglich die in diesem Fall mit DAPI angefärbten Zellkerne (blau) erkennbar. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die beiden CHO-Zelllinien. Auch in der mit dem humanen ABCB1 Gen transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403 (C) ist eine große Menge des Proteins in der Zellmembran detektierbar, während in den mit dem Leervektor transfizierten Zellen (D) lediglich eine äußerst schwache Fluoreszenz des an den Antikörper gebundenen FITC erkennbar ist.

Um den ABCB1 Expressionsstatus in den verschiedenen Zelllinien zusätzlich quantifizieren zu können, wurde das Protein erneut mit dem zuvor verwendeten Antikörper markiert und die Proben mit Hilfe des Durchflusszytometers vermessen (vgl. Kapitel 3.3.5). Die ermittelte zelluläre Fluoreszenz nach Anregung bei 488 nm ( $FL_1$ ,  $530 \pm 15$  nm) ist dabei ein Maß für die in der Zelle vorhandene Menge an ABCB1.

In Abbildung 4.9 ist erkennbar, dass mit dem Antikörper 17F9 auch in diesem Versuchsansatz weder in A2780 noch in CHO-K1 pcDNA Zellen das Vorhandensein von ABCB1 nachgewiesen werden kann. Im Falle von CHO-K1 pcDNA kann jedoch aus diesem Ergebnis



**Abbildung 4.8:** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der ABCB1 Expression in den verwendeten Zelllinien. ABCB1 wurde mit Hilfe des FITC-markierten Antikörpers 17F9 (grün) visualisiert. Zellkerne wurden mit DAPI (A und B) oder Hoechst 33258 (C und D) angefärbt (blau). A: A2780 Adr; B: A2780; C: CHO-K1 M403; D: CHO-K1 pcDNA.



**Abbildung 4.9:** Nachweis von humanem ABCB1 in verschiedenen Zelllinien. Aufgetragen ist die nach der Markierung mit dem FITC-markierten Antikörper 17F9 mittels Durchflusszytometrie gemessene zelluläre Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ext.}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 530 \pm 15 \text{ nm}$ ). Die ABCB1 Expression in A2780 Adr Zellen kann durch die Behandlung mit Doxorubicin ( $0,5 \mu\text{mol/l}$ ) signifikant gesteigert werden (zweiseitiger t-Test, \*  $p < 0,05$ ). Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier Proben.



nicht direkt auf die Abwesenheit des Transporters geschlossen werden, da der verwendete Antikörper zwar an humanes ABCB1, nicht jedoch an die entsprechenden Proteine anderer Spezies bindet [145].

Im Gegensatz dazu ist sowohl in A2780 Adr als auch in CHO-K1 M403 eine große Menge des humanen Transporters detektierbar. Dabei ist die ABCB1 Expression in der menschlichen Ovarialkarzinomzelllinie deutlich höher, als in der mit dem humanen Protein transfizierten (CHO-K1 M403). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass die mit Hilfe des MTT-Assays ermittelten Resistenzfaktoren von A2780 Adr deutlich über den an CHO-K1 M403 bestimmten Sensitivierungsfaktoren des ABCB1 Inhibitors XR9577 liegen (siehe Kapitel 4.1.1.1).

In dem hier beschriebenen Experiment wurden des Weiteren zwei unterschiedliche Proben der durch Selektion erzeugten Zelllinie A2780 Adr untersucht (vgl. Abbildung 4.9). Hierbei handelte es sich um solche Zellen, die schon über einen längeren Zeitraum kultiviert worden waren. Vor der Expressionsbestimmung wurden diese auf zwei Gewebekulturflaschen aufgeteilt und das Medium eines Ansatzes mit dem Zytostatikum Doxorubicin ( $0,5 \mu\text{mol/l}$ ) versetzt. Am Tag vor der Antikörperfärbung wurde das Medium in beiden Kulturflaschen durch frisches (zytostatikafreies) ersetzt.

In Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass die ABCB1 Expression im Falle der unbehandelten Zellen nur wenig höher ist, als die in der transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403. Die in Kapitel 4.1.1.1 an den beiden Zelllinien bestimmten Resistenz- und Sensitivierungsfaktoren weisen jedoch auf einen deutlicheren Unterschied der Expressionsraten hin. Offensichtlich kommt es bei längerfristiger zytostatikafreier Kultur der selektionierten Zellen aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes zu einer Abnahme der ABCB1 Expression. Die kurzfristige Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum führt jedoch wieder zu einem signifikanten Anstieg der in der Zellmembran vorhandenen Menge des Transporters.

Folglich wurden die A2780 Adr Zellen während der Kulturdauer in jeder zehnten Passage routinemäßig für 24–48 h mit  $0,5 \mu\text{mol/l}$  Doxorubicin behandelt, um die Überexpression von ABCB1 auf einem möglichst gleich bleibenden Niveau zu erhalten. Dennoch unterliegt der ABCB1 Expressionsstatus in diesen Zellen gewissen Schwankungen, weshalb beispielsweise die im weiteren Verlauf dieser Arbeit ermittelten Resistenzfaktoren gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika nicht exakt mit den in Kapitel 4.1.1.1 aufgeführten Werten übereinstimmen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der in Kapitel 4.1.1 beschriebene MDR-Phänotyp der Zelllinie A2780 Adr auf die durch die Behandlung mit Doxorubicin induzierte Überexpression von ABCB1 zurückzuführen ist. Die parenterale Zelllinie A2780 dagegen exprimiert dieses Protein nicht. Die potentielle Anwesenheit anderer ABC-Transporter in

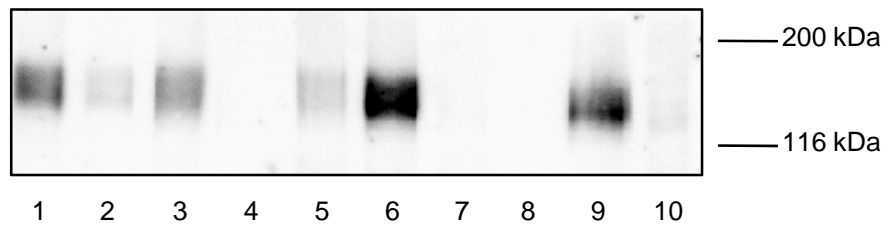
A2780 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht, da der Literatur zu entnehmen ist, dass die Zelllinie keine der sonstigen klassischen MDR-assozierten ABC-Transporter exprimiert. Kool *et al.* konnten lediglich minimale Mengen an *ABCC1* und *ABCC5* RNA nachweisen [174, 195]. Deren Einfluss in den durchgeführten funktionellen Untersuchungen ist jedoch als äußerst gering einzustufen, zumal beispielsweise die Expression von *ABCC1* auf Proteinebene nicht gezeigt werden konnte [174].

Auch in der transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403 ist das humane Protein in der Zytoplasmamembran vorhanden, wenn auch in geringerer Menge, als in der selektionierten Zelllinie. In den mit dem Leervektor transfizierten Zellen kann dagegen kein *ABCB1* nachgewiesen werden. Aus dieser Beobachtung kann jedoch nicht unmittelbar auf dessen Abwesenheit geschlossen werden, da möglicherweise physiologisch in den Zellen vorhandenes Hamster-*ABCB1* nicht durch den für das humane Protein spezifischen Antikörper 17F9 markiert werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die zuvor durchgeführten MTT-Assays (vgl. Kapitel 4.1.1.1) eindeutig auf die Expression von *ABCB1* in der CHO-K1 Zelllinie hinweisen, wurden alle Zelllinien nachfolgend zusätzlich mittels Western-Blot auf die Anwesenheit des Transporters hin untersucht (siehe Kapitel 4.1.2.2).

#### 4.1.2.2 Nachweis von *ABCB1* in CHO-K1 Zellen mittels SDS-PAGE und Western-Blot

Die in den vorausgehenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zelllinie CHO-K1 bereits eine gewisse intrinsische Expression von *ABCB1* aufweist. Da dieses mit dem für das humane Protein spezifischen Antikörper 17F9 (vgl. Kapitel 4.1.2.1) nicht nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich der weniger selektive monoklonale Antikörper C219 eingesetzt. Dieser bindet vermutlich an ein  $\alpha$ -helikales Epitop innerhalb der NBDs [143]. Da es sich bei diesen um hochkonservierte Bereiche innerhalb der Familie der ABC-Transporter handelt, ist die Kreuzreaktivität dieses Antikörpers gegenüber verschiedenen mit *ABCB1* verwandten Transportern nicht verwunderlich. Neben den humanen Proteinen *ABCB1* und *ABCB4* (*MDR3*) werden unter anderem auch die verschiedenen Hamster Isoformen des Proteins erkannt [142, 196, 197]. Aufgrund der Tatsache, dass das Bindungsepitop des Antikörpers (NBDs) intrazellulär lokalisiert ist, kann der Nachweis des Proteins in diesem Falle jedoch nur mittels SDS-PAGE und Western-Blot erfolgen.

Zu diesem Zweck wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, sowohl eine einfache Membranpräparation als auch ein Lysat der zu untersuchenden Zelllinien hergestellt und der Gesamtproteingehalt sämtlicher Proben ermittelt (vgl. Kapitel 3.3.2). Beide Methoden sollen nachfolgend hinsichtlich ihrer Eignung für den Nachweis von *ABCB1* mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot verglichen werden.



**Abbildung 4.10:** Nachweis von ABCB1 mittels Western-Blot. Pro Bahn wurden 5  $\mu$ g Gesamtprotein bzw. 5  $\mu$ l des Proteinstandards (Bahnen 4 und 8) aufgetragen. Untersucht wurden die folgenden Proben: Membranpräparationen CHO-K1 M403 (Bahn 1) und CHO-K1 pcDNA (Bahn 2); Zellysate CHO-K1 M403 (Bahn 3) und CHO-K1 pcDNA (Bahn 5); Membranpräparationen A2780 Adr (Bahn 6) und A2780 (Bahn 7); Zellysate A2780 Adr (Bahn 9) und A2780 (Bahn 10).

Der in Abbildung 4.10 dargestellte Western-Blot untermauert die Ergebnisse aus dem vorherigen Abschnitt (vgl. Kapitel 4.1.2.1). Sowohl in den Membranpräparationen als auch in den Lysaten aus den Zelllinien A2780 Adr und CHO-K1 M403 ist ABCB1 detektierbar, wobei die humane Zelllinie (Abbildung 4.10, Bahnen 6 und 9) eine größere Menge des Proteins exprimiert als die CHO-K1 Zellen (Bahnen 1 und 3). Der ABCB1-Nachweis in A2780 Zellen dagegen fällt erwartungsgemäß negativ aus (Bahnen 7 und 10). Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.1.2.1 dargestellten Resultaten kann jedoch mit dem hier verwendeten Antikörper C219 die Existenz von ABCB1 in CHO-K1 pcDNA, und damit indirekt auch in der parenteralen Zelllinie CHO-K1, nachgewiesen werden. Es kann jedoch aufgrund der Unspezifität des Antikörpers nicht differenziert werden, welche der verschiedenen in Nagern exprimierten Isoformen des Proteins, von denen zwei mit der Entwicklung einer MDR in Verbindung gebracht werden, tatsächlich in den Zellen vorhanden sind [198–200].

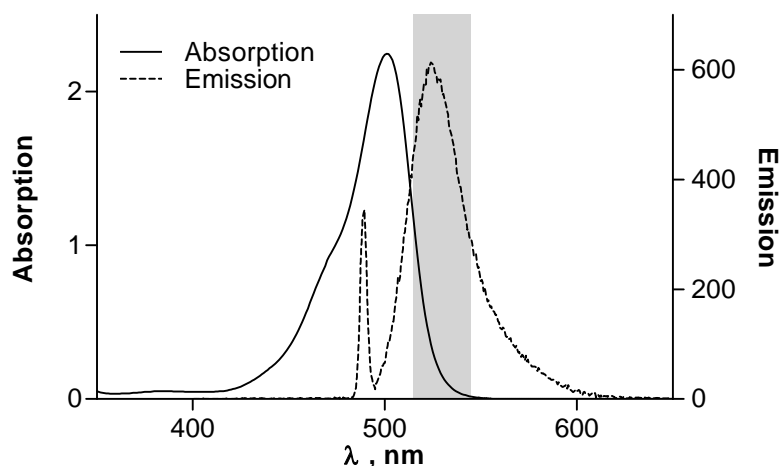
Vergleicht man für die unterschiedlichen ABCB1-haltigen Zelllinien in Abbildung 4.10 die Intensität der Banden von Membranpräparation und Zellysate, fällt auf, dass diese im Falle der Lysate deutlich geringer ist, als bei den entsprechenden Membranpräparationen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den Lysaten die gesamte in den Zellen vorhandene Proteinmenge – inklusive der zytoplasmatischen Proteine und Peptide – vorhanden ist. Im Gegensatz dazu werden diese bei der Herstellung einer Membranpräparation abgetrennt und die Membranbestandteile zusätzlich angereichert. Somit ist der relative Anteil des membranständigen ABCB1 an der für die SDS-PAGE eingesetzten Gesamtproteinmenge (5  $\mu$ g jeder Probe) im Zellysate kleiner als in der Membranpräparation, was die geringere Intensität der zugehörigen Banden erklärt. Damit sind grundlegend beide Verfahren für die der SDS-Gelelektrophorese vorausgehende Probenaufbereitung geeignet, wobei die Herstellung eines Zellysates mit deutlich geringerem zeitlichem und apparativem Aufwand möglich ist. Aufgrund der in diesem Falle stärkeren „Verdünnung“ der membranären Proteine durch zytoplasmatische Bestandteile sollte die Methode für den Nachweis geringer Mengen ABCB1 jedoch leicht modifiziert werden. In diesem Fall könnte beispielsweise eine höhere Gesamt-

proteinmenge bei der SDS-PAGE aufgetragen werden.

Insgesamt wurde nachgewiesen, dass die für die funktionelle Untersuchung von ABCB1 verwendeten Zelllinien A2780 Adr und CHO-K1 M403 große Mengen an humanem ABCB1 exprimieren. Die zu A2780 Adr gehörige sensitive Zelllinie A2780 kann als entsprechende Negativkontrolle eingesetzt werden, da sie weder ABCB1 noch andere klassische MDR-assoziierte Transporter (ABCC-Familie, ABCG2) aufweist. Im Gegensatz dazu ist in der parenteralen Zelllinie CHO-K1 bereits physiologisch eine gewisse Menge von Hamster-ABCB1 vorhanden. Aus diesem Grunde sind die im weiteren Verlauf der Arbeit beobachteten Effekte in CHO-K1 M403 nicht ausschließlich dem humanen Transporter, sondern vermutlich einer Mischung aus diesem und dem Hamster-Protein zuzuordnen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der beiden Proteine (87 %) ist jedoch von einem ähnlichen Verhalten im funktionellen Assay auszugehen. Weiterhin ist die Zelllinie CHO-K1 pcDNA nur bedingt als Negativ-Kontrolle (zum Ausschluss unspezifischer Effekte) geeignet, da in der Regel mit Wechselwirkungen der Testsubstanzen mit dem Nager-Protein zu rechnen ist. Aus diesem Grund wurden die CHO-K1 Zelllinien nur für wenige funktionelle Untersuchungen verwendet. Für den größten Teil der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde die humane Zelllinie A2780 Adr eingesetzt.

## 4.2 Etablierung des Rhodamin 123-Akkumulationsassays

Um die Aktivität neuer Modulatoren gegenüber ABCB1 charakterisieren zu können, sollte zunächst ein FACS-basierter HTS-fähiger Rhodamin 123-Akkumulationsassay entwickelt werden. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist ein bekanntes ABCB1-Substrat, welches aufgrund seiner spektralen Eigenschaften (vgl. Abbildung 4.11) gut für durchflusszytometrische Untersuchungen geeignet ist [201]. Es bindet an die – nach der Substanz benannte – Rhodamin-Bindungsstelle von ABCB1 und kann somit für die Untersuchung der spezifischen Interaktion verschiedener Testsubstanzen mit dieser Bindungsstelle eingesetzt werden [64]. Einen weiteren Vorteil der Substanz gegenüber anderen Farbstoffen wie Calcein-AM, Daunorubicin oder Hoechst 33342 stellt die Tatsache dar, dass Rhodamin 123 ein spezifisches ABCB1-Substrat darstellt, welches beispielsweise nicht durch ABCC1 oder ABCG2 transportiert wird [36]. Lediglich zwei relativ selten in mit Zytostatika selektierten Zelllinien vorkommende ABCG2-Mutanten (R482T und R482G) sind in der Lage Rhodamin 123 zu transportieren [92].



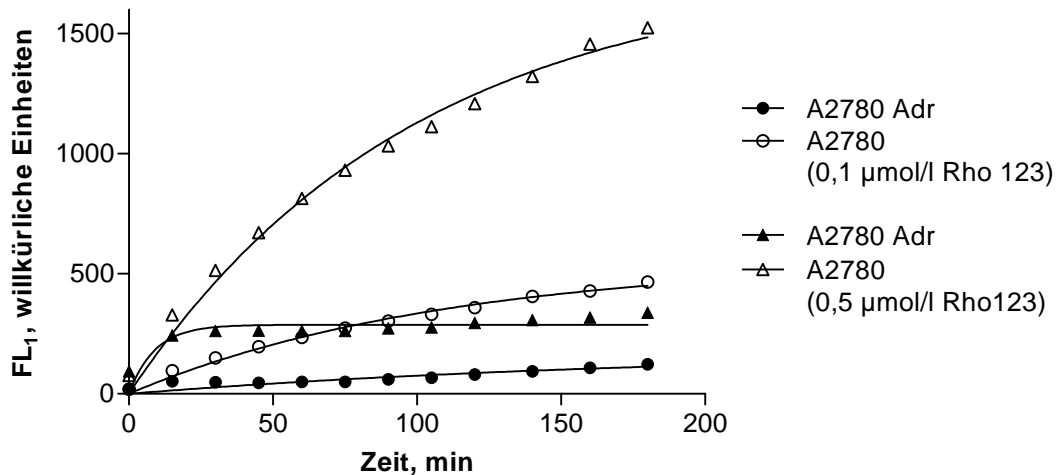
**Abbildung 4.11:** Fluoreszenzspektrum von Rhodamin 123 in KHP (pH 7,4). Aufgenommen wurde sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsspektrum nach Anregung bei 488 nm. In grau dargestellt ist der im FL<sub>1</sub>-Kanal des verwendeten Durchflusszytometers detektierte Wellenlängenbereich.

Als Grundlage für die Etablierung des Assays diente der bereits in vorherigen Arbeiten verwendete Daunorubicin-Akkumulationsassay [202, 203]. Bei diesem werden die Zellen in An- und Abwesenheit einer Testsubstanz mit einer definierten Konzentration des ABCB1-Substrates Daunorubicin (DNR) inkubiert. Dieses akkumuliert in der Zelle, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom eingestellt hat, wobei die zelluläre Fluoreszenz zu einem definierten Zeitpunkt im Steady-State proportional zur intrazellulären Konzentration des Farbstoffes ist. Zellen, die sich durch eine Überexpression von ABCB1 auszeichnen, weisen demnach geringere Fluoreszenzwerte auf, als solche, die das Protein nicht besitzen oder in denen es durch Zusatz eines Inhibitors vollständig oder teilweise gehemmt wird.

Im Folgenden sollen einige Eckpunkte bei der Entwicklung des Rhodamin 123-Akkumulationsassays dargestellt werden.

#### 4.2.1 Akkumulation von Rhodamin 123 in A2780 und A2780 Adr

Die Akkumulation von Rhodamin 123 in A2780 und A2780 Adr Zellen (1 Mio/ml) wurde zunächst mit der in Kapitel 3.4.2.1 beschriebenen Methode untersucht. Hierbei wurde die intrazelluläre Fluoreszenz im FL<sub>1</sub>-Kanal des Durchflusszytometers ( $\lambda_{\text{ext.}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 530 \pm 15 \text{ nm}$ ) nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des Substrates über einen Zeitraum von 180 min in regelmäßigen Abständen gemessen und gegen die zugehörige Inkubationszeit aufgetragen. Die Messung erfolgte in serumfreiem RPMI 1640 Medium (ohne den pH-Indikator Phenolrot). Repräsentative Aufnahmekinetiken in beiden Zelllinien (0,1 und 0,5  $\mu\text{mol/l}$  Rhodamin 123) sind in Abbildung 4.12 dargestellt.



**Abbildung 4.12:** Repräsentatives Beispiel einer Aufnahmekinetik von Rhodamin 123 in den Zelllinien A2780 (offene Symbole) und A2780 Adr (gefüllte Symbole). Dargestellt ist die mittels Durchflusszytometrie ermittelte intrazelluläre Fluoreszenz in Anwesenheit von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (Kreise) und 0,5  $\mu\text{mol/l}$  (Dreiecke) Rhodamin 123. Die Messung erfolgte in RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot.

Die Aufnahme des Farbstoffes folgt in beiden Zelllinien einer Kinetik erster Ordnung, wobei die ABCB1-haltigen Zellen erwartungsgemäß eine deutlich geringere Menge des Farbstoffes aufnehmen, als die entsprechende sensitive Zelllinie. Die gemessenen Fluoreszenzwerte von A2780 Adr betragen dabei lediglich rund 25-30 % derer von A2780. In der resistenten Zelllinie wird bereits nach weniger als 60 min ein Plateau mit konstanter Fluoreszenz erreicht. Im Gegensatz dazu ist dies in A2780 nicht der Fall. Auch nach 180 min ist – insbesondere bei der höheren Rhodamin 123-Konzentration von 0,5  $\mu\text{mol/l}$  – weiterhin ein leichter Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der lipophile, basische Farbstoff hier in sauren intrazellulären Kompartimenten wie z.B. den

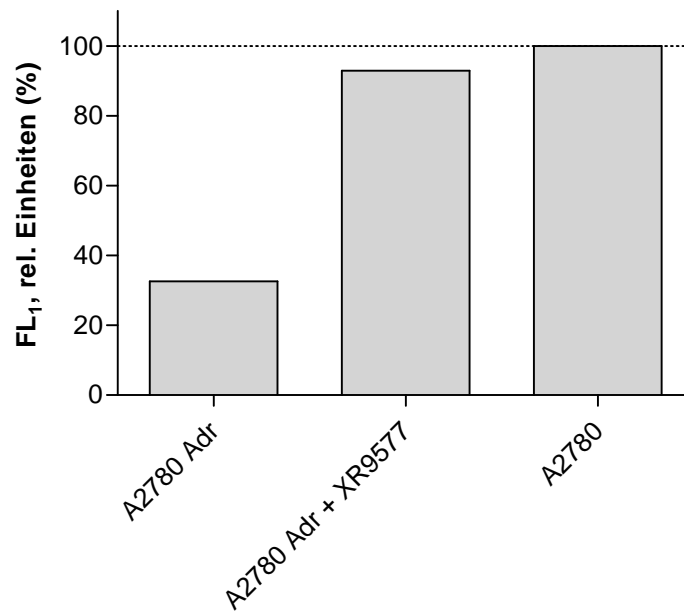
Mitochondrien akkumulieren kann [149, 150], während er in den ABCB1 überexprimierenden Zellen direkt aus der Zellmembran heraus transportiert wird.

Ein derartiger Effekt wurde auch von Loetchutinat *et al.* beschrieben [204]. Die Autoren stellten fest, dass bei der Aufnahme von Rhodamin 123 in humane K562-Leukämiezellen ebenfalls kein Plateau erreicht wird. Sie führten die Beobachtung auf die – verglichen mit anderen Rhodamin-Derivaten – langsamere Aufnahme von Rhodamin 123 zurück. Noch bevor ein Steady-State erreicht wird, kann die Esterstruktur der Substanz durch unspezifische Esterasen gespalten werden, was zu einer weiteren Akkumulation des Farbstoffes führen soll.

Insgesamt erscheint eine Überlagerung beider Effekte, die die Aufnahme von Rhodamin 123 in die Zelle beeinflussen können, wahrscheinlich. So könnte die zytoplasmatische Menge des Farbstoffes sowohl durch seine bevorzugte Akkumulation in intrazellulären Kompartimenten als auch durch enzymatische Hydrolyse erniedrigt werden, was zu einer weiteren Aufnahme aus dem umgebenden Medium führen würde.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss des ABCB1-Inhibitors XR9577 auf die intrazelluläre Rhodamin 123-Akkumulation untersucht. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich Aufnahmekinetiken des Farbstoffes in Anwesenheit von 1  $\mu\text{mol/l}$  dieser Substanz aufgenommen. Diese gleichen in ihrem Verlauf den in der sensitiven Zelllinie erhaltenen; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind diese in Abbildung 4.12 jedoch nicht dargestellt. Das Diagramm in Abbildung 4.13 zeigt die aus den entsprechenden Kinetiken (hier: 0,1  $\mu\text{mol/l}$  Rhodamin 123) nach einer Kinetik 1. Ordnung extrapolierten Plateau-Fluoreszenzwerte. Die intrazelluläre Fluoreszenz der resistenten Zelllinie A2780 Adr steigt dabei in Anwesenheit des Inhibitors fast bis auf das Niveau der sensitiven Zellen an, weshalb auf eine praktisch vollständige Hemmung des ABCB1 vermittelten Transports von Rhodamin 123 durch XR9577 geschlossen werden kann. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit den in Kapitel 4.1.1.1 dargestellten Resultaten des MTT-Assays überein.

Somit konnte gezeigt werden, dass der gewählte Ansatz grundsätzlich zur funktionellen Untersuchung von ABCB1 in A2780 Adr Zellen geeignet ist. Ausgehend von diesen Erkenntnissen, wurde die Methode anschließend weiter optimiert und schließlich auf Mikrotiterplatten übertragen. Dabei lag der Fokus insbesondere auf den vorher dargestellten Effekten in der sensitiven Zelllinie und deren Einfluss auf die Nutzbarkeit des Assays für die routinemäßige Testung potentieller neuer ABCB1-Modulatoren. Die im Folgenden dargestellten Optimierungsschritte wurden unter Verwendung einer mittleren Rhodamin 123-Konzentration (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ) durchgeführt.



**Abbildung 4.13:** Inhibition des Rhodamin 123 Efflux durch den ABCB1-Inhibitor XR9577 (1  $\mu\text{mol/l}$ ). Aufgetragen sind die aus den Aufnahmekinetiken von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  Rhodamin 123 berechneten Plateau-Fluoreszenzwerte.

#### 4.2.2 Einfluss des verwendeten Puffers

Die zuvor beschriebenen Experimente wurden zunächst in serumfreiem RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot) durchgeführt, um während der Inkubationszeit eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist jedoch die komplexe Zusammensetzung des Mediums, welches eine Vielzahl verschiedener Komponenten enthält, die beispielsweise durch Interaktion mit ABCB1 oder durch unspezifische Beeinflussung der Rhodamin 123-Fluoreszenz zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen können.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, ob auch andere – weniger komplex zusammengesetzte – Medien für diese Anwendung geeignet sind. Hierbei lag das Augenmerk auf verschiedenen HEPES-basierten Puffern, deren Zusammensetzung und Herstellung in Kapitel 3.1 aufgeführt ist. Wie zuvor beschrieben, wurde auch hier die Kinetik der Aufnahme von Rhodamin 123 (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ) in A2780 und A2780 Adr Zellen untersucht. Die erhaltenen Zeit-Fluoreszenz-Kurven sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

Die in KHP und HEPES-Na Puffer (20 mmol/l) erhaltenen Aufnahmekinetiken (vgl. Abbildung 4.14 A und B, Kreise) weisen einen ähnlichen Verlauf auf, wie die zuvor in Nährmedium aufgenommenen. Auch hier folgt die Akkumulation des Farbstoffes näherungsweise einer Kinetik erster Ordnung, bei der im Falle der sensitiven Zelllinie auch nach 180 min Inkubati-



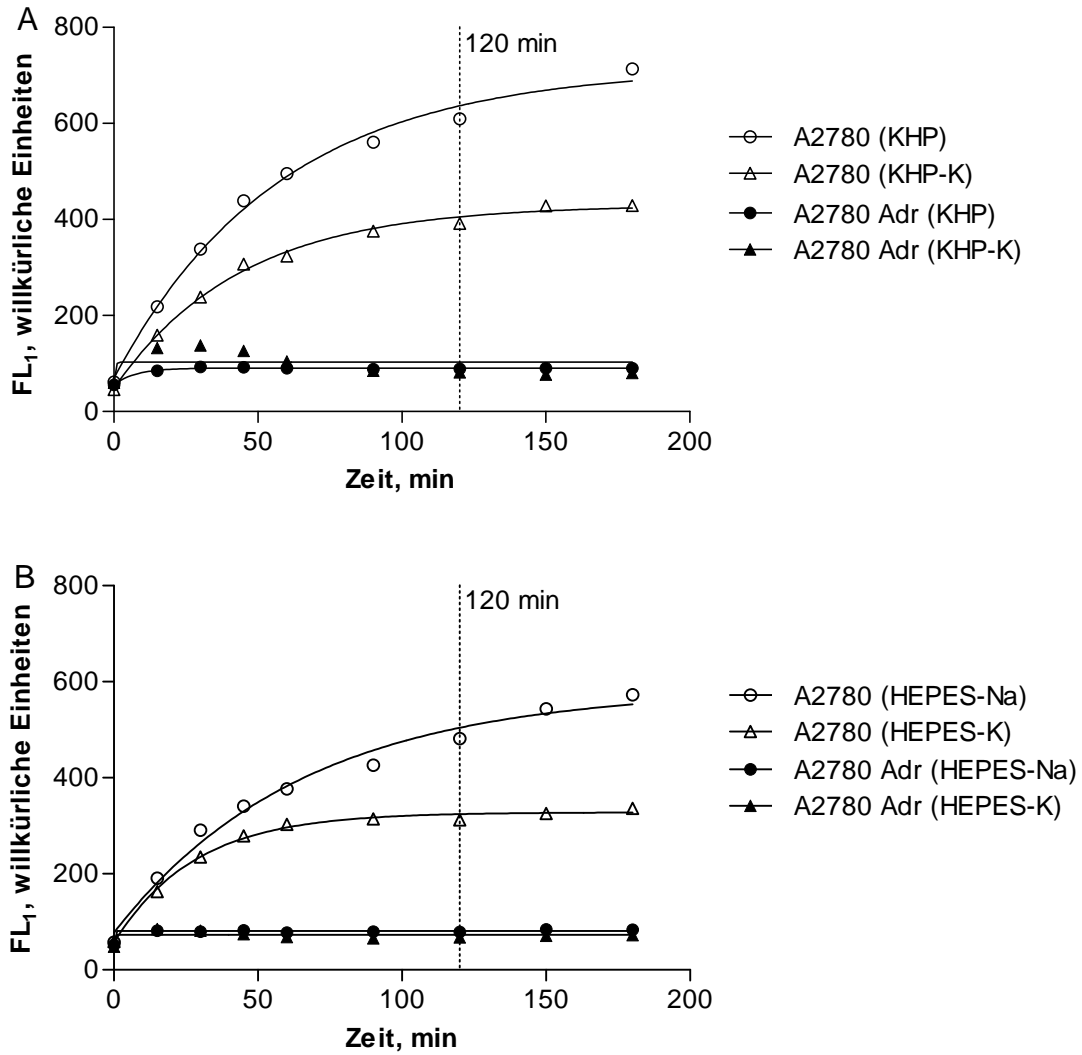
onszeit kein stabiles Plateau erreicht wird; dieser Effekt scheint hier jedoch etwas schwächer ausgeprägt zu sein. Dabei werden in beiden Fällen ähnliche Fluoreszenzwerte gemessen. Das Verhältnis der Plateau-Fluoreszenzwerte in den verschiedenen Zelllinien (Messfenster) ist ebenfalls für beide Pufferlösungen ähnlich, wobei die in der ABCB1 exprimierenden Zelllinie gemessene Fluoreszenz erwartungsgemäß nur etwa 15 % des in der sensitiven Zelllinie ermittelten Wertes beträgt.

Trotz der vergleichbaren Versuchsergebnisse besitzt KHP gegenüber dem einfachen HEPES-Na Puffer einige Vorteile. Die höhere Glucosekonzentration des KHP ist vergleichbar mit der im Nährmedium enthaltenen, was sich positiv auf die Zellvitalität während des Experimentes auswirkt. Des Weiteren könnte die – durch den zusätzlichen Einsatz von Natriumhydrogencarbonat ermöglichte – niedrigere Konzentration der Puffersubstanz HEPES von Vorteil sein. Diese soll in höheren Konzentrationen einen Einfluss auf die Synthese von ATP und den ABCB1 vermittelten Transport besitzen [205]. Insbesondere vor diesem Hintergrund ist bei der Verwendung von KHP die Vergleichbarkeit der Testungsergebnisse mit Daten, die mit Hilfe anderer bereits etablierter funktioneller Assays (z.B. Calcein-AM Assay, Hoechst 33342 Akkumulationsassay, vgl. Kapitel 3.5.2 und 3.5.3) generiert wurden, gewährleistet.

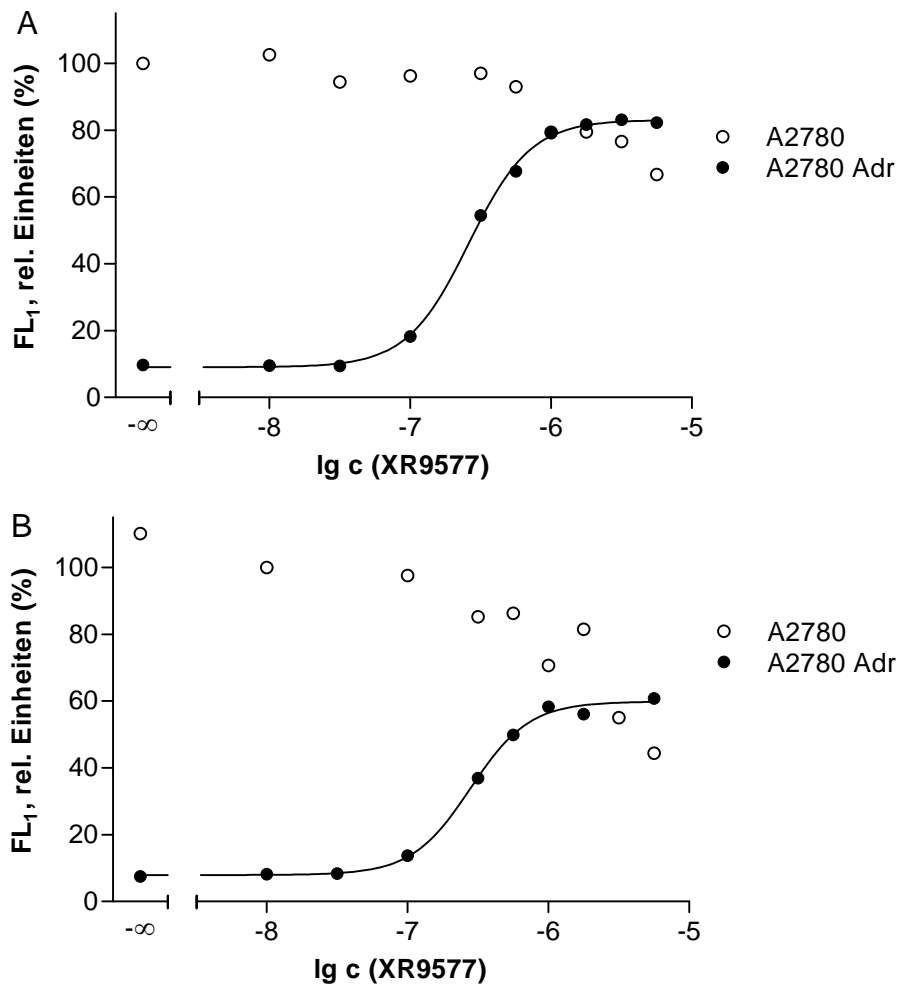
Zusätzlich wurden zwei Pufferlösungen eingesetzt, die in ihrer Zusammensetzung den oben genannten entsprachen, wobei das in KHP und HEPES-Na Puffer enthaltene Natriumchlorid durch eine äquimolare Konzentration Kaliummethansulfonat substituiert worden war (vgl. Kapitel 3.1.2.4). Die so im extrazellulären Medium enthaltene sehr hohe Kalium- und niedrige Chloridionenkonzentration führt in der Zelle zu einer Aufhebung des Membranpotentials. So kann der verstärkte Einstrom und die Akkumulation von positiv geladenen Substanzen wie z.B. Rhodamin 123 in den Mitochondrien verhindert werden [124]. Hier sollte überprüft werden, ob die Verwendung eines derartigen Puffers zum Erreichen eines stabilen Plateaus in der Aufnahmekinetik von Rhodamin 123 in A2780 Zellen führt.

Die in KHP-K und HEPES-K Puffer erhaltenen Aufnahmekinetiken sind ebenfalls in Abbildung 4.14 (A und B, Dreiecke) dargestellt. In der resistenten Zelllinie A2780 Adr ist verglichen mit den Na-haltigen Lösungen kein abweichendes Verhalten zu beobachten. Das Erreichen eines Plateaus in A2780 dagegen wird durch den Einsatz der K-haltigen Puffer begünstigt. Des Weiteren fällt auf, dass die Plateau-Fluoreszenzwerte (A2780) bei Verwendung von KHP-K und HEPES-K Puffer deutlich unterhalb derer in den Na-haltigen Lösungen liegen. Diese Beobachtung ist ebenfalls auf das Fehlen des Membranpotentials zurückzuführen, welches unter physiologischen Bedingungen die Aufnahme von Rhodamin 123 in die Zelle fördert und somit die intrazelluläre Konzentration der Substanz erhöht [204].

Zusätzlich wurden Konzentrations-Effekt-Kurven des ABCB1-Inhibitors XR9577 in den unterschiedlichen Pufferlösungen aufgenommen. In Abbildung 4.15 sind die in HEPES-Na und



**Abbildung 4.14:** Aufnahmekinetiken von Rhodamin 123 in den Zelllinien A2780 Adr und A2780. Dargestellt ist die Zunahme der zellulären Fluoreszenz (0,3  $\mu\text{mol/l}$  Rhodamin 123) in verschiedenen Puffern. A: KHP und KHP-K; B: HEPES-Na und HEPES-K.



**Abbildung 4.15:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven von XR9577 in A2780 Adr und A2780 Zellen unter Verwendung von HEPES-Na Puffer (A) und HEPES-K Puffer (B).  $pIC_{50}(\text{HEPES-Na}) = 6,59$ ,  $pIC_{50}(\text{HEPES-K}) = 6,56$ .

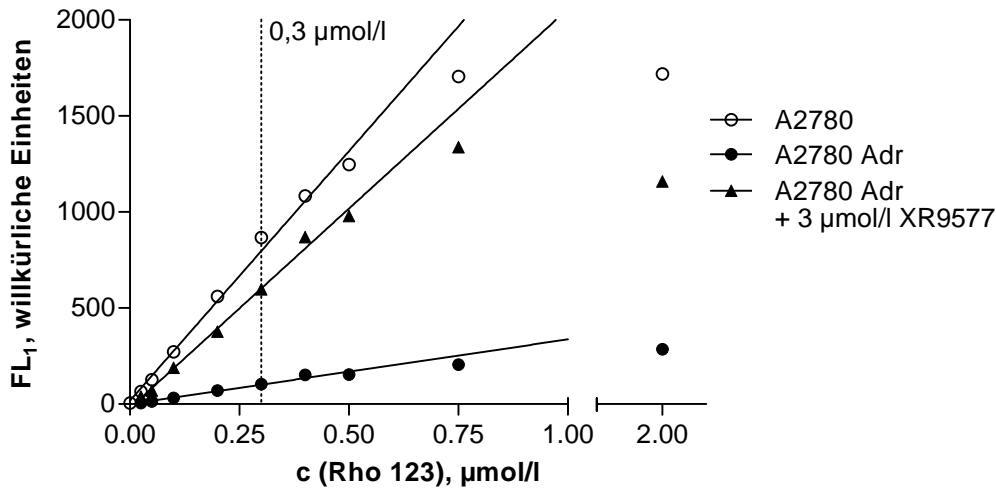
HEPES-K Puffer erhaltenen Kurven dargestellt. Die beschriebenen Tendenzen sind auch im Falle von KHP und KHP-K erkennbar, jedoch weniger deutlich ausgeprägt. Es konnten in beiden Puffern mittels nichtlinearer Regression Konzentrations-Effekt Kurven generiert werden, wobei sich identische  $pIC_{50}$ -Werte ergaben ( $pIC_{50}(\text{HEPES-Na}) = 6,59$ ,  $pIC_{50}(\text{HEPES-K}) = 6,56$ ). Im Falle des HEPES-Na Puffers (vgl. Abbildung 4.15) wird ABCB1 durch hohe Konzentrationen des Inhibitors vollständig gehemmt, sodass der Topwert der sigmoiden Kurve näherungsweise mit den in der sensitiven Zelllinie gemessenen Fluoreszenzwerten übereinstimmt. Bei Verwendung von HEPES-K Puffer (B) ist dies nicht der Fall. Der Topwert der in A2780 Adr aufgenommenen Kurve beträgt lediglich etwa 60 % der Fluoreszenz in der sensitiven Zelllinie. Des Weiteren ist in der K-haltigen Lösung eine starke unspezifische Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz der A2780 Zellen zu detektieren. Diese ist in HEPES-Na Puffer ebenfalls erkennbar, jedoch weniger deutlich ausgeprägt.

Basierend auf den zuvor dargestellten Ergebnissen erscheint der Einsatz von KHP-K oder HEPES-K Puffer für die funktionelle Testung an ABCB1 nicht sinnvoll. Zwar kann bei Verwendung dieser Lösungen die Einstellung eines Steady-States bei der Rhodamin 123 Aufnahme in A2780 Zellen positiv beeinflusst werden, dem stehen jedoch die beschriebenen Nachteile gegenüber. Des Weiteren können die unter Einsatz unphysiologisch hoher Kaliumkonzentrationen ermittelten Daten nur bedingt mit denen anderer funktioneller Assays verglichen werden. Vor diesem Hintergrund wurden alle nachfolgenden Untersuchungen unter Verwendung von KHP durchgeführt.

### 4.2.3 Übertragung in den Mikromaßstab

Da die bislang verwendete Methode für die Messung einer größeren Anzahl an Proben nicht praktikabel war, sollte der Assay auf Mikrotiterplatten übertragen werden. Die Probenvorbereitung erfolgte dabei analog der zuvor beschriebenen Vorgehensweise, wobei die eingesetzten Volumina entsprechend reduziert wurden (vgl. Kapitel 3.4.2.2). Bei allen beschriebenen Versuchen wurden die Platten während der Messung auf 37 °C temperiert.

Da aus messtechnischen Gründen bei dieser Art der Versuchsdurchführung keine vollständige Kinetik des Substrates aufgenommen werden kann, wurde die intrazelluläre Fluoreszenz lediglich zu einem definierten Zeitpunkt im Steady-State vermessen. Ausgehend von den Erkenntnissen aus dem vorherigen Abschnitt (vgl. Kapitel 4.2.2) wurde eine Inkubationszeit von 120 min (Lagerung der Platten im Inkubator bei 37 °C) nach Zugabe des Substrates gewählt. Zu diesem Zeitpunkt ist in der resistenten Zelllinie A2780 Adr bereits keine weitere Änderung der Fluoreszenz mehr zu verzeichnen, während diese im Falle von A2780 noch leicht ansteigt. Innerhalb der zu erwartenden Messdauer von ca. 15 min pro 96er-Platte erhöht sich die intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz in diesem Zeitraum jedoch nur noch



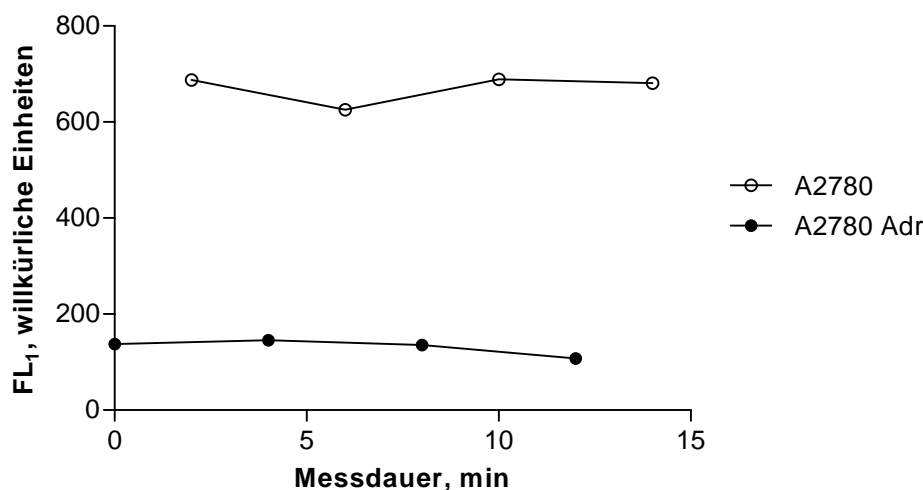
**Abbildung 4.16:** Konzentrationsabhängigkeit der Rhodamin 123-Fluoreszenz in A2780 Adr und A2780 (120 min Inkubationszeit, 37 °C). Die Fluoreszenz ist bis 0,5 µmol/l linear abhängig von der Rhodamin 123-Konzentration.  $r^2$  (A2780 Adr) = 0,977;  $r^2$  (A2780) = 0,993;  $r^2$  (A2780 Adr + 3 µmol/l XR9577) = 0,994.

um maximal 5-10% (vgl. Abbildung 4.14). Damit ist der Einfluss auf den  $pIC_{50}$ -Wert eines ABCB1-Inhibitors als vernachlässigbar gering einzustufen. Um die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Experimente zu gewährleisten, sollte die vorgesehene Inkubationszeit jedoch nicht deutlich über- oder unterschritten werden.

Neben der gewählten Inkubationszeit ist die eingesetzte Konzentration des Substrates ein weiterer wichtiger Parameter eines derartigen funktionellen Assays. Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre Fluoreszenz beider Zelllinien nach 120 minütiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Rhodamin 123 (0–2 µmol/l) bestimmt (vgl. Abbildung 4.16). Eine Proportionalität der Rhodamin 123-Fluoreszenz zur eingesetzten Konzentration ist dabei in allen Fällen bis 0,5 µmol/l gewährleistet, wobei sich die durch lineare Regression erhaltenen Geraden im Ursprung des Koordinatensystems schneiden. Davon ausgehend wurde für die geplanten funktionellen Untersuchungen eine Rhodamin 123-Konzentration von 0,3 µmol/l, die etwa in der Mitte des linearen Konzentrationsbereiches liegt, ausgewählt.

In einem letzten Schritt sollte die Annahme, dass es während der durchflusszytometrischen Messung einer Mikrotiterplatte zu keiner relevanten Zunahme der zellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz kommt, verifiziert werden. In Abbildung 4.17 ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz in den Kontroll-Proben (A2780 und A2780 Adr, 0,3 µmol/l Rhodamin 123) einer 96er-Platte dargestellt. Dabei unterliegen die Werte in beiden Zelllinien zwar einer gewissen Streuung, es ist jedoch in keiner ein systematischer Anstieg – wie er ggf. aufgrund des Verlaufes der Aufnahmekinetik (vgl. Abbildung 4.14) zu erwarten gewesen wäre – zu beobachten.

Somit konnte die Methode erfolgreich in den Mikromaßstab übertragen werden, wodurch ein



**Abbildung 4.17:** Zeitlicher Verlauf der Rhodamin 123-Fluoreszenz während der Messung einer Mikrotiterplatte. Dargestellt ist die Fluoreszenz in den Kontrollproben eines repräsentativen Experimentes (Zellen, 0,3  $\mu\text{mol/l}$ ) nach einer Inkubationszeit von 120 min bei 37 °C.

HTS-fähiger Assay erhalten wurde. Die Messung der intrazellulären Fluoreszenz zu einem definierten Zeitpunkt im Steady-State ermöglicht dabei die Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben, wobei sich eine Rhodamin 123-Konzentration von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  und eine Inkubationszeit von 120 min als geeignet erwiesen.

#### 4.2.4 Untersuchung bekannter ABCB1-Inhibitoren

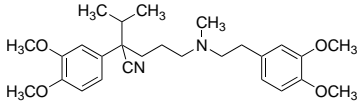
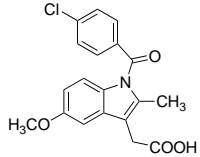
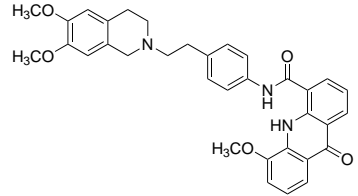
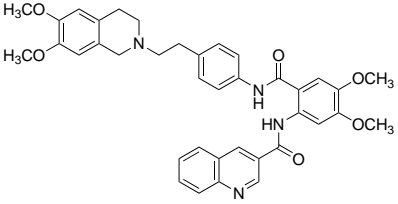
Im Anschluss an die beschriebenen Optimierungsschritte sollten zunächst Konzentrations-Effekt-Kurven einiger bekannter ABCB1-Inhibitoren aufgenommen werden. Diese Auswahl an Verbindungen umfasste sowohl Inhibitoren der ersten Generation (Verapamil, Ciclosporin), als auch spezifische MDR-Modulatoren wie z.B. GF120918 (Elacridar) und XR9576 (Tariquidar). Zusätzlich wurde das Analgetikum Indometacin, welches keine Aktivität gegenüber ABCB1 besitzt, untersucht [206]. Die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten  $\text{pIC}_{50}$ -Werte sowie die Strukturen der untersuchten Verbindungen sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Erwartungsgemäß weisen die Substanzen der ersten Generation Verapamil ( $\text{pIC}_{50} = 5,43$ ,  $\text{IC}_{50} = 3,7 \mu\text{mol/l}$ ) und Ciclosporin ( $\text{pIC}_{50} = 5,57$ ,  $\text{IC}_{50} = 2,7 \mu\text{mol/l}$ ) eine relativ geringe ABCB1 inhibitorische Wirkung auf, was typisch für diese Art von Verbindungen ist. Die MDR modulierenden Eigenschaften stellen hier lediglich eine zusätzliche Wirkung neben der pharmakologischen Hauptwirkung dar [97, 207, 208].

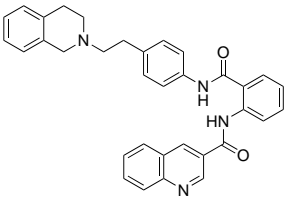
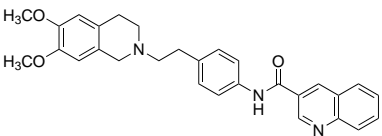
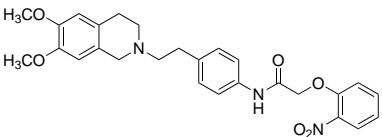
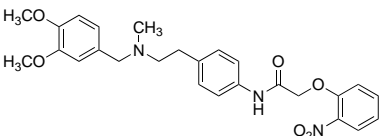
Dagegen wird im Falle von GF120918 ( $\text{pIC}_{50} = 6,69$ ,  $\text{IC}_{50} = 0,20 \mu\text{mol/l}$ ) und XR9576 ( $\text{pIC}_{50} = 6,66$ ,  $\text{IC}_{50} = 0,22 \mu\text{mol/l}$ ) bereits durch mehr als zehnfach geringere Modula-

torkonzentrationen eine halbmaximale Hemmung des ABCB1 vermittelten Rhodamin 123-Transports erreicht. Die beiden Substanzen stellen Vertreter der Inhibitoren der dritten Generation dar, deren Struktur hinsichtlich ihrer MDR modulierenden Eigenschaften optimiert wurde [97, 102, 209]. In beiden Fällen liegen die mit Hilfe des Rhodamin 123-Akkumulationsassays erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte im Bereich der in der Literatur unter Verwendung unterschiedlicher Testsysteme bzw. Substrate bestimmten Konzentrationen. Diese schwanken im Falle des Acridonsäurederivates GF120918 zwischen etwa 0,02 und 0,5  $\mu\text{mol/l}$  [102, 105, 210]. Für XR9576 sind halbmaximale Hemmkonzentrationen zwischen 0,03 und 0,48  $\mu\text{mol/l}$  publiziert [209, 210]. Auf die Substanzklasse der Acridonsäurederivate soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch ausführlicher eingegangen werden.

**Tabelle 4.4:** Untersuchung von ABCB1-Inhibitoren mittels Rhodamin 123-Akkumulationsassay an A2780 ADR und A2780 Zellen. Aufgeführt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte.

Substanz	Struktur	$pIC_{50} \pm SD$ (Rho 123)
Ciclosporin	Peptid	$5,57 \pm 0,14$
Verapamil		$5,43 \pm 0,08$
Indometacin		k.E.
GF120918		$6,69 \pm 0,23$
XR9576		$6,66 \pm 0,23$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pIC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)
XR9577		6,00 ± 0,17
WK-X-51		5,42 ± 0,14
WK-X-81		5,91 ± 0,08
WK-Y-50		5,54 ± 0,06

XR9577 sowie die sogenannten WK-Verbindungen stellen Derivate des XR9576 dar, die sich durch eine im Vergleich zur Ausgangsverbindung geringere Aktivität gegenüber ABCB1 auszeichnen. Es fällt auf, dass bereits die Abwesenheit der Methoxygruppen an der Tetrahydroisochinolin- und der Anthranilsäure-Partialstruktur des XR9576 zu einer deutlichen Abnahme der Wirksamkeit führt (XR9577, pIC<sub>50</sub> = 6,00, IC<sub>50</sub> = 1,0 µmol/l). Auch die übrigen untersuchten WK-Verbindungen besitzen deutlich geringere Aktivitätswerte als XR9576, die teilweise nur in der Größenordnung der zuvor genannten Inhibitoren der ersten Generation liegen. Detaillierte Betrachtungen zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen innerhalb dieser Verbindungsklasse sind der Literatur zu entnehmen [209, 211, 212].

Das Arylessigsäurederivat Indometacin weist erwartungsgemäß keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1 auf.

Nachfolgend sollen die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay erhaltenen Ergebnisse mit denen verschiedener anderer funktioneller Assays, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, verglichen werden. Die zugehörigen pIC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst, wobei ein Teil der Daten der Literatur entnommen wurde [168, 211].



**Tabelle 4.5:** Testungsergebnisse der ABCB1-Inhibitoren im Calcein-AM-Assay (Cal-AM), Daunorubicin-Akkumulationsassay (DNR) und Hoechst 33342-Akkumulationsassay (Hoe). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente (n.b. = nicht bestimmt). Der Hoechst 33342-Akkumulationsassay wurde mit 5  $\mu\text{mol/l}$  Hoechst 33342 durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit den ebenfalls verwendeten Literaturdaten zu gewährleisten.

Substanz	pIC <sub>50</sub> $\pm$ SD (Cal-AM)	pIC <sub>50</sub> $\pm$ SD (DNR)	pIC <sub>50</sub> $\pm$ SD (Hoe)
Ciclosporin	5,85 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	5,49 $\pm$ 0,07	5,85 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Verapamil	5,34 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	5,32 $\pm$ 0,04	5,18 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
GF120918	7,15 $\pm$ 0,12	6,90 $\pm$ 0,20	7,32 $\pm$ 0,11
XR9576	7,03 $\pm$ 0,12	6,95 $\pm$ 0,07	n.b.
XR9577	6,31 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	6,62 $\pm$ 0,13	6,45 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
WK-X-51	6,19 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	5,50 $\pm$ 0,14	7,01 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
WK-X-81	6,52 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	6,97 $\pm$ 0,03	6,64 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
WK-Y-50	6,20 $\pm$ 0,05	6,09 $\pm$ 0,14	n.b.

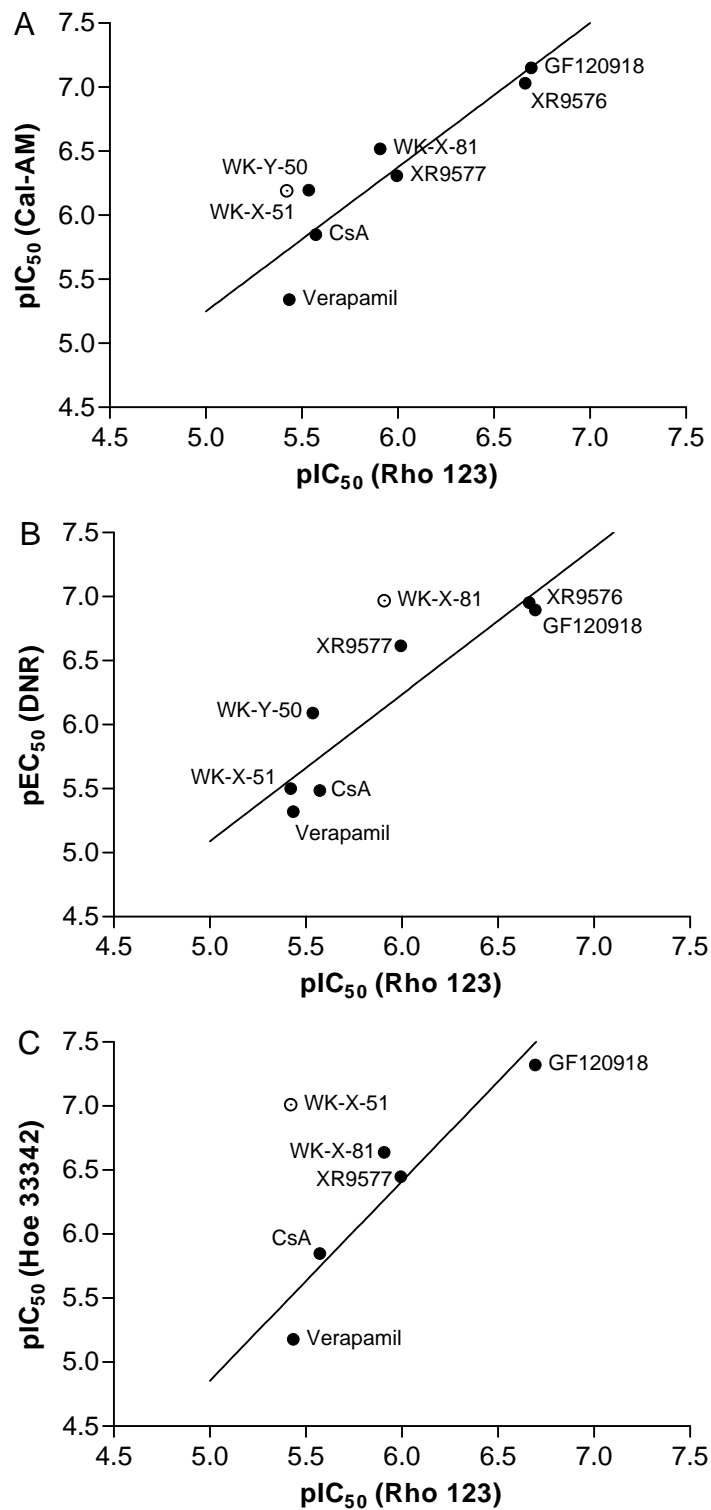
<sup>a</sup> pIC<sub>50</sub>-Wert entnommen aus [211]

<sup>b</sup> pIC<sub>50</sub>-Wert entnommen aus [168]

Der Rhodamin 123-Akkumulationsassay liefert ähnliche Ergebnisse wie die anderen Methoden, was sich in einer guten Korrelation der jeweiligen pIC<sub>50</sub>-Werte äußert (vgl. Abbildung 4.18). Trotz der sehr geringen Anzahl an Verbindungen liegt das Bestimmtheitsmaß in allen Fällen deutlich oberhalb eines Wertes von 0,8, weshalb von einem eindeutigen Zusammenhang zwischen den pIC<sub>50</sub>-Werten auszugehen ist. Lediglich einzelne stark abweichende Werte wurden dabei von der Korrelation ausgeschlossen. So besitzt WK-X-51 im Hoechst 33342-Akkumulationsassay eine deutlich höhere Aktivität, als gegenüber den anderen Substraten. Diese Beobachtung könnte auf eine Präferenz der Substanz gegenüber der Hoechst-Bindungsstelle von ABCB1 zurückzuführen sein [168].

Insgesamt liefern alle vier funktionellen Assays für die meisten der untersuchten Hemmstoffe vergleichbare Ergebnisse. Dies erscheint zunächst überraschend, da die Substrate an verschiedene Bindungsstellen des Transporters binden und somit unterschiedliche Interaktionen mit den Inhibitoren zu erwarten wären [64]. So ist die Korrelation zwischen den pIC<sub>50</sub>-Werten gegenüber Daunorubicin und Rhodamin 123 ( $r^2 = 0,844$ ), die beide an die Rhodamin-Bindungsstelle von ABCB1 binden sollen, sogar etwas schlechter, als die zwischen Hoechst 33342 und Rhodamin 123 ( $r^2 = 0,885$ ). Insbesondere die strukturell eng verwandten Verbindungen WK-X-81 und WK-Y-50 besitzen gegenüber Daunorubicin eine deutlich höhere Aktivität als gegenüber Rhodamin 123 (vgl. Abbildung 4.18, B).

Die hohe Übereinstimmung von pIC<sub>50</sub>-Werten, die unter Verwendung unterschiedlicher funktioneller Assays an ABCB1 ermittelt worden waren, konnte bereits in einer vorherigen Arbeit festgestellt werden [168]. Die geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Testsystemen



**Abbildung 4.18:** Korrelation der pIC<sub>50</sub>-Werte aus dem Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit den in weiteren funktionellen Assays erhaltenen (vgl. Tabelle 4.5). A: Calcein-AM,  $r^2 = 0,856$ ; B: Daunorubicin,  $r^2 = 0,844$ ; C: Hoechst 33342,  $r^2 = 0,885$ . Offene Symbole: Substanz wurde von der Korrelation ausgeschlossen.

men wurden hier vereinfachend mit Hilfe eines enzymkinetischen Ansatzes erklärt (siehe dazu auch Kapitel 3.6.4).

$$\frac{v_i}{v_0} = 0,5 = \frac{K_m + [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) + [S]} \quad \Leftrightarrow IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot K_i \quad (4.1a)$$

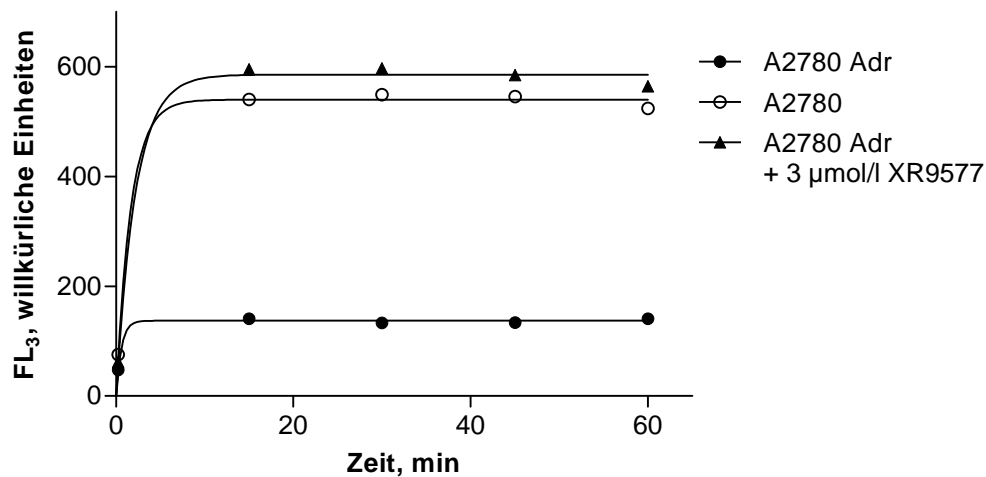
$$\frac{v_i}{v_0} = 0,5 = \frac{K_m + [S]}{(K_m + [S]) \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right)} \quad \Leftrightarrow IC_{50} = K_i \quad (4.1b)$$

Den Gleichungen 4.1a und 4.1b ist zu entnehmen, dass – bei Substratkonzentrationen kleiner als  $K_m$  – sowohl für den Fall einer kompetitiven (4.1a) als auch einer nicht-kompetitiven (4.1b) Hemmung die  $IC_{50}$  näherungsweise dem  $K_i$ -Wert entspricht. Damit ist der  $IC_{50}$ -Wert in diesen Fällen unabhängig von der Art der Interaktion des Inhibitors mit dem Substrat. Nur im Falle einer unkompetitiven Interaktionstyp mit einem der Substrate ist mit einer abweichenden  $IC_{50}$  zu rechnen, wodurch die Verbindung aus einer entsprechenden Korrelation herausfallen würde [168, 170]. Damit lassen sich allein aus dem Vergleich der  $pIC_{50}$ -Werte gegenüber verschiedenen Substraten von ABCB1 nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die Präferenz eines Inhibitors zu einer spezifischen Bindungsstelle des Proteins ziehen. Hierzu sind umfangreichere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der neu etablierte Rhodamin 123-Akkumulationsassay gut zur funktionellen Untersuchung von ABCB1-Modulatoren geeignet ist. Erwartungsgemäß sind die bei der Testung bekannter Hemmstoffe erhaltenen Ergebnisse mit denen anderer funktioneller Assays vergleichbar. Die Verwendung von Rhodamin 123 bietet gegenüber anderen Substraten jedoch den Vorteil, dass es sich um ein spezifisches ABCB1-Substrat handelt, welches nicht durch sonstige MDR-assoziierte Transporter wie ABCC1 oder ABCG2 transportiert wird [36]. Des Weiteren ist sichergestellt, dass Rhodamin 123 für die Charakterisierung der spezifischen Interaktion von Modulatoren mit der – nach der Substanz benannten – Rhodamin-Bindungsstelle von ABCB1 geeignet ist. Zwar besitzt beispielsweise Calcein-AM, welches ebenfalls an dieser Bindungsstelle binden soll, eine Grundstruktur, die der des Rhodamin 123 stark ähnelt, aufgrund der großen, flexiblen Ester-Strukturen kann jedoch auch eine Interaktion mit weiteren Bindungsstellen nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.5 Verwendung von Tetramethylrosamin als Substrat

In analoger Art und Weise wie Rhodamin 123 kann auch das strukturell eng verwandte Tetramethylrosamin (TMR) als Substrat zur durchflusszytometrischen Untersuchung der



**Abbildung 4.19:** Aufnahmekinetik von Tetramethylrosamin in den Zelllinien A2780 und A2780 Adr. Dargestellt ist die mittels Durchflusszytometrie ermittelte zelluläre Fluoreszenz in Anwesenheit von 0,3 µmol/l Tetramethylrosamin in KHP.

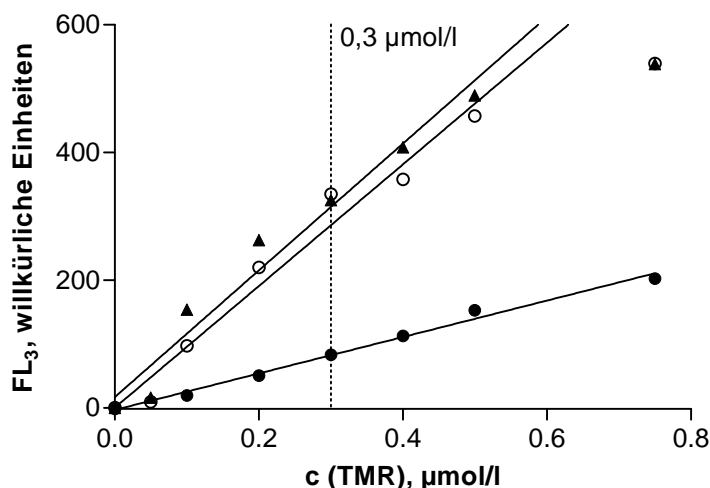
ABCB1-Aktivität eingesetzt werden. Dieser Fluoreszenzfarbstoff besitzt gegenüber Rhodamin 123 leicht veränderte spektrale Eigenschaften, wobei die Anregung bei 488 nm zur Emission bei etwa 570 nm führt (vgl. Spektren in Anhang D).

Die Aufnahme des Farbstoffs (0,3 µmol/l) in die Zelle folgt, wie Abbildung 4.19 zu entnehmen ist, ebenfalls näherungsweise einer Kinetik erster Ordnung. Im Gegensatz zu Rhodamin 123 wird hier jedoch sowohl in der ABCB1 überexprimierenden als auch in der sensitiven Zelllinie bereits nach wenigen Minuten ein Steady-State erreicht, sodass keine weitere Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz zu detektieren ist. Erwartungsgemäß beträgt der in A2780 Adr gemessene Plateau-Fluoreszenzwert nur etwa 25 % dessen in der sensitiven Zelllinie, was auf den ABCB1 vermittelten Transport dieses Farbstoffes zurückzuführen ist.

Weiterhin wurde der Einfluss des Inhibitors XR9577 auf die zelluläre Akkumulation von Tetramethylrosamin untersucht. In Anwesenheit des Hemmstoffs (3 µmol/l) steigt die in der resistenten Zelllinie detektierte Fluoreszenz näherungsweise bis auf den in A2780 erhaltenen Wert an (siehe Abbildung 4.19). Somit kann auch der aktive Efflux dieses ABCB1 Substrates durch XR9577 vollständig gehemmt werden.

In Analogie zu Rhodamin 123 wurde auch die Messung der Tetramethylrosamin-Akkumulation auf Mikrotiterplatten übertragen, um eine HTS-fähige Methode zu erhalten. Die Versuchsdurchführung folgte dabei der in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenen allgemeinen Vorgehensweise, wobei eine Inkubationszeit von 60 min festgelegt wurde.

Zur weiteren Validierung der Methode wurde schließlich überprüft, ob die zunächst willkürlich ausgewählte Tetramethylrosamin-Konzentration von 0,3 µmol/l in jenem Konzentrati-



**Abbildung 4.20:** Konzentrationsabhängigkeit der Tetramethylrosamin-Fluoreszenz in A2780 Adr und A2780 (60 min Inkubationszeit, 37 °C). Die Fluoreszenz ist bis 0,5 µmol/l linear abhängig von der Rhodamin 123-Konzentration.  $r^2$  (A2780 Adr) = 0,991;  $r^2$  (A2780) = 0,966;  $r^2$  (A2780 Adr + 3 µmol/l XR9577) = 0,971.

onsbereich liegt, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und eingesetzter Konzentration besteht. In Abbildung 4.20 ist die Abhängigkeit der intrazellulären Fluoreszenz von der Tetramethylrosamin-Konzentration dargestellt. Sämtliche Konzentrations-Fluoreszenz-Kurven weisen mindestens bis zu einer Konzentration von 0,5 µmol/l einen linearen Verlauf auf und schneiden sich im Ursprung des Koordinatensystems. Damit liegt die ursprünglich eingesetzte Konzentration von 0,3 µmol/l im linearen Bereich und kann für die Untersuchung des ABCB1 vermittelten Transports von Tetramethylrosamin verwendet werden.

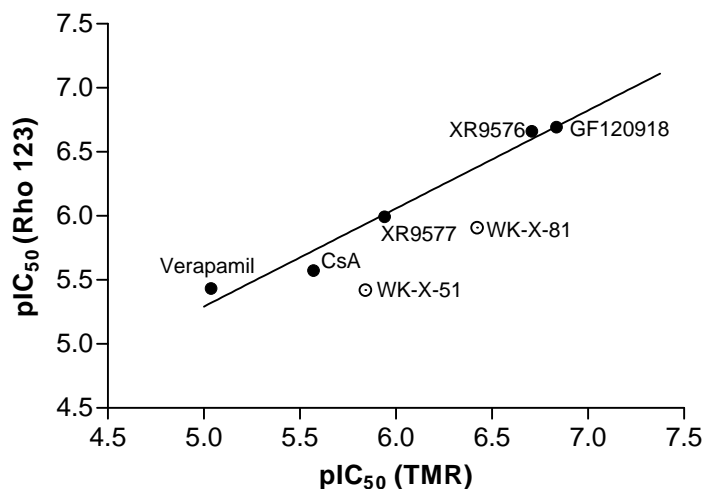
Schließlich sollten auch hier die  $pIC_{50}$ -Werte ausgewählter bekannter Inhibitoren von ABCB1 unter Verwendung von Tetramethylrosamin als Substrat bestimmt werden (siehe Tabelle 4.6). Insgesamt liegen die ermittelten Werte in der Größenordnung der zuvor im Rhodamin 123-Akkumulationsassay gemessenen. So besitzen die Inhibitoren der ersten Generation Verapamil und Ciclosporin auch hier die geringste Aktivität, während die als spezifische MDR-Modulatoren entwickelten Verbindungen GF120918 und XR9576 erwartungsgemäß die potentesten Hemmstoffe darstellen.

Die große Übereinstimmung zwischen den in beiden Testsystemen erhaltenen  $pIC_{50}$ -Werten äußert sich in einer sehr guten Korrelation der entsprechenden Messwerte (siehe Abbildung 4.21). Nach Ausschluss der auch in vorherigen Vergleichen häufig als Ausreißer bewerteten Verbindungen WK-X-51 und WK-X-81 ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,970. Vor dem Hintergrund der zuvor diskutierten Ergebnisse (vgl. Kapitel 4.2.4) war diese Beobachtung zu erwarten. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von Rhodamin 123

**Tabelle 4.6:** Testungsergebnisse bekannter Inhibitoren von ABCB1 im Rhodamin 123- und Tetramethylrosamin-Akkumulationsassay mit A2780 Adr. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung mindestens dreier unabhängiger Experimente.

Substanz	pIC <sub>50</sub> (TMR) ± SD	pIC <sub>50</sub> (Rho 123) ± SD
Ciclosporin	5,57 ± 0,14	5,57 ± 0,14
Verapamil	5,04 ± 0,04	5,43 ± 0,08
GF120918	6,84 ± 0,16	6,69 ± 0,23
XR9576	6,71 ± 0,16	6,66 ± 0,26
XR9577	5,94 ± 0,02	6,00 ± 0,17
WK-X-51	5,84 ± 0,04	5,42 ± 0,14
WK-X-81	6,42 ± 0,04	5,91 ± 0,08

und Tetramethylrosamin kann von einem sehr ähnlichen Bindungsverhalten der beiden Substanzen am Protein ausgegangen werden, sodass auch die Art der Interaktion eines Inhibitors mit beiden Substraten vergleichbar sein sollte. Dies äußert sich in einer hohen Übereinstimmung der entsprechenden pIC<sub>50</sub>-Werte. Dies trifft offenbar nicht auf die beiden untersuchten WK-Verbindungen zu, die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



**Abbildung 4.21:** Korrelation der im Tetramethylrosamin- und Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte verschiedener bekannter Inhibitoren von ABCB1 ( $r^2 = 0,970$ ). Die Substanzen WK-X-51 und WK-X-81 (offene Kreise) wurden von der Korrelation ausgeschlossen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben Rhodamin 123 auch Tetramethylrosamin zur durchflusszytometrischen Charakterisierung von ABCB1 geeignet ist. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der Substanzen und der weitestgehend hohen Übereinstimmung der in beiden Testsystemen erhaltenen Ergebnisse kann ein ähnliches Bindungsverhalten der beiden Substanzen am Protein postuliert werden.

## 5 Benzimidazole und Benzothiazole als Modulatoren von ABCB1

### 5.1 Aktivierung von ABCB1

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Aktivierung von ABCB1 durch unterschiedliche niedermolekulare Verbindungen. Dabei standen zunächst Thiazole und Benzimidazole im Mittelpunkt des Interesses, die sich von den bekannten Substanzen QB102 und QB11 ableiten (siehe Abbildung 5.1).

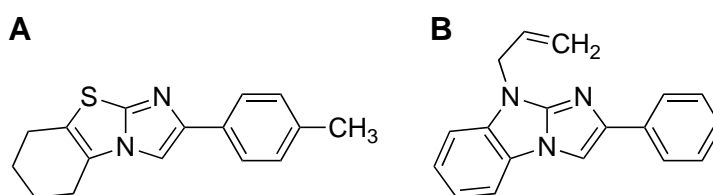
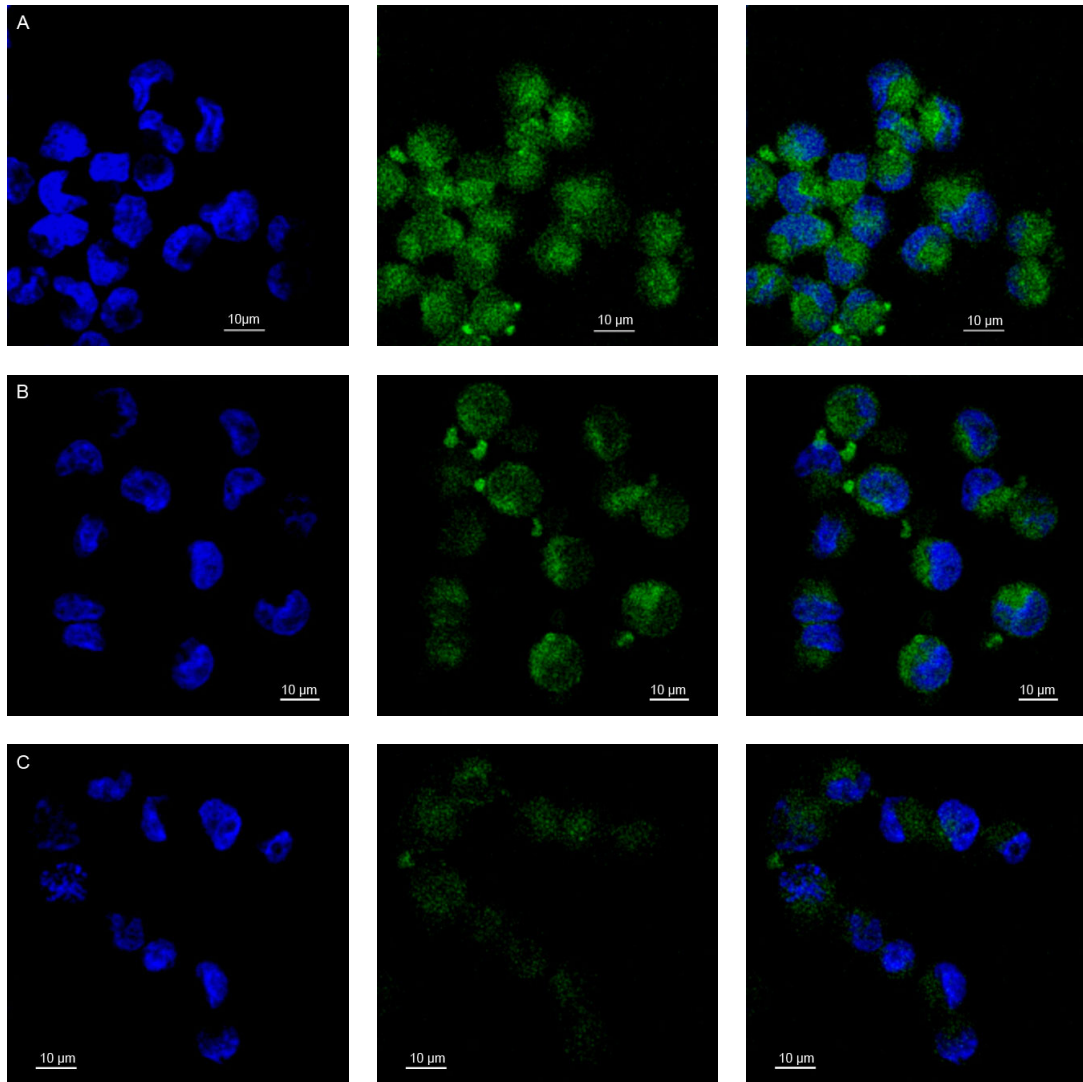


Abbildung 5.1: Strukturformeln der ABCB1-Aktivatoren QB102 (A) und QB11 (B).

Für die Substanzen QB102 und QB11 konnte durch Kondratov *et al.* gezeigt werden, dass diese – wie auch eine Reihe weiterer Verbindungen – in der Lage sind, den ABCB1 vermittelten Transport bestimmter Substrate zu stimulieren [123]. Dieser Effekt konnte jedoch lediglich gegenüber solchen Substraten beobachtet werden, die an die Rhodamin-Bindungsstelle des Proteins binden (Daunorubicin, Rhodamin 123). Basierend auf den Erkenntnissen von Shapiro und Ling [64], welche die Stimulation des Rhodamin 123 Transports durch Hoechst 33342 im Sinne einer positiven Kooperativität zweier Bindungsstellen deuteten, wurde postuliert, dass QB102 und QB11 an die Hoechst-Bindungsstelle von ABCB1 binden. Diese These wurde durch die Tatsache unterstützt, dass der Transport von Substraten, die nach Shapiro und Ling eine Affinität zur Hoechst-Bindungsstelle besitzen (*Vinca*-Alkaloide, Hoechst 33342), gehemmt wurde [123].

Da im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion potentieller ABCB1-Aktivatoren mit unterschiedlichen Substraten charakterisiert werden sollte, wurde zunächst überprüft, ob – neben dem bereits in einer vorherigen Arbeit eingesetzten Daunorubicin [203] – auch Rhodamin 123



**Abbildung 5.2:** Intrazelluläre Akkumulation von Rhodamin 123 in A2780 (Reihe A), A2780 Adr (Reihe B) und A2780 Adr in Anwesenheit von 5  $\mu\text{mol/l}$  QB102 (Reihe C). Dargestellt sind jeweils die mit DAPI angefärbten Zellkerne (links, blau), das intrazellulär vorhandene Rhodamin 123 (Mitte, grün) sowie die Überlagerung beider Darstellungen (rechts).



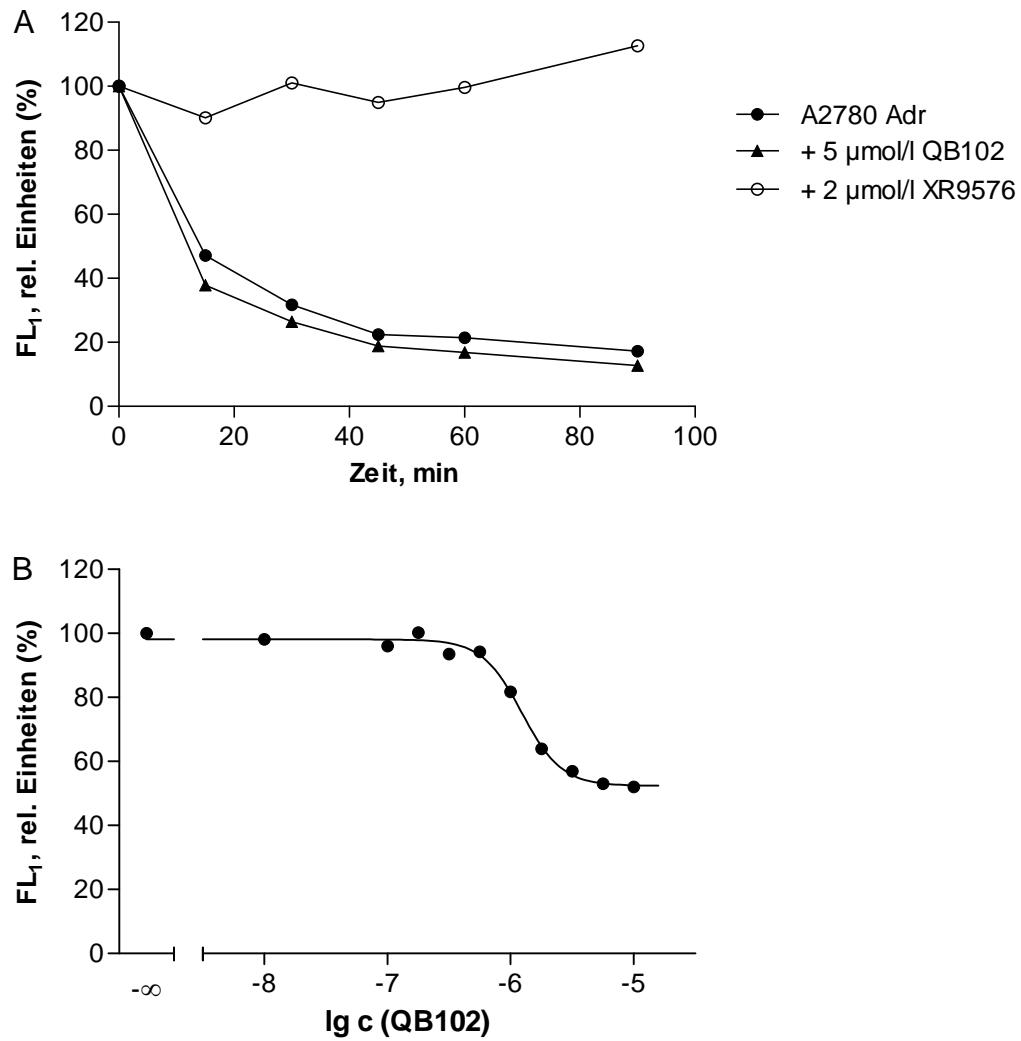
als Substrat zur Untersuchung der Aktivierung von ABCB1 geeignet ist. Des Weiteren soll im folgenden Abschnitt auf einige allgemeine Aspekte der Aktivierung von ABC-Transportern eingegangen werden.

In Abbildung 5.2 sind Präparate dargestellt, in denen das intrazellulär lokalisierte Rhodamin 123 fluoreszenzmikroskopisch visualisiert wurde. Es ist zu erkennen, dass in Übereinstimmung mit den in Kapitel 4.2 vorgestellten Ergebnissen, in A2780 Adr (Reihe B) eine geringere Menge des Farbstoffes (in grün dargestellt) detektiert werden kann, als in der korrespondierenden sensitiven Zelllinie A2780 (Reihe A). Durch Inkubation mit 5  $\mu\text{mol/l}$  QB102 kann die intrazellulär vorhandene Menge an Rhodamin 123 weiter verringert werden (Reihe C), was auf einen durch den Aktivator verstärkten Efflux des Substrates aus der Zelle hindeutet. Somit ist dieser Farbstoff grundsätzlich zur Untersuchung der Aktivierung von ABCB1 geeignet.

Um diese auch quantitativ charakterisieren zu können stehen grundsätzlich unterschiedliche Verfahrensweisen zur Verfügung. Neben dem in Kapitel 4.2 detailliert beschriebenen Akkumulationsassay kann zusätzlich eine direkte Messung des Rhodamin 123 Efflux (vgl. Kapitel 3.4.3) aus den entsprechenden Zellen erfolgen. Beide Methoden sollen nachfolgend hinsichtlich ihrer Eignung für die Untersuchung der Aktivierung von ABCB1 verglichen werden.

In Abbildung 5.3 A ist der Efflux von Rhodamin 123 aus A2780 Adr Zellen dargestellt. Dabei wurden die Zellen zunächst mit einem Überschuss des Farbstoffes (1  $\mu\text{mol/l}$ ) vorinkubiert und die Abnahme der zellulären Fluoreszenz nach dem Entfernen des Rhodamin 123 haltigen Überstandes über einen Zeitraum von 90 min mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es ist erkennbar, dass die Fluoreszenz in der ABCB1 exprimierenden Zelllinie näherungsweise exponentiell abnimmt. Wird der Transporter dagegen durch den Zusatz des Inhibitors XR9576 (2  $\mu\text{mol/l}$ ) vollständig gehemmt, bleibt die zelluläre Fluoreszenz in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Kondratov *et al.* über den gesamten Zeitraum konstant. Der Efflux von Rhodamin 123 aus der Zelle ist somit offenbar nicht durch passive Mechanismen sondern ausschließlich durch aktiven ABCB1 vermittelten Transport möglich. Dies könnte auf die bereits in Kapitel 4.2.1 erwähnten Effekte zurückzuführen sein. So kann die basische Substanz pH-Wert bedingt hauptsächlich in den Mitochondrien der Zelle akkumulieren und wird so dem Diffusionsgleichgewicht entzogen [149, 150].

Bei Zugabe einer definierten Konzentration QB102 (5  $\mu\text{mol/l}$ ) kann hingegen nur ein sehr geringer Effekt der Testsubstanz beobachtet werden, wobei der Transport von Rhodamin 123 aus der Zelle insbesondere im initialen Kurvenabschnitt leicht erhöht wird (vgl. Abbildung 5.3, A). Die Stimulation des Rhodamin 123 Efflux durch QB102 ist hier jedoch deutlich



**Abbildung 5.3:** Aktivierung des Rhodamin 123 Transports durch QB102. A: Efflux von Rhodamin 123 (1 µmol/l) aus A2780 Adr Zellen in An- und Abwesenheit von QB102 (5 µmol/l) oder XR9576 (2 µmol/l). B: Repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve von QB102 in A2780 Adr Zellen. Die Kurve wurde mittels Rhodamin 123-Akkumulationsassay generiert ( $pEC_{50} = 5,91$ ,  $n_H = -2,69$ ).

schwächer ausgeprägt, als bei Kondratov *et al.* beschrieben [123]. Ein Grund hierfür könnte die – verglichen mit der in der Literatur verwendeten Fibroblastenzelllinie Con A – sehr hohe ABCB1-Aktivität in den A2780 Adr Zellen sein. In dem hier dargestellten Experiment ist in der unbehandelten Kontrolle bereits nach 15 min eine Abnahme der Fluoreszenz um mehr als 50 % des Ausgangswertes zu beobachten. Die durch QB102 verursachte zusätzliche Stimulation des Transports ist dadurch weniger deutlich detektierbar, als dies im Falle einer niedrigen ABCB1-Aktivität bzw. Expression der Fall wäre.

Dagegen ist im Rhodamin 123-Akkumulationsassay in Anwesenheit von QB102 (siehe Abbildung 5.3, B) eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz auf etwa 50 % des Ausgangswertes zu beobachten, was auf eine Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports durch die Substanz schließen lässt. Der in diesem Beispiel erhaltene  $pEC_{50}$ -Wert von 5,91 liegt des Weiteren in der Größenordnung des zuvor im Daunorubicin-Akkumulationsassay ermittelten Wertes ( $pEC_{50} = 6,04$ ) [203, 213]. Somit ist der neu etablierte Rhodamin 123-Akkumulationsassay auch für die Detektion und Quantifizierung einer Aktivierung von ABCB1 gut geeignet. Des Weiteren bietet er – neben der eindeutigeren Detektierbarkeit der Aktivierung – gegenüber dem oben beschriebenen Effluxassay den Vorteil, dass durch die Fluoreszenzmessung im Steady-State ein einfaches und HTS-fähiges Verfahren zur Bestimmung von  $pEC_{50}$ -Werten zur Verfügung steht. Aus den genannten Gründen wurde diese Methode neben dem bereits zuvor verwendeten Daunorubicin-Akkumulationsassay für die Untersuchung potentieller neuer ABCB1-Aktivatoren ausgewählt.

Da in der Literatur neben den QB-Derivaten auch eine Reihe weiterer Substanzen als Aktivatoren von ABCB1 beschrieben sind, wurde auch eine Auswahl dieser Verbindungen hinsichtlich ihres Einflusses auf den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 und Daunorubicin untersucht. Die erhaltenen Testungsergebnisse sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Dabei wurden die Aktivitätsdaten des QB13 aus der Diplomarbeit von Antje de la Haye entnommen [214].

Neben QB102 weisen auch die ebenfalls bei Kondratov *et al.* [123] beschriebenen Substanzen QB11 und QB13 im Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay eine ABCB1 aktivierende Wirkung auf (vgl. Tabelle 5.1). Die  $pEC_{50}$ -Werte aller drei Verbindungen liegen dabei in der gleichen Größenordnung.

Anhand der in Abbildung 5.4 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurve des QB13 (Daunorubicin-Akkumulationsassay) wird ein weiterer typischer Aspekt der Aktivierung von ABCB1 deutlich: Neben der aktivierenden Wirkung führen höhere Konzentrationen des Modulators häufig zu einem Anstieg der zellulären Fluoreszenz, der als Inhibition des Transporters gedeutet werden kann.

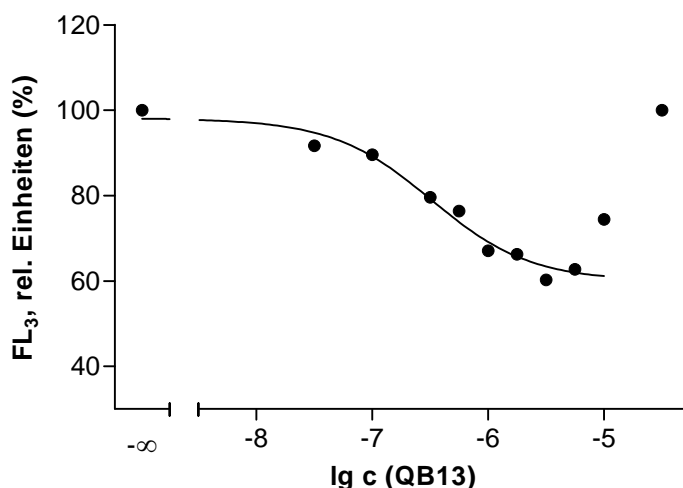
**Tabelle 5.1:** Funktionelle Untersuchung Literatur bekannter Aktivatoren von ABCB1. Die Substanzen wurden unter Verwendung der Zelllinie A2780Adr im Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay getestet. Die angegebenen  $pEC_{50}$ -Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n.b.: nicht bestimmt, k.E.: kein Effekt). Die Stärke der Aktivierung wurde aus den relativen Pumpgeschwindigkeiten in An- und Abwesenheit der Testsubstanz (siehe Kapitel 3.6.3) berechnet.

Substanz	$pEC_{50} \pm SD$ (DNR)	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)	Aktivierung (Rho 123)
QB102	$6,04 \pm 0,02$	$5,96 \pm 0,07$	$1,6-2,2 \times$
QB11	$6,09 \pm 0,13$	$6,02 \pm 0,15$	$1,3-1,6 \times$
QB13	$6,10 \pm 0,29$	n.b.	—
Hoechst 33342	n.b.	$5,42 \pm 0,22$	$3,7-5,2 \times$
Colchicin	$4,98 \pm 0,12$	$4,76 \pm 0,31$	$1,4-2,1 \times$
Quercetin	k.E.	$5,41 \pm 0,04$	$1,8 \times$
Prazosin	k.E.	k.E.	—
Progesteron	$5,14 \pm 0,34$	$5,76 \pm 0,13$	$1,6-2,8 \times$

Ein derartiger Effekt ist auch in der Literatur beschrieben. So konnten Lu *et al.* in ABCB1 enthaltenden Proteoliposomen eine Stimulation des Transports von Tetramethylrosamin durch bis zu  $50 \mu\text{mol/l}$  Colchicin zeigen. In Anwesenheit höherer Konzentrationen dieser Verbindung sank die Aktivität des ABCB1 wieder bis auf das basale Niveau ohne Colchicin ab [215].

Das Weiteren konnte dieses Verhalten auch im Falle des Transporters ABCC2 beobachtet werden, der unter anderem durch Indometacin aktiviert wird [216]. Hohe Konzentrationen des Modulators führten auch hier zu einer erneuten Abnahme der Transportaktivität, die jedoch nicht unter die basale Aktivität in Abwesenheit der Substanz sinkt. Diese Beobachtung wurde mit der Anwesenheit zweier unterschiedlicher Bindungsstellen am Protein erklärt. Bei niedrigen Konzentrationen des Modulators bindet die Substanz an eine regulatorische Bindungsstelle, wodurch die Bindung des Substrates erleichtert wird. In Anwesenheit hoher Modulatorkonzentrationen kommt es dagegen zusätzlich zur Besetzung der Substratbindungsstelle und damit zu einer kompetitiven Verdrängung des Substrates, wodurch dessen Transport gehemmt wird [216, 217].

Des Weiteren wird, in Übereinstimmung mit den von Shapiro und Ling an Plasmamembranvesikeln erhaltenen Ergebnissen [64], auch eine Stimulation des Rhodamin 123- und Daunorubicin-Transports durch Colchicin und Hoechst 33342 festgestellt. Die von den Autoren postulierte positive Kooperativität zwischen Hoechst- und Rhodamin-Bindungsstelle ist



**Abbildung 5.4:** Exemplarische Konzentrations-Effekt Kurve von QB13 erhalten im Daunorubicin-Akkumulationsassay unter Verwendung von A2780 Adr Zellen (nach [214]). Neben der Aktivierung von ABCB1 ( $pEC_{50} = 6,49$ ,  $n_H = -1,02$ ) ist bei höheren Konzentrationen des Modulators ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten.

somit im Falle dieser Substrate auch auf zellulärer Ebene detektierbar. Dabei kann jedoch für Hoechst 33342 im Daunorubicin-Akkumulationsassay kein aussagekräftiger  $pEC_{50}$ -Wert ermittelt werden, da es hier zu einer die Aktivierungskurve überlagernden Löschung der Daunorubicin-Fluoreszenz durch die Testsubstanz kommt (siehe dazu Kapitel 5.3.1.2).

Das Flavonoid Quercetin, welches ebenfalls an die Hoechst-Bindungsstelle binden soll, weist hingegen nur gegenüber Rhodamin 123 eine aktivierende Wirkung auf. Auch dies deckt sich grundsätzlich mit den Erkenntnissen von Shapiro und Ling [64]. Bezüglich des Einflusses von Quercetin auf den ABCB1 vermittelten Transport von Anthrazyklinderivaten sind unterschiedliche Beobachtungen publiziert: Critchfield *et al.* konnten unter Verwendung der humanen Colonkarzinomzelllinie HCT-15 eine Stimulation des Doxorubicin-Transports auf zellulärer Ebene feststellen [116]. Dabei wurde jedoch eine relativ hohe Konzentration des Flavonoids von  $100 \mu\text{mol/l}$  eingesetzt, die oberhalb des hier untersuchten Konzentrationsbereiches liegt. Weitere Quellen postulieren dagegen eine inhibitorische Wirkung des Flavonoids [218, 219].

Die beiden Substanzen Prazosin und Progesteron weisen laut Literatur einen von den zuvor beschriebenen Verbindungen verschiedenen Wirkmechanismus auf. Sie sollen den Transport durch Bindung an eine dritte Bindungsstelle des Transporters stimulieren [66]. Im Falle des Prazosin kann in der vorliegenden Arbeit jedoch keine aktivierende Wirkung festgestellt werden, während Progesteron den Transport beider Substrate steigert.

Insgesamt zeigt sich, dass die sonstigen untersuchten Substanzen erst in höheren Konzentrationen eine Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports bewirken als die QB-Derivate.

Diese stellen damit die bisher potentesten bekannten Aktivatoren von ABCB1 dar.

Hinsichtlich der aus den gemäß Kapitel 3.6.3 ermittelten relativen Pumpgeschwindigkeiten berechneten Stärke der Aktivierung von ABCB1 unterscheiden sich die verschiedenen Substanzen dagegen nur wenig (siehe Tabelle 5.1). So unterliegt diese zwar gewissen Schwankungen, im Falle von Rhodamin 123 wird jedoch in der Regel etwa eine Verdopplung des Transports beobachtet. Lediglich Hoechst 33342 führt zu einer etwas höheren durchschnittlichen Erhöhung auf das ca. Vierfache während QB11 insgesamt die geringste Steigerung des Transports induziert. Im Falle der auch gegenüber Daunorubicin aktiven Substanzen liegt diese ebenfalls in der gleichen Größenordnung wie bei Rhodamin 123, weshalb sie in Tabelle 5.1 nicht explizit aufgeführt wird.

Somit ist die Aktivierung von ABCB1 auf funktioneller Ebene zwar eher gering ausgeprägt, die hier getätigten Beobachtungen decken sich aber weitestgehend mit Angaben aus der Literatur. So wiesen Shapiro und Ling eine Steigerung des Rhodamin 123 Transports durch Hoechst 33342 um den Faktor 2-3 nach [64]. Auch andere Quellen erwähnen eine Stimulation des Transports unterschiedlicher Substrate in dieser Größenordnung:

- Prazosin und Progesteron steigern den Transport von Hoechst 33342 und Rhodamin 123 in Membranvesikeln aus CHO-Zellen um den Faktor 1,5-3. Cis-Flupentixol dagegen führt nur zu einer 1,2fachen Aktivierung des Hoechst 33342-Transports [66].
- Die Flavonoide Quercetin, Galangin und Kämpferol verdoppeln den Doxorubicin Transport in humanen Colonkarzinomzellen [116].
- (-)Epicatechin verringert die Konzentration von LDS-751 in Maus-Fibroblasten um 25 % [117].
- Der Transport von Colchicin in Plasmamembranvesikeln aus CHO-Zellen wird durch verschiedene kurzkettige Peptide um den Faktor 2-3 stimuliert [220].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gewählten Methoden (Daunorubicin- und Rhodamin 123-Akkumulationsassay) gut geeignet sind, um die allosterische Aktivierung des Transports von Substraten der sogenannten Rhodamin-Bindungsstelle von ABCB1 auf zellulärer Ebene nachzuweisen und zu quantifizieren. Dies konnte anhand einer Reihe literaturbekannter Substanzen nachgewiesen werden. Dabei ist die Aktivierung auf funktioneller Ebene eher gering ausgeprägt, wobei bei den meisten aktiven Verbindungen etwa eine Verdopplung der Transportgeschwindigkeit beobachtet werden kann. Unter den in der Literatur beschriebenen Aktivatoren stellen die QB-Verbindungen mit  $EC_{50}$ -Werten von etwa 1  $\mu\text{mol/l}$  die potentesten Substanzen dar.

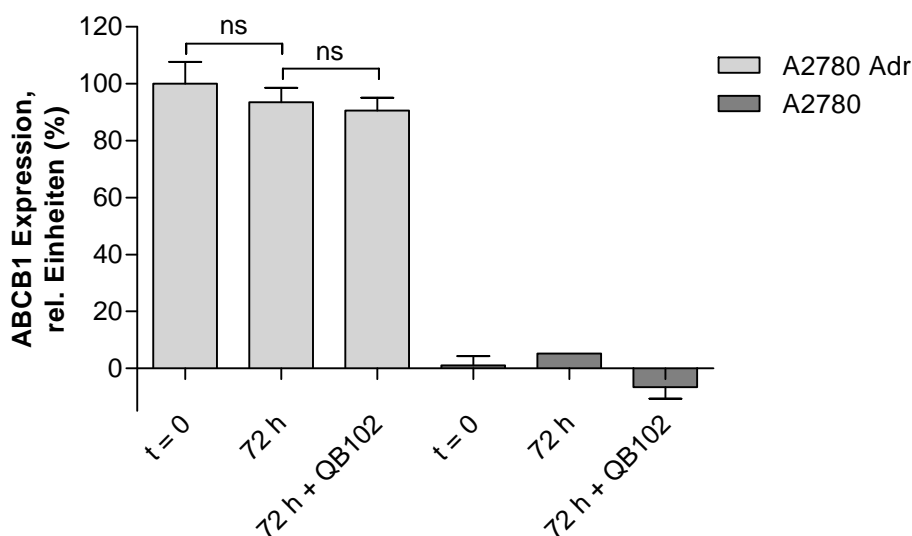
## 5.2 Einfluss von QB102 auf die ABCB1 Expression

Es ist denkbar, dass die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports nicht durch eine direkte Interaktion des Modulators mit dem Protein sondern durch unspezifische Mechanismen wie z.B. eine gesteigerte Expression des Transporters verursacht wird. So ist in der Literatur eine Reihe von Substanzen beschrieben, die über unterschiedliche Mechanismen zu einer Erhöhung der Expression von ABCB1 führen können (vgl. Tabelle 5.2). Diese Effekte traten in einigen Fällen bereits innerhalb weniger Stunden auf [129, 221] und wurden als ein initialer Schritt in einer allgemeinen Steigerung der Zelldifferenzierung postuliert. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob die durch QB102 verursachte Stimulation des Rhodamin 123 Efflux auf eine Erhöhung der ABCB1 Expression zurückzuführen sein kann.

**Tabelle 5.2:** Übersicht über Substanzen und postulierte Mechanismen, die eine Steigerung der ABCB1 Expression induzieren können (Auswahl).

Substanz	Mechanismus	Zeit	Referenz
Vincristin, Actinomycin D	Genamplifikation	mehrere Wochen	[222]
Flavonoide	Transkriptionssteigerung, reduzierte Proteindegradation	mehrere Wochen	[223]
Lapatinib	posttranskriptionaler Einfluss, gesteigerte Proteinbiosynthese	24–72 h	[224]
Vincristin, Colchicin	Transkriptionssteigerung	24 h	[225]
Ca-Antagonisten, Ciclosporin	posttranskriptionaler Einfluss, gesteigerte Zelldifferenzierung	> 8 h	[221]
Natriumbutyrat	diverse Mechanismen, Steigerung der Zelldifferenzierung	> 2 h	[129, 226]
zellulärer Stress	u.a. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	k.A.	[227]

In einem ersten Schritt wurden hierzu jeweils 500 000 Zellen der beiden Zelllinien A2780 und A2780 Adr in Gewebekulturflaschen (T25) ausgesät. Diese wurden anschließend für 72 h in An- und Abwesenheit von QB102 kultiviert, wobei die Expression von ABCB1 zu Beginn und Ende der Inkubationszeit mit Hilfe des FITC-markierten Antikörpers 17F9 quantifiziert wurde (vgl. Kapitel 3.3.5). Die eingesetzte Konzentration des QB102 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) wurde so gewählt, dass sie im Rhodamin 123-Akkumulationsassay zu einer deutlichen Stimulation des Transports führt, ohne eine relevante Toxizität aufzuweisen (vgl. Kapitel 7.1). Die Inkubationszeit von 72 h wurde aufgrund der Tatsache, dass die in der Literatur erwähnten schnell



**Abbildung 5.5:** Einfluss von QB102 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Expression von ABCB1 in A2780 und A2780 Adr. Die ABCB1 Expression wurde vor und nach 72-stündiger Kultivierung der Zellen in An- und Abwesenheit der Testsubstanz mit Hilfe des FITC-markierten Antikörpers 17F9 ermittelt (ns nicht signifikant, zweiseitiger t-Test). Die Kontrollproben wurden mit dem entsprechenden Lösemittel behandelt.

eintretenden Effekte in der Regel auch über diesen Zeitraum bestehen blieben, festgelegt [129, 221]. Damit sollte es nach 72 h möglich sein, sowohl die schnell eintretenden als auch mittelfristige Effekte zu detektieren.

Der Abbildung 5.5 ist zu entnehmen, dass in keiner der betrachteten Zelllinien nach 72-stündiger Inkubation mit QB102 eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikante Veränderung der ABCB1 Expression zu verzeichnen ist. Aus dieser Beobachtung lässt sich der Schluss ziehen, dass QB102 auch innerhalb der Inkubationszeit des Rhodamin 123-Akkumulationsassays zu keiner relevanten Steigerung der Expression von ABCB1 führt. Der verstärkte Auswärtstransport des Substrates ist folglich ausschließlich auf die direkte Aktivierung des Transporters zurückzuführen.

Da verschiedene Substanzen – in der Regel Substrate von ABCB1 – erst bei längerfristiger Behandlung von Zellen mit diesen eine Erhöhung bzw. Induktion der ABCB1-Expression herbeiführen können, sollte zusätzlich untersucht werden, ob dies auch auf QB102 zutrifft [125, 222, 223, 228]. Dabei wurden sowohl die humanen Zelllinien A2780 und A2780 Adr als auch die transfizierten CHO-Zelllinien CHO-K1 pcDNA und CHO-K1 M403 betrachtet, um den Effekt der Verbindung sowohl auf das durch Zytostatikaselektion hochregulierte als auch das durch Transfektion „künstlich“ eingebrachte humane Protein untersuchen zu können. Neben QB102 wurde hier auch Quercetin, ein Flavonoid, dem ebenfalls ein Einfluss auf die Expression des Transporters zugesprochen wird, untersucht. Die eingesetzte Konzentration



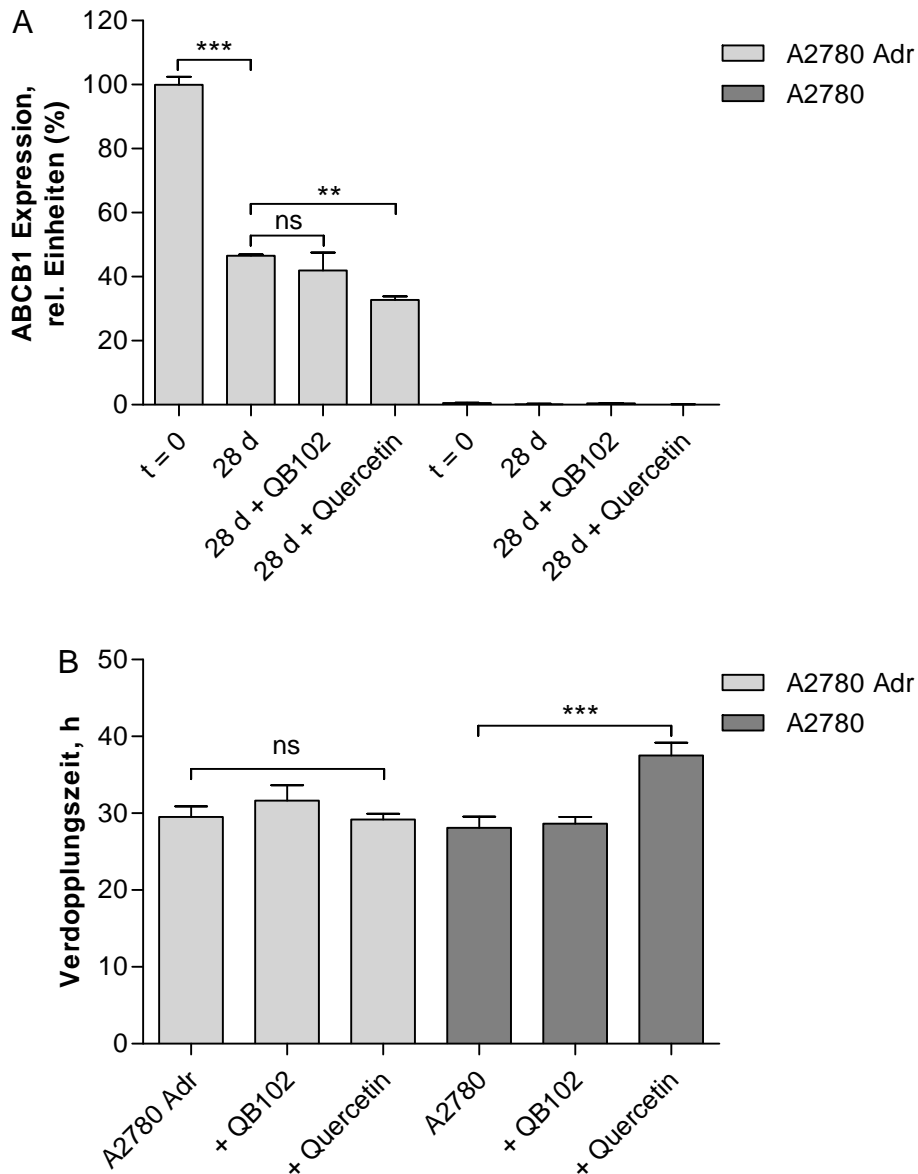
der Testsubstanzen von 10  $\mu\text{mol/l}$  wurde dabei in Anlehnung an die Literatur ausgewählt [223].

Die Versuchsdurchführung erfolgte grundsätzlich analog der zuvor beschriebenen Vorgehensweise, wobei die Zellen jedoch für vier Wochen (28 Tage) in Anwesenheit der Testsubstanzen kultiviert wurden. Dabei wurden sie jeweils, wenn eine maximal 80 %ige Konfluenz erreicht war, subkultiviert und wieder eine definierte Zellzahl (1 Mio bei A2780 bzw. 500 000 für CHO-K1 pro T75 Gewebekulturflasche) ausgesät. So sollte gewährleistet werden, dass sich die Zellen möglichst dauerhaft in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden und negative Effekte aufgrund von Nährstoffmangel minimiert wurden. Um einen möglichen Einfluss der Testsubstanzen auf das Zellwachstum erkennen zu können, wurde für jede Passage die mittlere Populationsverdopplungszeit berechnet.

Die Bestimmung der ABCB1 Expression in A2780 und A2780 ADR zu Beginn und Ende der Kulturdauer lieferte die in Abbildung 5.6, A dargestellten Ergebnisse. In der sensitiven Zelllinie A2780 ist erwartungsgemäß weder zu Beginn noch am Ende der Kulturdauer ABCB1 detektierbar. Im Falle der Zelllinie A2780 ADR fällt auf, dass nach vierwöchiger Kultivierung in der unbehandelten Kontrolle eine deutliche Abnahme des zellulären ABCB1 zu beobachten ist. Dies ist vermutlich auf den mangelnden Selektionsdruck in der zytostatikafreien Kultur zurückzuführen (siehe auch Kapitel 4.1.2.1).

Im Falle der mit QB102 behandelten Zellen ist auch nach vierwöchiger Kultur weder in A2780 ADR noch in A2780 eine gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikante Veränderung der ABCB1 Expression zu beobachten. Somit kann die Substanz weder bei kurzfristiger (72 h) noch bei längerer Inkubation (28 d) zur Steigerung oder Induktion einer ABCB1 Expression führen.

Des Weiteren kann kein Einfluss von QB102 auf das Proliferationsverhalten der Zellen festgestellt werden, da sowohl in A2780 als auch in A2780 ADR die Verdopplungszeiten in An- und Abwesenheit der Substanz nicht signifikant unterschiedlich sind (vgl. Abbildung 5.6, B). Aufgrund der geringen Toxizität der Verbindung war dieses Ergebnis zu erwarten (vgl. Kapitel 7.1). Insgesamt fällt jedoch auf, dass die ermittelten Verdopplungszeiten mit ca. 30 h insgesamt höher sind, als die in Kapitel 4.1.1.1 bestimmten. Zusätzlich weisen beide Zelllinien im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen keine signifikant unterschiedlichen durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeiten auf ( $t_2(\text{A2780 ADR}) = 29,5 \pm 1,36 \text{ h}$ ;  $t_2(\text{A2780}) = 28,1 \pm 1,48 \text{ h}$ ). Diese Differenzen können auf Unterschiede in den Kulturbedingungen zurückzuführen sein. Hier spielen beispielsweise neben zufälligen Schwankungen auch die initial ausgesäte Zelldichte sowie die Passage der Zellen eine Rolle. So wäre beispielsweise bei einer geringen initialen Zelldichte eine verlängerte lag-Phase zu Beginn der Kultivierung denkbar. Des Weiteren kann es bei höheren Zelldichten aufgrund von Nährstoffmangel zu



**Abbildung 5.6:** Einfluss von QB102 und Quercetin auf die ABCB1 Expression und das Wachstumsverhalten der Zelllinien A2780 und A2780 Adr. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 28 Tagen in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen (10  $\mu\text{mol/l}$ ) kultiviert. A: Bestimmung der Expression von ABCB1 mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper 17F9 (Mittelwert  $\pm$  SD dreier Proben). B: Mittlere Populationsverdopplungszeit der Zelllinien über die Kulturdauer (Mittelwert  $\pm$  SD aller Passagen). Zweiseitiger t-Test, ns nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

einem verlangsamten Wachstum und damit zu einer Abweichung vom exponentiellen Verlauf kommen. Welche der genannten Effekte in diesem Fall eine Rolle spielen, kann anhand der erhobenen Daten jedoch nicht bestimmt werden. Hierzu wäre die Aufnahme einer vollständigen Wachstumskinetik notwendig. Da jedoch alle untersuchten Proben identisch behandelt wurden, können aus dem Vergleich mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle dennoch Rückschlüsse auf den Einfluss der Testsubstanzen auf das Proliferationsverhalten der Zellen gezogen werden.

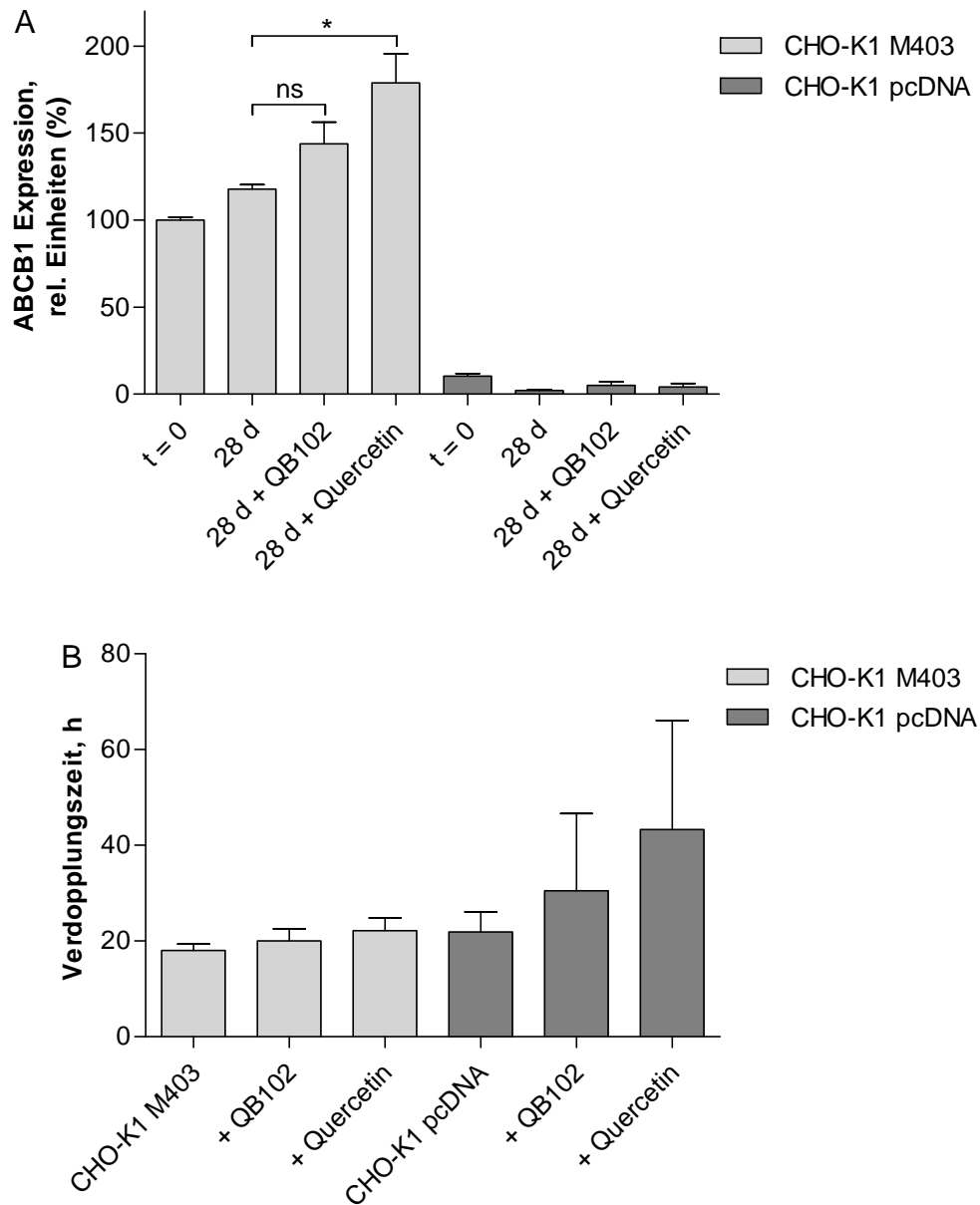
Im Gegensatz zu QB102 führt die Behandlung mit Quercetin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) zu einer signifikanten Reduktion der ABCB1 Expression in der resistenten Zelllinie A2780 Adr (vgl. Abbildung 5.6, A). In der sensitiven Zelllinie ist kein Effekt der Substanz zu beobachten.

Bezüglich des Effektes von Quercetin auf die Expression von ABCB1 sind in der Literatur unterschiedliche Angaben zu finden. So wird neben der in Tabelle 5.2 erwähnten Expressionssteigerung auch eine Reduktion der ABCB1 Expression durch mikromolare Konzentrationen Quercetin sowie eine Reihe weiterer Flavonoide beschrieben [219, 229, 230]. Hierbei konnte die Abnahme sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, wobei der zugrunde liegende Mechanismus jedoch nicht eindeutig aufgeklärt werden konnte.

Des Weiteren weisen die mit Quercetin behandelten A2780 Zellen zusätzlich eine gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant erhöhte durchschnittliche Populationsverdopplungszeit von 37,5 h auf (vgl. Abbildung 5.6, B), was vermutlich auf eine gewisse Toxizität der Substanz zurückzuführen ist. So konnten Duthie *et al.* nachweisen, dass Quercetin – wie auch einige andere Flavonoide – neben einer Vielzahl weiterer physiologischer Effekte auch zytotoxische und mutagene Eigenschaften besitzt, die auf dessen Fähigkeit DNA-Strangbrüche zu induzieren, beruhen [231, 232]. In der resistenten Zelllinie A2780 Adr ist dagegen kein derartiger Effekt zu beobachten. Flavonoide werden in der Regel nicht als Substrate von ABCB1 angesehen [28], es ist jedoch denkbar, dass durch die Selektion resistenter Zellen mit Doxorubicin im Rahmen der Etablierung dieser Zelllinie neben der Expression von ABCB1 auch weitere Mechanismen induziert werden, die zu einer reduzierten Toxizität von Quercetin in dieser Zelllinie führen.

In Analogie zu den zuvor beschriebenen Experimenten an A2780 und A2780 Adr wurde zusätzlich der Einfluss von QB102 und Quercetin auf den Expressionsstatus des durch Transfektion in die Zelllinie CHO-K1 eingebrachten humanen ABCB1 untersucht. Hierbei wurden sämtliche Zelllinien in Nährmedium ohne Zusatz von G418 kultiviert, um einen möglichen Einfluss des Selektionsantibiotikums ausschließen zu können. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5.7 dargestellt.

Erwartungsgemäß kann im Falle der Zelllinie CHO-K1 pcDNA in keiner der Proben das humane Protein detektiert werden (vgl. Abbildung 5.7, A), während in der mit humaner



**Abbildung 5.7:** Einfluss von QB102 und Quercetin auf die ABCB1 Expression und das Wachstumsverhalten der Zelllinien CHO-K1 pcDNA und CHO-K1 M403. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 28 Tagen in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen (10  $\mu\text{mol/l}$ ) kultiviert. A: Bestimmung der Expression von ABCB1 mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper 17F9 (Mittelwert  $\pm$  SD dreier Proben). B: Mittlere Populationsverdopplungszeit der Zelllinien über die Kulturdauer (Mittelwert  $\pm$  SD aller Passagen). Zweiseitiger t-Test, ns nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

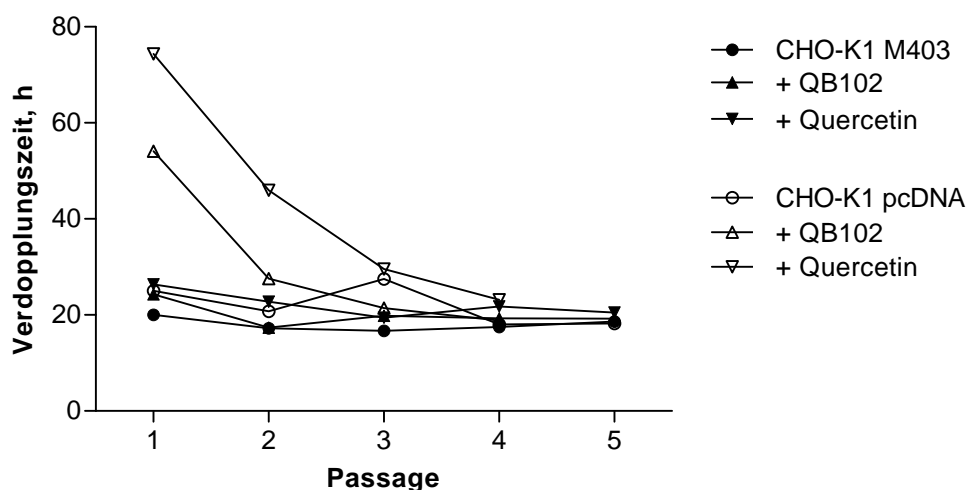
ABCB1 cDNA transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403 eine signifikante Menge des entsprechenden Transporters vorhanden ist. Diese bleibt im Gegensatz zur selektionierten Zelllinie A2780 Adr in der unbehandelten Kontrolle – auch ohne Einsatz eines Selektionsantibiotikums – über die gesamte Versuchsdauer weitgehend konstant.

In den mit QB102 behandelten CHO-K1 M403 Zellen ist nach vierwöchiger Kultur zwar eine leichte Zunahme der ABCB1 Expression zu beobachten, diese ist jedoch nicht signifikant. Dagegen wird die Expression des humanen Proteins durch Inkubation mit Quercetin verglichen mit der unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht (vgl. Abbildung 5.7, A).

Diese Beobachtung steht im Kontrast zu den zuvor an der Zelllinie A2780 Adr erhaltenen Ergebnissen. Es konnten jedoch bereits in einer vorausgehenden Arbeit diesbezügliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden [126]. So konnte durch die Behandlung mit dem differenzierenden Agens Natriumbutyrat die Expression des humanen Transporters in CHO-K1 M403 signifikant gesteigert werden, während in A2780 Adr keine eindeutige Zunahme der ABCB1 Expression zu detektieren war. Auch in der Literatur ist eine Abhängigkeit der Wirkung expressionssteigernder Substanzen von der betrachteten Zelllinie beschrieben: Herzog *et al.* untersuchten den Einfluss von Ca-Antagonisten auf die ABCB1 Expression in unterschiedlichen Karzinomzelllinien (Colon, Niere, Neuroblastom), wobei nur in einem Teil der untersuchten Zelllinien eine Steigerung der Expression des Transporters detektiert werden konnte. Des Weiteren sind, wie bereits zuvor erwähnt, insbesondere im Falle von Quercetin neben den zuvor dargestellten Studien, in denen eine Abnahme der ABCB1 Expression beobachtet wurde, auch solche publiziert, die von einer Expressionssteigerung berichten [219, 223, 229, 230].

Ein Einfluss der Testsubstanzen auf das Wachstumsverhalten Zelllinie CHO-K1 M403 ist in Analogie zu den an A2780 Adr erhaltenen Ergebnissen nicht zu beobachten (vgl. Abbildung 5.7, B). Dagegen wird das Wachstum der mit dem Leervektor transfizierten Zellen sowohl durch QB102 als auch Quercetin deutlich verlangsamt. Die mittlere Populationsverdopplungszeit scheint sich dabei von ca. 20 h auf über 40 h in Anwesenheit des Flavonoids zu erhöhen. Im Falle von QB102 ist der Effekt vermutlich aufgrund der geringen Toxizität der Substanz schwächer ausgeprägt. Insgesamt fällt jedoch in beiden Fällen die starke Streuung der über die gesamte Kulturdauer berechneten Mittelwerte auf.

Aus diesem Grund wurde die zeitliche Entwicklung der für jede einzelne Subkultivierung innerhalb der vierwöchigen Kulturdauer berechneten Verdopplungszeit betrachtet. Es zeigt sich, dass diese im Falle der unbehandelten CHO-K1 pcDNA Zellen über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant bei einem Wert von etwa 20 h liegt (vgl. Abbildung 5.8). In Anwesenheit der Testsubstanzen ist die Verdopplungszeit – insbesondere im Falle von Quercetin – zu Beginn der Kultur jedoch stark erhöht, wobei diese sich nach einigen Passagen



**Abbildung 5.8:** Populationsverdopplungszeit von CHO-K1 pcDNA und CHO-K1 M403 in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Anzahl der Subkultivierungen / Passagen) in An- Abwesenheit von QB102 und Quercetin (10  $\mu$ mol/l).

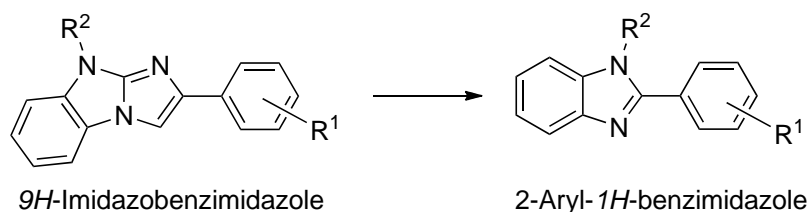
der der unbehandelten Kontrolle annähert. Offensichtlich weisen die CHO-K1 Zellen verglichen mit A2780 eine erhöhte Sensitivität gegenüber den eingesetzten Testsubstanzen auf. Sie sind jedoch in der Lage sich nach einiger Zeit an die veränderten Kulturbedingungen in Anwesenheit einer potentiell toxischen Verbindung anzupassen. Bedenkt man den unterschiedlichen Einfluss der Testsubstanzen auf CHO-K1 M403 und CHO-K1 pcDNA, erscheint beispielsweise eine Steigerung der (endogenen) Expression von ABCB1 als möglicher „Resistenzmechanismus“ nicht unwahrscheinlich, obwohl Quercetin laut Literatur kein Substrat dieses Transporters darstellen soll [28]. Vor dem Hintergrund der bekannten Zytotoxizität und Mutagenität des Quercetin [231] sind jedoch auch weitere Adaptionsmechanismen wie z.B. eine gesteigerte DNA-Reparatur denkbar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass QB102 weder bei kurzfristiger (72 h) noch bei längerer Inkubation (28 d) eine Erhöhung der ABCB1 Expression in den verwendeten resistenten Zelllinien A2780 Adr und CHO-K1 M403 induzieren kann. Somit ist davon auszugehen, dass die Steigerung des ABCB1 vermittelten Transports von Rhodamin 123 auf die direkte Aktivierung des Transporters zurückzuführen ist. Zusätzlich unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass der Efflux von Rhodamin 123 aus ABCB1 exprimierenden A2780 Adr Zellen durch QB102 bereits innerhalb von 15 min geringfügig gesteigert werden kann (vgl. Abbildung 5.3, A). Innerhalb dieser kurzen Zeit ist ein Einfluss auf die Proteinexpression auszuschließen. Dagegen besitzt das in den hier durchgeführten Versuchen als Vergleichssubstanz eingesetzte Quercetin in den verschiedenen Zellen unterschiedliche Effekte auf den ABCB1 Expressionsstatus sowie das Wachstumsverhalten der Zellen.

## 5.3 Untersuchung von Benzimidazolen mittels funktioneller Assays

### 5.3.1 Untersuchungen an ABCB1

Die nachfolgend betrachteten Substanzen stellen hauptsächlich Derivate des ABCB1-Aktivatoren QB11 dar, die von Dr. Lars Möllmann im Rahmen seiner Diplom- und Promotionsarbeit synthetisiert wurden [213, 233, 234]. Ausgehend von QB11 wurden hier zunächst die Substituenten am Phenylrest ( $R^1$ ) und an  $N^9$  ( $R^2$ ) variiert. In einem zweiten Schritt wurde die Grundstruktur weiter reduziert, wodurch die 2-Aryl-1*H*-benzimidazole erhalten wurden. So sollten die für eine Aktivierung von ABCB1 essentiellen Strukturmerkmale bestimmt werden (vgl. Abbildung 5.9). Sämtliche Verbindungen wurden sowohl im Daunorubicin- als auch im Rhodamin 123-Akkumulationsassay hinsichtlich ihrer ABCB1 modulierenden Eigenschaften untersucht.



**Abbildung 5.9:** Grundstruktur der untersuchten Benzimidazol-Derivate. Neben den an  $R^1$  und  $R^2$  unterschiedlich substituierten 9*H*-Imidazobenzimidazolen (links) wurden auch 2-Aryl-1*H*-benzimidazole (rechts), in denen die Grundstruktur weiter reduziert wurde, untersucht.

#### 5.3.1.1 Thiazole und $N^9$ -methylierte 9*H*-Imidazobenzimidazole

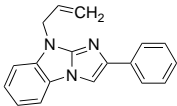
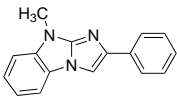
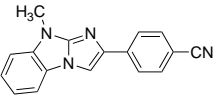
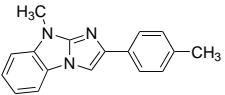
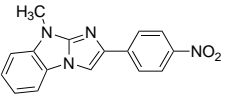
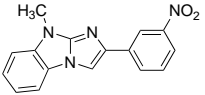
Eine erste Serie von Verbindungen umfasste Derivate des QB102 sowie von QB11 abgeleitete  $N^9$ -methylierte 9*H*-Imidazobenzimidazole, in denen jeweils die Substitution des Phenylrestes variiert wurde. Die Thiazole und einige der Imidazole wurden bereits in einer vorherigen Arbeit mit Hilfe des Daunorubicin-Akkumulationsassays hinsichtlich ihrer ABCB1 modulierenden Eigenschaften untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität durch die Anwesenheit elektronenziehender Substituenten am Phenylrest des QB102 und der  $N^9$ -methylierten Benzimidazole deutlich gesteigert wird [203]. Diese Beobachtung sollte nun anhand einer größeren Anzahl von Verbindungen verifiziert werden. Die entsprechenden Testungsergebnisse sind in den Tabellen 5.3 und 5.4 aufgeführt. Dabei weisen alle Substanzen dieser Serie aktivierende Eigenschaften gegenüber ABCB1 auf.

Bei Betrachtung der im Daunorubicin-Akkumulationsassay ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte wird zunächst deutlich, dass der alleinige Austausch des Allylrestes in Position 9 der Ausgangsverbindung QB11 ( $pEC_{50} = 6,09$ ) gegen eine Methylgruppe in LM-8.0 ( $pEC_{50} = 5,95$ ) keinen

Einfluss auf die biologische Aktivität der Substanz besitzt. Auch die Erweiterung des Phenylrestes zum Naphthyl-Ringsystem in LM-8.10 ( $pEC_{50} = 5,87$ ) führt verglichen mit LM-8.0 zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität.

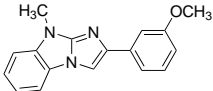
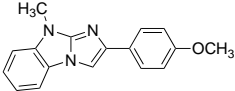
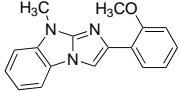
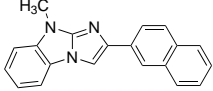
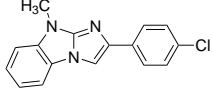
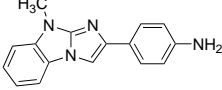
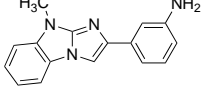
Dagegen kann die Aktivität der N<sup>9</sup>-methylierten Benzimidazole durch das Einbringen elektronenziehender Cyano- und Nitrogruppen in Position 3 und 4 des Phenylrestes (LM-8.1, LM-8.3 und LM-8.4) deutlich erhöht werden. Die Nitroverbindung LM-8.4 ist dabei mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,65 etwa fünffach aktiver als LM-8.0 und stellt damit die potenteste Substanz innerhalb dieser Gruppe dar. Des Weiteren weist auch die chlorierte Verbindung LM-8.11 ( $pEC_{50} = 6,26$ ) eine höhere Aktivität auf, als die Ausgangsverbindung. Die übrigen unterschiedlich substituierten Imidazole besitzen dagegen Aktivitätswerte im Bereich der Bezugsubstanzen LM-8.0 und QB11 auf (vgl. Tabelle 5.3).

**Tabelle 5.3:** Untersuchung der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften von methylierten Benzimidazolen mittels Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay an A2780 Adr Zellen. Aufgeführt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte. Die mit \* gekennzeichneten Substanzen wurden bereits in [203] charakterisiert (Daunorubicin-Akkumulationsassay).

Substanz	Struktur	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)	$pEC_{50} \pm SD$ (DNR)
QB11		$6,02 \pm 0,15$	$6,09 \pm 0,13$
LM-8.0		$5,85 \pm 0,13$	$5,95 \pm 0,11$
LM-8.1*		$5,96 \pm 0,11$	$6,42 \pm 0,16$
LM-8.2*		$6,01 \pm 0,12$	$5,92 \pm 0,09$
LM-8.3		$6,57 \pm 0,04$	$6,47 \pm 0,08$
LM-8.4		$6,52 \pm 0,11$	$6,65 \pm 0,03$

Fortsetzung auf der nächsten Seite



Substanz	Struktur	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pEC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
LM-8.5*		6,20 ± 0,07	5,90 ± 0,07
LM-8.6*		6,02 ± 0,15	5,82 ± 0,13
LM-8.7		6,26 ± 0,12	5,86 ± 0,10
LM-8.10		6,34 ± 0,07	5,87 ± 0,09
LM-8.11		6,22 ± 0,05	6,26 ± 0,07
LM-8.12		6,15 ± 0,11	5,93 ± 0,03
LM-8.13		6,18 ± 0,02	6,04 ± 0,11

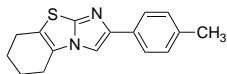
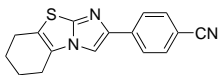
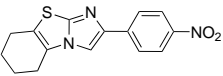
Im Falle der Methoxy- und Nitroderivate wurde zusätzlich die Position des Substituenten variiert. Hier zeigt sich, dass die Substitution an C<sup>3</sup> des Phenylrestes zu einer geringfügig höheren Aktivität führt, als die an C<sup>4</sup>. So ist LM-8.4 im Daunorubicin-Akkumulationsassay signifikant aktiver als LM-8.3. Im Falle der Methoxyverbindungen LM-8.5 und LM-8.6 ist diese Tendenz ebenfalls erkennbar, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt.

Eine ähnliche Tendenz kann auch in der kleineren Gruppe der von QB102 abgeleiteten Thiazole festgestellt werden (vgl. Tabelle 5.4). Hier weisen die Cyano- und Nitroverbindungen LM-7.1 und LM-7.3 ebenfalls eine gegenüber der Ausgangssubstanz um den Faktor 4-8 erhöhte Aktivität auf.

Die Abhängigkeit der ABCB1 modulierenden Aktivität von den elektronischen Eigenschaften des Substituenten am Phenylrest wurde bereits in einer vorherigen Arbeit postuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die im Daunorubicin-Akkumulationsassay erhaltenen pEC<sub>50</sub>-Werte einer kleinen Auswahl von Verbindungen gut mit der Hammett-Konstante ( $\sigma$ ) des

Substituenten korreliert [203].

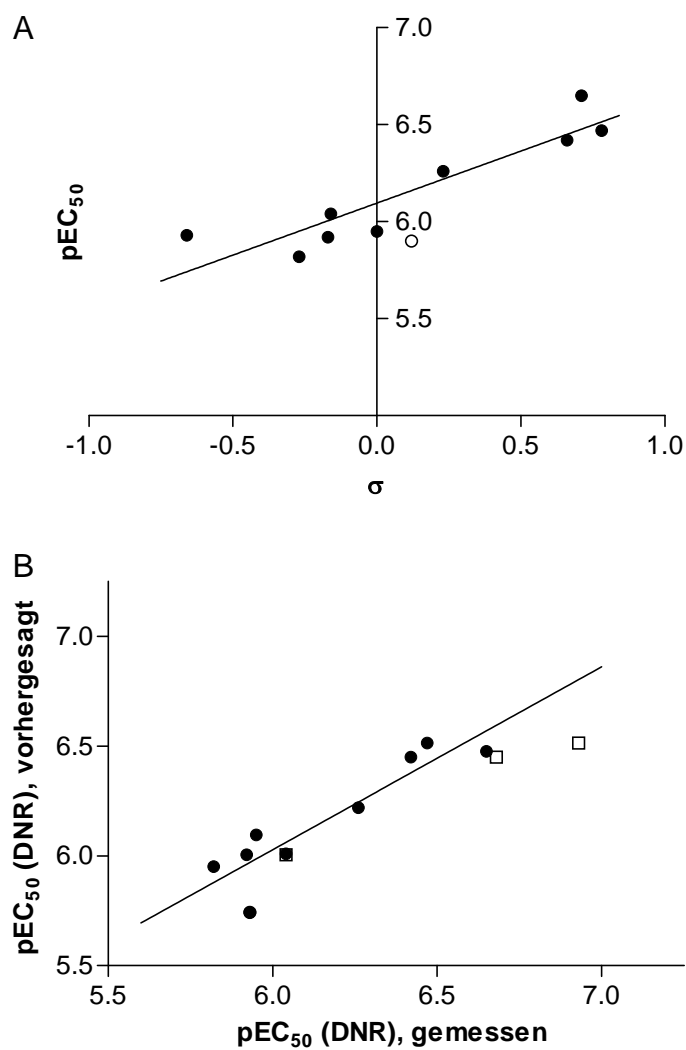
**Tabelle 5.4:** Untersuchung der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften von Thiazolen mittels Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay an A2780 Adr Zellen. Aufgeführt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte.

Substanz	Struktur	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)	$pEC_{50} \pm SD$ (DNR)
QB102		$5,96 \pm 0,07$	$6,04 \pm 0,02$
LM-7.1		$5,80 \pm 0,04$	$6,68 \pm 0,12$
LM-7.3		$5,87 \pm 0,04$	$6,93 \pm 0,00$

Auch innerhalb der hier untersuchten erweiterten Gruppe der an C<sup>3</sup> und C<sup>4</sup> substituierten N<sup>9</sup>-methylierten 9H-Imidazobenzimidazole kann eine signifikante Korrelation der Aktivitätsdaten mit  $\sigma$ -Hammett festgestellt werden (vgl. Abbildung 5.10, A,  $r^2 = 0,83$ ), wobei die Verbindung LM-8.5 von dieser Korrelation (offener Kreis) ausgeschlossen wurde. Die Änderung des  $pEC_{50}$ -Wertes kann dabei durch die folgende Geradengleichung beschrieben werden:

$$pEC_{50} = (0,53 \pm 0,09) \cdot \sigma + (6,10 \pm 0,04) \quad (5.1)$$

Die für die Benzimidazole mit Hilfe von Gleichung 5.1 vorhergesagten  $pEC_{50}$ -Werte stimmen ebenfalls gut mit den experimentell ermittelten überein (vgl. Abbildung 5.10, B,  $r^2 = 0,83$ ). Aufgrund des sehr ähnlichen Verhaltens der beiden Substanzgruppen (Daunorubicin-Akkumulationsassay) kann auch die Aktivität der Thiazole unter Verwendung von Gleichung 5.1 relativ gut vorhergesagt werden (Abbildung 5.10, B, Quadrate). Im Falle der beiden sehr aktiven Verbindungen LM-7.1 und LM-7.3 liegen die berechneten  $pEC_{50}$ -Werte dennoch etwas unterhalb der gemessenen. Offenbar führt das Thiazol-Grundgerüst dieser Substanzklasse zu einer verglichen mit den entsprechenden Imidazolen leicht erhöhten Aktivität. Diese Differenz konnte jedoch bereits in der vorausgehenden Arbeit als nicht signifikant identifiziert werden [203]. Bei Einbeziehung beider Verbindungsklassen verringert sich das Bestimmtheitsmaß auf einen Wert von 0,82, was für ein ähnlich aussagekräftiges Modell spricht.



**Abbildung 5.10:** Struktur-Wirkungs-Beziehungen der N<sup>9</sup>-methylierten 9H-Imidazobenzimidazole. A: Korrelation der pEC<sub>50</sub>-Werte im Daunorubicin-Akkumulationsassay mit der Hammett-Konstante  $\sigma$  der Substituenten an C<sup>3</sup> oder C<sup>4</sup> ( $r^2 = 0,83$ ). B: Korrelation der mit Hilfe von Gleichung 5.1 vorhergesagten pEC<sub>50</sub>-Werte der Benzimidazole mit den im Daunorubicin-Akkumulationsassay ermittelten ( $r^2 = 0,83$ ). Unter Berücksichtigung der Thiazole (offene Quadrate) ergibt sich  $r^2 = 0,82$ .

Vergleicht man die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay erhaltenen Ergebnisse mit denen des Daunorubicin-Akkumulationsassays, wird deutlich, dass hier keine Korrelation der Aktivitätsdaten unterschiedlicher funktioneller Testsysteme festgestellt werden kann. Die pEC<sub>50</sub>-Werte der meisten Substanzen liegen für die unterschiedlichen Substrate zwar in der gleichen Größenordnung, eine direkte Korrelation der Aktivitätsdaten ist aber aufgrund des engen Aktivitätsintervalls von nur einer Zehnerpotenz wenig aussagekräftig (vgl. Tabellen 5.3 und 5.4). Es fällt jedoch auf, dass insbesondere die hoch potenten Substanzen LM-7.1, LM-7.3 und LM-8.3 sich durch eine erstaunlich geringe Aktivität im Rhodamin 123-Akkumulationsassay auszeichnen, obwohl die Substrate Daunorubicin und Rhodamin 123 beide an die sogenannte Rhodamin-Bindungsstelle des Transporters binden sollen [64].

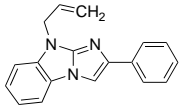
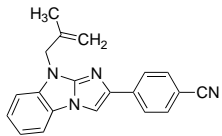
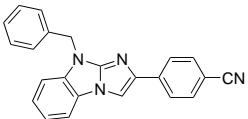
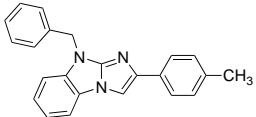
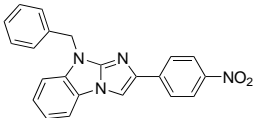
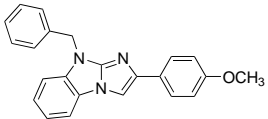
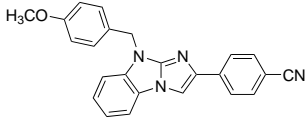
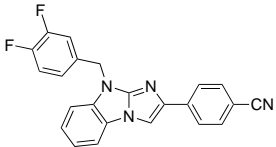
Damit können im Falle der untersuchten Aktivatoren – im Gegensatz zu den in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Hemmstoffen – die Ergebnisse unterschiedlicher funktioneller Assays nicht unmittelbar miteinander verglichen werden. Interpretiert man die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports im Sinne einer positiven Kooperativität zweier Bindungsstellen, erscheint das Vorliegen deutlich komplexerer Zusammenhänge, als dies im Falle einer einfachen Inhibition der Fall ist, plausibel. Aufgrund der strukturellen Unterschiede von Daunorubicin und Rhodamin 123 ist des Weiteren davon auszugehen, dass beide Substrate nicht in exakt identischer Weise an das Protein binden. Die von Shapiro und Ling postulierte Rhodamin-Bindungsstelle von ABCB1 kann daher als eine bevorzugte Bindungsregion innerhalb der durch die TMDs gebildeten Kavität des Proteins interpretiert werden [50, 64, 235].

### 5.3.1.2 9H-Imidazobenzimidazole mit variiertem N<sup>9</sup>-Substituenten

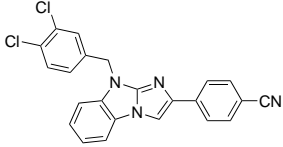
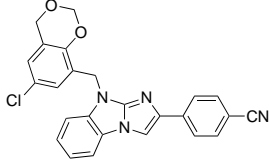
Eine zweite Gruppe von 9H-Imidazobenzimidazolen leitete sich strukturell von LM-8.1 ab und umfasste solche Derivate, in denen die Methylgruppe in Position 9 durch unterschiedliche aromatische und aliphatische Reste ersetzt worden war [213, 234]. Die für diese Substanzen im Daunorubicin- und Rhodamin 123-Akkumulationsassay erhaltenen Aktivitätsdaten sind in den Tabellen 5.5 und 5.6 aufgeführt.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen N<sup>9</sup>-methylierten Substanzen kann in dieser Reihe kein signifikanter Einfluss des Substituenten am Phenylrest festgestellt werden. So besitzt die Cyano-Verbindung LM-25.1 in keinem der beiden Testsysteme eine von QB11 abweichende Aktivität (vgl. Tabelle 5.5). Dabei ist davon auszugehen, dass die beiden Substanzen trotz des geringfügig unterschiedlichen N<sup>9</sup>-Substituenten miteinander verglichen werden können, da auch der Austausch des Allylrestes gegen einen Methylrest in LM-8.0 keinen Einfluss auf die ABCB1 aktivierenden Eigenschaften besitzt (siehe Tabelle 5.3).

**Tabelle 5.5:** Untersuchung der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften der N<sup>9</sup>-substituierten Benzimidazole mittels Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay an A2780 Adr Zellen. Aufgeführt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten pEC<sub>50</sub>-Werte (n.b.: nicht bestimmt).

Substanz	Struktur	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pEC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
QB11		6,02 ± 0,15	6,09 ± 0,13
LM-25.1		6,09 ± 0,02	5,95 ± 0,10
LM-14.1		6,04 ± 0,07	n.b.
LM-14.2		5,92 ± 0,07	n.b.
LM-14.3		5,92 ± 0,06	n.b.
LM-14.6		6,60 ± 0,01	n.b.
LM-25.5		6,06 ± 0,11	n.b.
LM-25.6		6,12 ± 0,07	n.b.

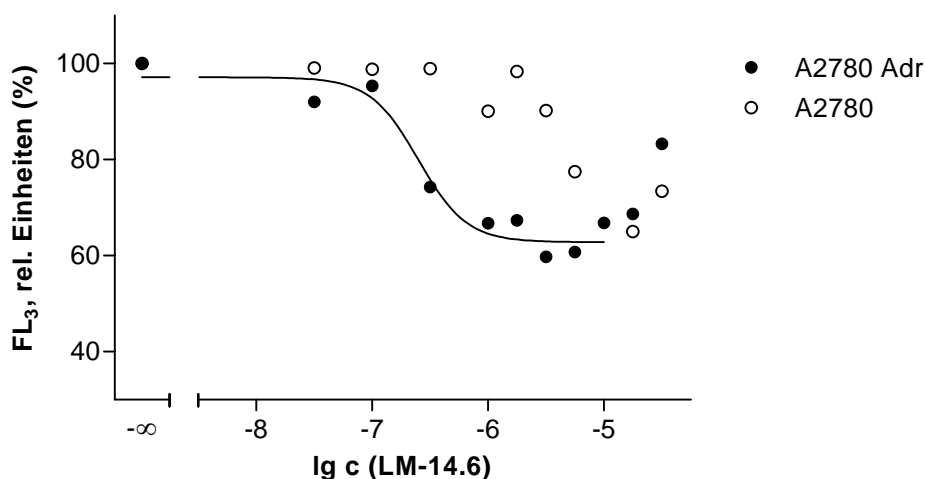
Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pEC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
LM-25.9		5,65 ± 0,08	n.b.
LM-25.10		6,56 ± 0,13	6,37 ± 0,12

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Tabelle 5.5 wird deutlich, dass auch die N<sup>9</sup>-benzyl substituierten Derivate in der Lage sind den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 zu stimulieren. Im Daunorubicin-Akkumulationsassay wird die Aktivierungs-Kurve jedoch durch eine Fluoreszenzabnahme überlagert, die auch in der sensitiven Zelllinie A2780 detektiert werden kann (siehe Abbildung 5.11).

Dieser unspezifische Effekt ist auf eine Löschung der Daunorubicin-Fluoreszenz durch die Testsubstanzen zurückzuführen. In Abbildung 5.12 ist der Einfluss verschiedener LM-Verbindungen auf die Fluoreszenz von Daunorubicin (A) und Rhodamin 123 (B) in Abwesenheit von Zellen dargestellt. Es ist erkennbar, dass es in Anwesenheit von LM-14.1 zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Daunorubicin-Fluoreszenz kommt, während LM-7.1 und LM-8.1 diese nicht beeinflussen. Auch die Anwesenheit von Hoechst 33342 führt zu einer Löschung der Daunorubicin-Fluoreszenz (siehe Kapitel 5.1). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen von Tang *et al.*, die bei Verwendung der beiden Farbstoffe zur Untersuchung von ABCB1 ein ähnliches Phänomen feststellten [236]. Im Gegensatz dazu kommt es bei keiner der Testsubstanzen zu einer Interferenz mit der Rhodamin 123-Fluoreszenz (Abbildung 5.12, B).

Aufgrund der Überlagerung der Aktivierungskurve in A2780 Adr Zellen durch die unspezifische Fluoreszenzabnahme können im Falle der Benzyl-Derivate keine exakten pEC<sub>50</sub>-Werte für die Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports von Daunorubicin ermittelt werden. Da die Abnahme der Fluoreszenz in den resistenten Zellen jedoch bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen erfolgt als in der sensitiven Zelllinie, kann hier nicht von einem ausschließlich ABCB1 unabhängigen Effekt ausgegangen werden (Abbildung 5.11). Somit ist

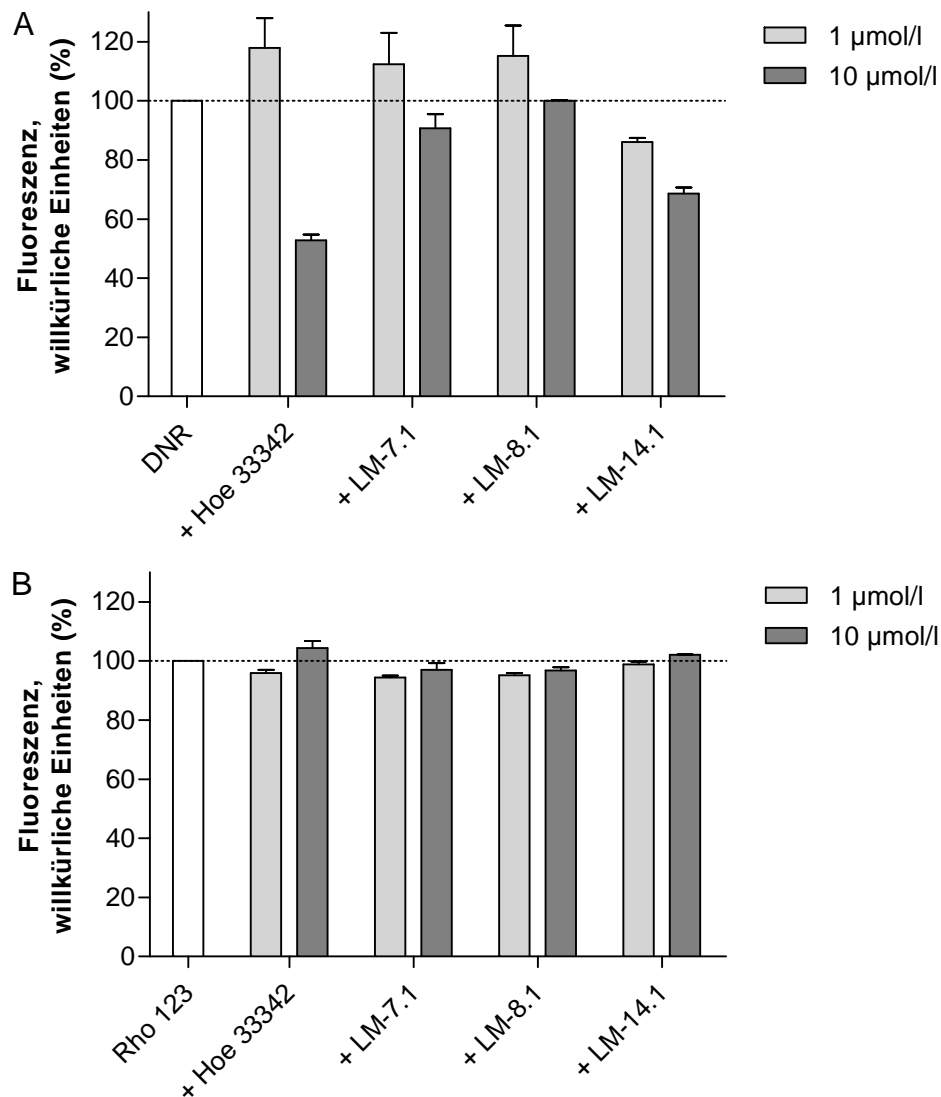


**Abbildung 5.11:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven von LM-14.6 in A2780 Adr und A2780 (Daunorubicin-Akkumulationsassay).

auch im Falle von Daunorubicin eine ABCB1 aktivatorische Wirksamkeit dieser Verbindungen wahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den N<sup>9</sup>-methylierten Verbindungen besitzt das Substitutionsmuster des Phenylrestes innerhalb der Gruppe der benzylierten 9*H*-Imidazobenzimidazole praktisch keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanzen. Mit Ausnahme des Methoxyderivates LM-14.6 ( $pEC_{50} = 6,60$ ) weisen die Substanzen keine signifikant unterschiedlichen Aktivitätswerte auf. Auch das Einbringen verschiedener Reste am Benzylsubstituenten bewirkt in den meisten Fällen keine Veränderung der  $pEC_{50}$ -Werte. Lediglich die 3,4-Dichlor-substituierte Verbindung LM-25.9 ( $pEC_{50} = 5,65$ ) ist nur etwa halb so potent wie das unsubstituierte Derivat LM-14.1 ( $pEC_{50} = 6,04$ ) und stellt damit die am schwächsten wirksame Substanz der gesamten Serie dar.

Der Austausch des Phenylringes gegen Naphthyl in LM-25.7 oder die Verlängerung des Alkyllinkers des N<sup>9</sup>-Substituenten auf eine C<sub>2</sub> bzw. C<sub>3</sub> Kette in LM-25.3 und LM-25.2 führt zu einem vollständigen Verlust der aktivierenden Wirksamkeit der Modulatoren (siehe Tabelle 5.6). Im Falle dieser Verbindungen kann jedoch im Daunorubicin-Akkumulationsassay eine schwache Inhibition von ABCB1 beobachtet werden, wobei die Substanzen jedoch eine deutlich geringere Aktivität aufweisen, als beispielsweise die in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Standard-Inhibitoren. Im Rhodamin 123-Akkumulationsassay kann für einen Teil der Substanzen ebenfalls eine Hemmung von ABCB1 beobachtet werden, während einige sich als inaktiv erweisen. Dabei liegen die  $pIC_{50}$ -Werte der aktiven Verbindungen stets unterhalb der im Daunorubicin-Akkumulationsassay ermittelten Aktivitätswerte. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen aus Kapitel 4.2.4. Auch hier weisen viele der untersuchten Inhibitoren im Rhodamin 123-Akkumulationsassay eine etwas geringere Aktivität auf,



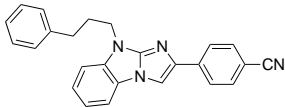
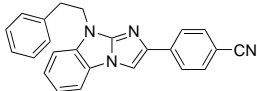
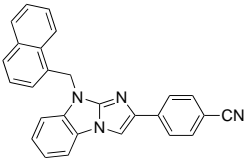
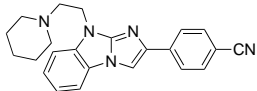
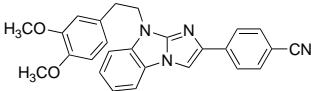
**Abbildung 5.12:** Einfluss verschiedener LM-Substanzen und Hoechst 33342 auf die Fluoreszenz von Daunorubicin (A) und Rhodamin 123 (B). Die Fluoreszenz der Farbstoffe in KHP wurde nach Anregung bei 485 nm in An- und Abwesenheit zweier Konzentrationen der Testsubstanzen gemessen. Daunorubicin:  $\lambda_{em.} = 590$  nm, Rhodamin 123:  $\lambda_{em.} = 520$  nm. Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung zweier Proben.



als im Daunorubicin-Akkumulationsassay. Im Rhodamin 123-Akkumulationsassay konnten daher aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Substanzen für LM-25.7 und LM-25.24 keine eindeutigen Testungsergebnisse erhalten werden.

Neben den aromatisch substituierten *9H*-Imidazobenzimidazolen weisen auch Substanzen mit aliphatischen N-haltigen Heterozyklen an einem C<sub>2</sub>-Linker eine schwach inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1 auf (Tabelle 5.6, LM-25.8 und LM-25.21 bis 25.24). Überraschend ist in diesem Zusammenhang die Hemmung des Transporters durch die Verbindung LM-25.21, die einen azyklischen *N,N*-Diethylaminoethyl-Rest an N<sup>9</sup> trägt, der sich strukturell nur wenig von den aliphatischen Substituenten der aktivierend wirksamen Derivate QB11 und LM-25.1 unterscheidet. Offenbar genügt eine gewisse minimale Kettenlänge dieses Substituenten, um einen Verlust der ABCB1 stimulierenden Wirkung zu verursachen. Die Anwesenheit voluminöser zyklischer aliphatischer oder aromatischer Partialstrukturen ist somit nicht essentiell.

**Tabelle 5.6:** Übersicht über die Testungsergebnisse der inhibitorisch aktiven LM-Derivate. Der Topwert der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde anhand des Standard-Inhibitors XR9577 festgelegt. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente (n.b.: nicht bestimmt, k.E.: kein Effekt bis 10 µmol/l).

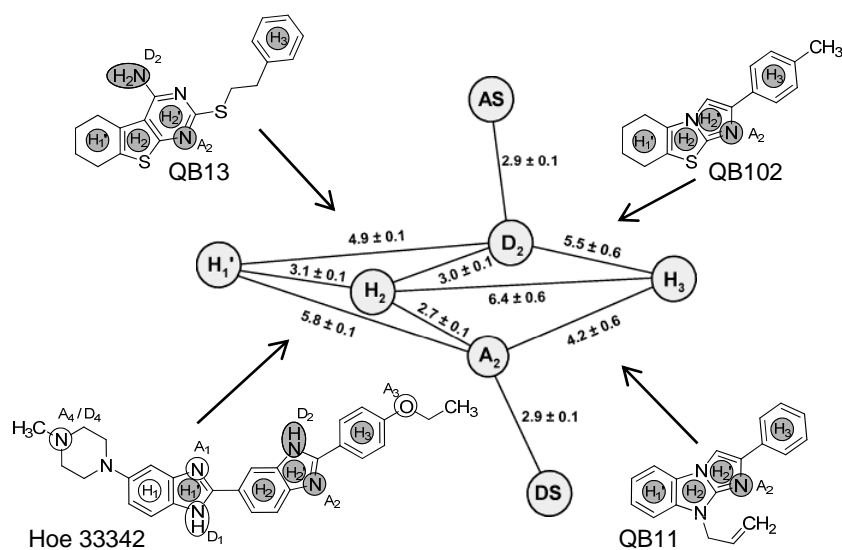
Substanz	Struktur	pIC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pIC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
LM-25.2		k.E.	4,45 ± 0,28
LM-25.3		k.E.	5,54 ± 0,35
LM-25.7		n.b.	4,11 ± 0,10
LM-25.8		4,89 ± 0,02	5,11 ± 0,05
LM-25.12		k.E.	4,53 ± 0,02

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pIC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pIC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
LM-25.14		n.b.	n.b.
LM-25.21		4,26 ± 0,21	4,80 ± 0,02
LM-25.22		k.E.	4,46 ± 0,13
LM-25.23		k.E.	4,62 ± 0,27
LM-25.24		k.E.	4,68 ± 0,05

Für den Verlust der aktivierenden Eigenschaften dieser Substanzen sind unterschiedliche Gründe denkbar. So wäre es möglich, dass Verbindungen aufgrund der Größe des N<sup>9</sup>-Substituenten nicht in die Bindungstasche am Protein passen oder die für die Aktivierung von ABCB1 essentiellen Konformationsänderungen des Transporters behindert werden.

Pajeva *et al.* konnten anhand der Strukturen der Literatur bekannten ABCB1-Aktivatoren QB11, QB13 und QB102 sowie des Substrates Hoechst 33342 ein Pharmakophormodell der Hoechst-Bindungsstelle des Transporters erstellen [237]. Dabei wurde die Wasserstoffbrücken-Akzeptorfunktion des Imidazolringes als ein essentielles Strukturmerkmal ABCB1 aktivierender Substanzen identifiziert (siehe Abbildung 5.13). Diese Partialstruktur ist zwar in allen untersuchten Verbindungen vorhanden, im Falle der nicht aktivierenden Substanzen aus Tabelle 5.6 ist es jedoch denkbar, dass es durch die größeren N<sup>9</sup>-Substituenten zu einer Abschirmung dieser Funktionalität kommt, weshalb die korrekte Bindung an das Protein nicht mehr möglich ist. Auf die Strukturabhängigkeit der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften der LM-Verbindungen wird in Kapitel 5.4 intensiver eingegangen.



**Abbildung 5.13:** Pharmakophormodell für die Hoechst-Bindungsstelle von ABCB1 (modifiziert nach [237]). Als essentielle strukturelle Merkmale werden die hydrophoben Zentren  $H_1$ - $H_3$  sowie die H-Akzeptorfunktion  $A_2$  und der optionale H-Brücken-Donor  $D_2$  angesehen. DS und AS bezeichnen die zugehörigen Donor- bzw. Akzeptorpunkte des Proteins.

### 5.3.1.3 2-Aryl-1H-benzimidazole

In einer dritten Reihe von Substanzen wurde das *9H*-Imidazobenzimidazol-Grundgerüst der LM-Verbindungen systematisch verkleinert, um die für die Aktivierung von ABCB1 essentiellen strukturellen Merkmale identifizieren zu können. Die Testungsergebnisse der so erhaltenen 2-Aryl-1*H*-benzimidazole sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.


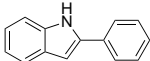
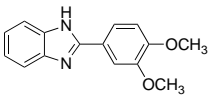
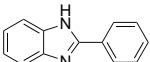
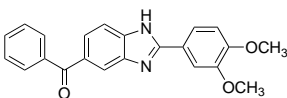
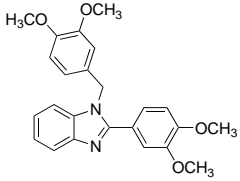
Anhand der Verbindungen LM-H-1 und LM-H-10 kann festgestellt werden, dass das aromatische System um eine Imidazol-Einheit verkleinert werden kann, ohne dass es zu einem Verlust der aktivierenden Eigenschaften der Substanzen kommt. Die  $pEC_{50}$ -Werte liegen dabei sowohl im Rhodamin 123- als auch im Daunorubicin-Akkumulationsassay in der Größenordnung der strukturell ähnlichen größeren Verbindungen wie LM-8.0 (vgl. Tabelle 5.3). Für LM-H-1 konnte ähnlich wie im Falle der zuvor beschriebenen  $N^9$ -benzylierten Verbindungen (siehe Tabelle 5.5) aufgrund einer unspezifischen Fluoreszenzabnahme in der sensitiven Zelllinie A2780 unter Verwendung von Daunorubicin als Substrat kein exakter  $pEC_{50}$ -Wert ermittelt werden.

Eine weitere Reduktion des Grundgerüsts zum unsubstituierten Benzimidazol dagegen führt zu einem vollständigen Verlust der ABCB1 modulierenden Eigenschaften. Auch das zur Verbindung LM-H-10 analoge 2-Phenylindol ist nicht in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport von Daunorubicin und Rhodamin 123 zu stimulieren. Dies ist vermutlich auf das

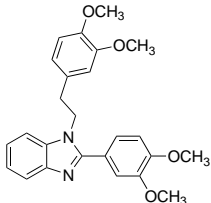
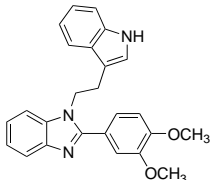
Fehlen der von Pajeva *et al.* als essentiell identifizierten H-Brücken-Akzeptorfunktion zurückzuführen [237].

Durch das Einbringen eines Benzoyl-Restes in Position C<sup>5</sup> der 2-Aryl-1*H*-benzimidazole kommt es ebenfalls zu einem vollständigen Verlust der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften. So kann im Falle des zu LM-H-1 analogen Benzophenonderivates LM-H-5 in beiden Testsystemen lediglich eine schwache Inhibition von ABCB1 detektiert werden. In Analogie zu den inhibitorisch wirksamen 9*H*-Imidazobenzimidazolen aus dem vorherigen Abschnitt weist LM-H-5 im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ( $pEC_{50} = 4,55$ ) ebenfalls eine geringere Aktivität auf als im Daunorubicin-Akkumulationsassay ( $pEC_{50} = 5,03$ ).

**Tabelle 5.7:** Untersuchung der ABCB1 modulierenden Eigenschaften der 2-Aryl-1*H*-benzimidazole mittels Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay an A2780 Adr Zellen. Aufgeführt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte (n.b.: nicht bestimmt, k.E.: kein Effekt bis 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Im Falle der Inhibitoren wurde der Top-Wert der Konzentrations-Effekt-Kurve mit Hilfe des Standard-Inhibitors XR9577 festgelegt. Für einen biphasischen Kurvenverlauf (LM-H-2) ist sowohl der  $pEC_{50}$ -Wert für die Aktivierung (A) als auch für die Inhibition (I) angegeben.

Substanz	Struktur	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)	$pEC_{50} \pm SD$ (DNR)
Benzimidazol		k.E.	k.E.
2-Phenylindol		k.E.	k.E.
LM-H-1		Aktivierung $5,83 \pm 0,18$	n.b.
LM-H-10		Aktivierung $5,90 \pm 0,09$	Aktivierung $6,08 \pm 0,43$
LM-H-5		Inhibition $4,55 \pm 0,07$	Inhibition $5,03 \pm 0,16$
LM-H-2		biphasisch A: $7,09 \pm 0,16$ I: $4,88 \pm 0,01$	Inhibition $5,11 \pm 0,25$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pEC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
LM-H-6		Aktivierung 6,67 ± 0,11	Inhibition 4,46 ± 0,28
LM-H-7		Aktivierung 6,51 ± 0,16	Inhibition 4,70 ± 0,10

Die N<sup>1</sup>-substituierten Vertreter dieser Klasse LM-H-2, LM-H-6 und LM-H-7 zeigen ein komplexeres Wirkspektrum, als die bisher beschriebenen Substanzen. Alle drei Verbindungen zeigen im Daunorubicin-Akkumulationsassay keine ABCB1 aktivierende Wirkung. Es kann lediglich bei hohen Modulatorkonzentrationen eine Inhibition des Transports beobachtet werden (siehe Tabelle 5.7).

Dagegen ist im Rhodamin 123-Akkumulationsassay kein vollständiger Verlust der ABCB1 aktivierenden Wirksamkeit zu verzeichnen. LM-H-2, die 3,4-Dimethoxybenzyl-substituierte Substanz besitzt zwar eine eindeutige inhibitorische Aktivität (vgl. Abbildung 5.14, A), in niedrigen Konzentrationen ist aber zusätzlich eine schwache Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports von Rhodamin 123 zu beobachten (Abbildung 5.14, B). Diese ist jedoch mit einer Fluoreszenzabnahme um etwa 15-20 % schwächer ausgeprägt als im Falle der reinen Aktivatoren.

Derartige Effekte konnten in der Literatur auch im Falle der Aktivierung von ABCC2 (MRP2) beobachtet werden. In unterschiedlichen Studien wiesen die Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedenster Testsubstanzen ebenfalls einen biphasischen Verlauf auf, wobei die inhibitorische Wirkung jedoch in den meisten Fällen eher schwach ausgeprägt war. In der Regel wurde in hohen Konzentrationen, wie auch bei einigen der hier untersuchten Substanzen (vgl. Kapitel 5.1), lediglich eine Abnahme der Aktivität bis auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle detektiert [216, 217]. Im Gegensatz dazu zeichnete sich jedoch beispielsweise das Tauroursodeoxycholat (TUDC) durch eine stärkere inhibitorische Wirkkomponente bei

gleichzeitig verringerter Aktivierung aus [217]. Auch für das häufig als Inhibitor von ABCC1 und ABCC2 eingesetzte Indometacin wurden ähnliche Effekte beobachtet [216, 238].

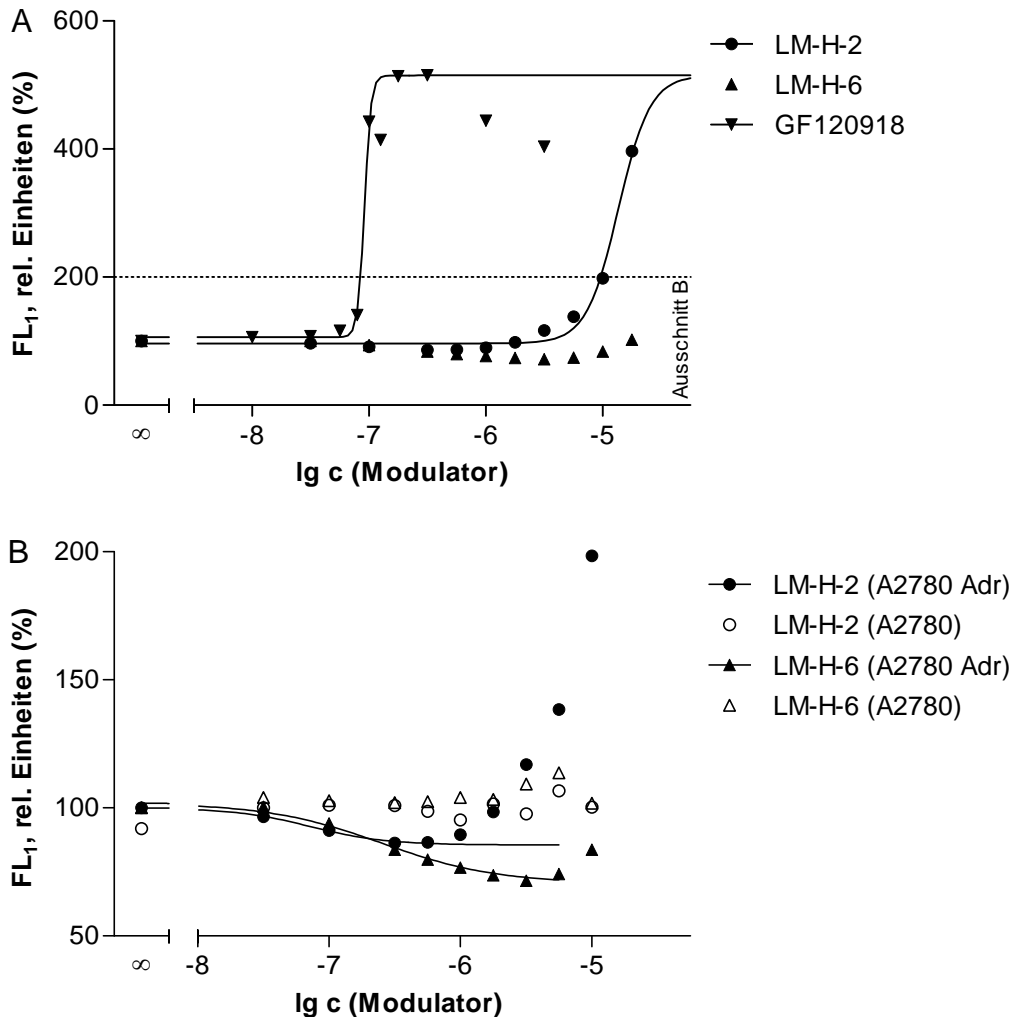
LM-H-6, welches einen um eine CH<sub>2</sub>-Einheit verlängerten N<sup>1</sup>-Substituenten aufweist, besitzt dagegen im Rhodamin 123-Akkumulationsassay eindeutig aktivierende Eigenschaften (vgl. Abbildung 5.14, B). Dabei ist hier eine Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz um 40-50 % zu beobachten, was in der Größenordnung der sonstigen Aktivatoren liegt. Mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 6,67 ± 0,11 ist LM-H-6 jedoch etwa siebenfach aktiver als das unsubstituierte Derivat LM-H-1 (pEC<sub>50</sub> = 5,83 ± 0,18). Die eng verwandte Substanz LM-H-7 zeigt eine ähnliche Aktivität wie LM-H-6.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aktivitätswerte der als neue Aktivatoren von ABCB1 identifizierten *9H*-Imidazobenzimidazole und 2-Aryl-*1H*-benzimidazole sich insgesamt in einem sehr engen Konzentrationsbereich von maximal einer Zehnerpotenz bewegen. Durch gezielte strukturelle Modifikationen der Substanzen ist es jedoch möglich, die aktivierende Wirkung aufzuheben bzw. schwach inhibitorisch wirksame Verbindungen zu erhalten.

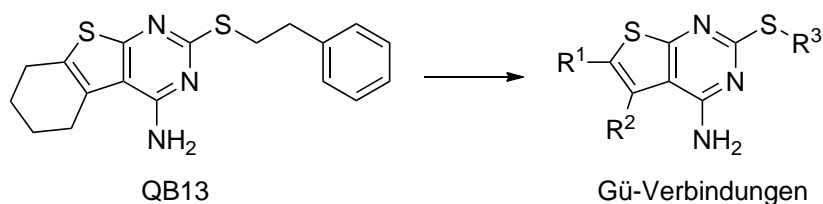
Der geringe Einfluss struktureller Modifikationen auf die pEC<sub>50</sub>-Werte von Aktivatoren des ABCB1 konnte auch in einer Serie von Derivaten des QB13 (vgl. Abbildung 5.15) beobachtet werden, die im Arbeitskreis von Prof. Gütschow synthetisiert und von A. de la Haye hinsichtlich ihrer ABCB1 modulierenden Eigenschaften untersucht wurden [214, 239].

Jene Substanzen, in denen neben der Tetramethylen-Partialstruktur (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>) auch der Thioether (R<sup>3</sup>) systematisch variiert wurde, weisen im Daunorubicin-Akkumulationsassay ebenfalls pEC<sub>50</sub>-Werte in einem engen Bereich zwischen 5,3 und 6,3 auf. Lediglich durch das Einführen einer Carbonsäure-Funktion – einem strukturellen Merkmal, welches in der Regel nicht durch ABCB1 erkannt wird – kann hier ein vollständiger Aktivitätsverlust erreicht werden. Des Weiteren bleibt auch hier in Analogie zu den 2-Aryl-*1H*-benzimidazolen bei vollständigem Fehlen des in Abbildung 5.13 mit H<sub>1</sub>' bezeichneten hydrophoben Zentrums die aktivatorische Wirksamkeit der Substanzen erhalten. Somit ist diese Partialstruktur als nicht essentiell für die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports anzusehen. Auf diesen Aspekt soll in Kapitel 5.4 intensiver eingegangen werden.

Die Untersuchung der LM-Derivate mit Hilfe zweier funktioneller Testsysteme (Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay) führt des Weiteren zu dem Ergebnis, dass im Falle der aktivierend wirksamen Substanzen im Gegensatz zu vielen Inhibitoren (vgl. Kapitel 4.2.4, [168]) keine direkte Vergleichbarkeit der erhaltenen Aktivitätsdaten gegeben ist. Einerseits kann innerhalb der Gruppe der Aktivatoren keine Korrelation der pEC<sub>50</sub>-Werte festgestellt werden, andererseits sind in einigen Fällen sogar grundsätzlich unterschiedliche Aktivitäten zu beobachten. Dabei scheinen sich strukturelle Veränderungen der Modulatoren



**Abbildung 5.14:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven von LM-H-2 und LM-H-6 im Rhodamin 123-Akkumulationsassay. LM-H-2 weist in diesem Testsystem einen biphasischen Kurvenverlauf auf. Bevor in höheren Konzentrationen eine deutliche inhibitorische Aktivität ( $pEC_{50} = 4,87$ ) zu beobachten ist (A), kommt es zu einer schwachen Aktivierung von ABCB1 (B,  $pEC_{50} = 7,25$ ). LM-H-6 besitzt eine ausschließlich aktivierende Aktivität (B,  $pEC_{50} = 6,60$ ). Der Topwert der Inhibitoren wurde anhand des Standard-Inhibitors GF120918 (A) festgelegt.



**Abbildung 5.15:** Struktur von QB13 (links) und Grundstruktur der davon abgeleiteten 4-Aminothienopyrimidine (Gü-Verbindungen).

im Falle des Rhodamin 123-Transports weniger stark auszuwirken, als dies bei Daunorubicin der Fall ist. So unterscheiden sich die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay erhaltenen pEC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen Substanzen insgesamt nur geringfügig. Des Weiteren werden hier größere strukturelle Modifikationen toleriert, die im Falle von Daunorubicin bereits zu einem vollständigen Wirkungsverlust führen. Dies wird insbesondere am Beispiel der N<sup>1</sup>-substituierten 2-Aryl-1*H*-benzimidazole deutlich. Der Einfluss der Aktivatoren auf weitere Substrate von ABCB1 wird in Kapitel 7.1 ausführlich dargestellt.



### 5.3.2 Vergleich verschiedener Substrate und Zelllinien

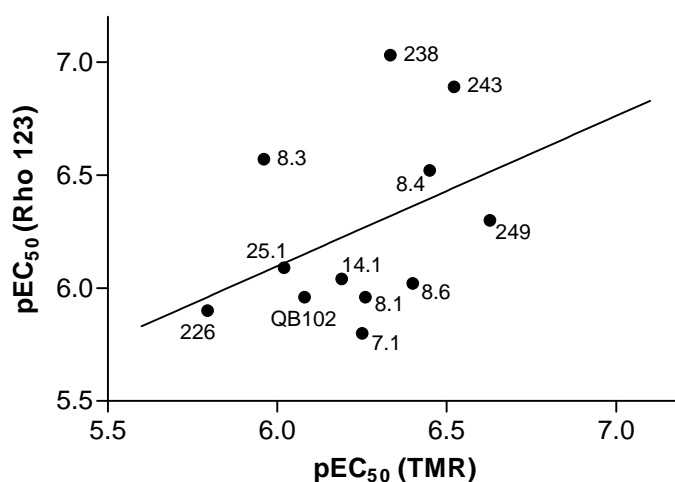
Wie bereits in Kapitel 5.3.1 beschrieben wurde, sind die für Aktivatoren im Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay erhaltenen Aktivitätsdaten nur bedingt vergleichbar. In diesem Punkt unterscheiden sie sich grundsätzlich von vielen gegenüber ABCB1 inhibitorisch wirksamen Substanzen (siehe Kapitel 4.2.4). Um diesen Aspekt näher zu untersuchen sollten einige Aktivatoren zusätzlich unter Verwendung eines weiteren Substrats der Rhodamin-Bindungsstelle von ABCB1 charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das – im Gegensatz zu Daunorubicin – mit Rhodamin 123 strukturell sehr eng verwandte Tetramethylrosamin eingesetzt. Neben den LM-Verbindungen wurden hierbei unter Verwendung der Zelllinie A2780 ADR zusätzlich einige der in Kapitel 6.3 beschriebenen Aktivatoren vom Acridonsäureamid-Typ untersucht, sodass die in diese Versuchsreihe eingeschlossenen Substanzen sich durch eine gewisse strukturelle Vielfalt auszeichnen und einen möglichst breiten Aktivitätsbereich im Rhodamin 123-Akkumulationsassay abdecken.

**Tabelle 5.8:** Testungsergebnisse ausgewählter Aktivatoren im Tetramethylrosamin-Akkumulationsassay mit den Zelllinien A2780 ADR und CHO-K1 M403. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente (n.b.: nicht bestimmt).

Substanz	pEC <sub>50</sub> (A2780 ADR) ± SD	pEC <sub>50</sub> (CHO-K1 M403) ± SD
QB102	6,08 ± 0,04	6,14 ± 0,04
LM-7.1	6,25 ± 0,16	6,38 ± 0,13
LM-8.1	6,26 ± 0,01	6,43 ± 0,05
LM-8.3	5,96 ± 0,12	6,16 ± 0,03
LM-8.4	6,45 ± 0,05	6,19 ± 0,06
LM-8.6	6,40 ± 0,07	n.b.
LM-14.1	6,19 ± 0,02	n.b.
LM-25.1	6,02 ± 0,07	6,09 ± 0,10
MAC-226	5,79 ± 0,11	5,94 ± 0,12
MAC-238	6,33 ± 0,11	6,89 ± 0,03
MAC-243	6,52 ± 0,11	6,75 ± 0,23
MAC-249	6,63 ± 0,00	6,62 ± 0,13

Erwartungsgemäß sind alle untersuchten Verbindungen in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport von Tetramethylrosamin zu stimulieren. Die erhaltenen Aktivitätsdaten sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst und liegen, ähnlich wie die zuvor unter Verwendung von Rhodamin 123 und Daunorubicin bestimmten Werte, im unteren mikromolaren bis submikromolaren Bereich.

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von Rhodamin 123 und Tetramethylrosamin ist davon auszugehen, dass beide Verbindungen in vergleichbarer Art und Weise an ABCB1 binden. Darauf basierend ist auch eine identische Interaktion der beiden Substrate mit Mo-

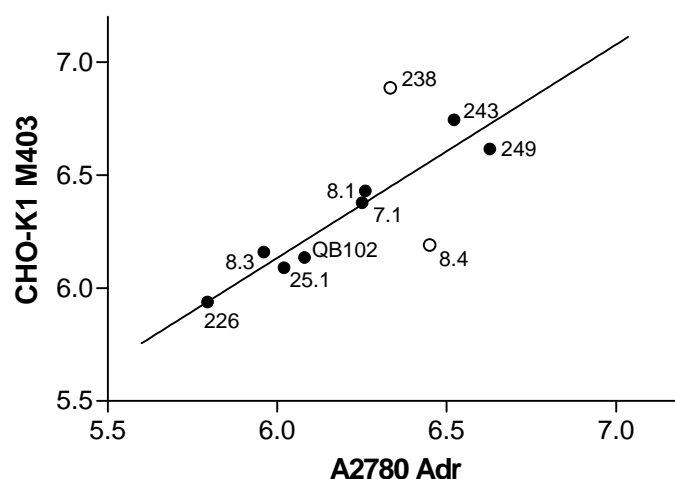


**Abbildung 5.16:** Korrelation der unter Verwendung von Tetramethylrosamin und Rhodamin 123 in A2780 Adr Zellen erhaltenen pEC<sub>50</sub>-Werte ( $r^2 = 0,162$ ).

dulatoren, welche die Funktion des Proteins beeinflussen, zu erwarten. Dies zeigt sich beispielsweise im Falle der in Kapitel 4.2.5 untersuchten Inhibitoren: Hier kann eine sehr gute Korrelation der unter Verwendung beider Substanzen ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte der Hemmstoffe festgestellt werden (siehe Abbildung 4.21, Seite 116). Im Falle der untersuchten Aktivatoren korrelieren die in den beiden Testsystemen erhaltenen pEC<sub>50</sub>-Werte hingegen nicht (siehe Abbildung 5.16). Somit besitzen diese Verbindungen zwar in allen drei funktionellen Assays eine aktivierende Wirkung auf ABCB1, ihre Aktivität unterscheidet sich jedoch zwischen den Testsystemen signifikant.

Neben einer differierenden Interaktion der Aktivatoren mit den jeweiligen Substraten ist auch eine Reihe von experimentellen Einflüssen denkbar, die – zumindest theoretisch – zu den beobachteten Unterschieden führen können. So kann beispielsweise eine Korrelation von pEC<sub>50</sub>-Werten, die sich in einem relativ engen Aktivitätsintervall von hier nur etwa 0,7 logarithmischen Einheiten bewegen, aufgrund der bei zellbasierten Methoden üblichen Schwankungen nur bedingt aussagekräftig sein. Des Weiteren ist der für einen Aktivator ermittelte pEC<sub>50</sub>-Wert stark von der maximalen Aktivierung und somit vom Bottomwert der jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurve abhängig. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der relativ lipophilen Aktivatoren ist dieser nicht immer eindeutig zu ermitteln. Der Einfluss der genannten Faktoren ist jedoch eher gering und somit nur in Einzelfällen relevant, was sich unter anderem an den nachfolgend beschriebenen Experimenten zeigt. Das vollständige Fehlen einer Korrelation, wie es hier auftritt, kann durch diese Effekte nicht erklärt werden, sodass eher von einer massiven Substratabhängigkeit der aktivierenden Wirkung der untersuchten Verbindungen auszugehen ist.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Aktivierung von ABCB1 durch die ausgewähl-



**Abbildung 5.17:** Korrelation der im Tetramethylrosamin-Akkumulationsassay unter Verwendung der Zelllinien A2780 ADR und CHO-K1 M403 erhaltenen Testungsergebnisse ( $r^2 = 0,922$ ). Die Substanzen LM-8.4 und MAC-238 (offene Symbole) wurden von der Korrelation ausgeschlossen.

ten Verbindungen zusätzlich an der mit dem humanen *ABCB1*-Gen transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403 untersucht. Durch die Verwendung einer transfizierten Zelllinie sollte gezeigt werden, dass die in A2780 ADR Zellen detektierte Verringerung der intrazellulären Akkumulation von Rhodamin 123, Daunorubicin und Tetramethylrosamin nur auf die Aktivierung des *ABCB1* vermittelten Transports zurückzuführen ist. Eine mögliche Beeinflussung sonstiger Mechanismen durch die Modulatoren, die beispielsweise bei der Selektion der Zellen mit Doxorubicin hätten induziert werden können, sollte so ausgeschlossen werden. Als funktionelles Testsystem wurde exemplarisch der Tetramethylrosamin-Akkumulationsassay ausgewählt.

Erwartungsgemäß kann auch in der transfizierten Zelllinie eine Reduktion der zellulären Fluoreszenz von Tetramethylrosamin durch die Aktivatoren beobachtet werden. Die verringerte intrazelluläre Akkumulation des Farbstoffs ist somit eindeutig auf die Stimulation des *ABCB1* vermittelten Transports zurückzuführen. Die aus den entsprechenden Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte der Aktivatoren sind ebenfalls in Tabelle 5.8 aufgeführt.

Wie in Abbildung 5.17 erkennbar ist, korrelieren die an A2780 ADR und CHO-K1 M403 Zellen erhaltenen  $pEC_{50}$ -Werte der Substanzen insgesamt gut. Lediglich die Verbindungen LM-8.4 und MAC-238 weisen diesbezüglich ein abweichendes Verhalten auf; unter Ausschluss dieser Ausreißer beträgt das Bestimmtheitsmaß 0,922. Dieses Ergebnis war grundsätzlich zu erwarten; es stellt sich jedoch die Frage, warum die Aktivitätswerte von LM-8.4 und MAC-238 in den beiden Zelllinien deutlicher differieren, als die der übrigen Aktivatoren.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Tatsache sein, dass in der Zelllinie CHO-K1, aus welcher die hier verwendeten CHO-K1 M403 Zellen gewonnen wurden, bereits eine gerin-

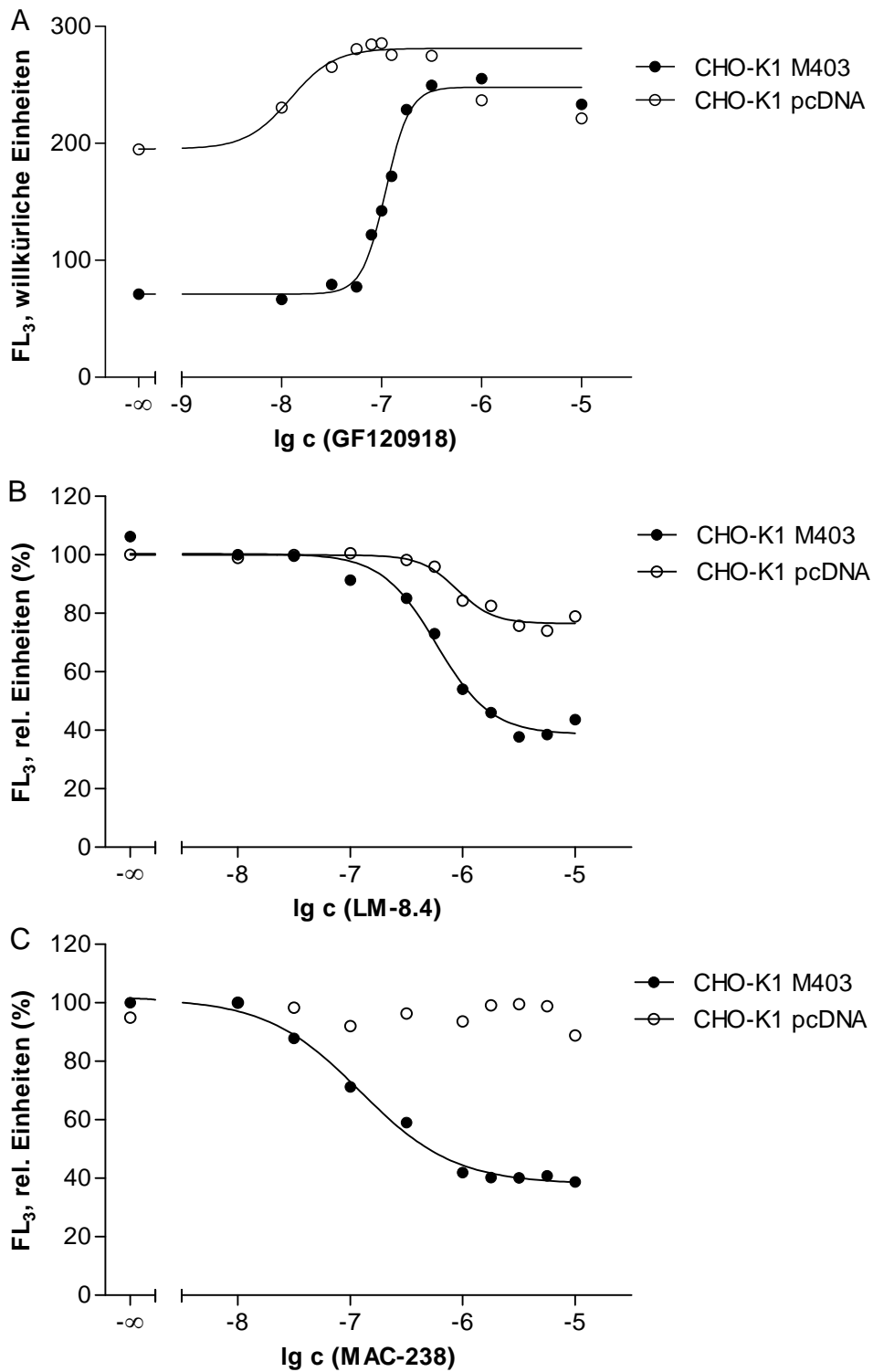
ge Menge an ABCB1 exprimiert wird (siehe Kapitel 4.1.2). Diese endogene Expression des Transporters wird auch anhand der Ergebnisse des Tetramethylrosamin-Akkumulationsassays deutlich: Im Falle des als Standard eingesetzten Inhibitors GF120918 ist auch in der mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie CHO-K1 pcDNA ein konzentrationsabhängiger Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz erkennbar, welcher auf die Hemmung von ABCB1 zurückzuführen ist (siehe Abbildung 5.18, A). Die in der Zelllinie CHO-K1 M403 erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven charakterisieren somit immer eine Mischung aus dem durch Transfektion eingebrachten humanen ABCB1 sowie dem endogen vorhandenen Nager-Protein.

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich humanes ABCB1 und das entsprechende murine Protein trotz einer Sequenzhomologie von 87 % hinsichtlich der Sensitivität gegenüber einigen Inhibitoren unterscheiden [240]. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass die differierenden Aktivitätswerte des LM-8.4 und des MAC-238 auf eine von den übrigen Substanzen verschiedene Interaktion mit dem Hamster-ABCB1 zurückzuführen ist.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven der beiden Aktivatoren sind ebenfalls in Abbildung 5.18 dargestellt. Erwartungsgemäß wird im Falle des LM-8.4 auch in der mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie CHO-K1 pcDNA eine konzentrationsabhängige Reduktion der zellulären Fluoreszenz detektiert (Abbildung 5.18, B). Diese ist allerdings relativ betrachtet schwächer ausgeprägt als in der Zelllinie CHO-K1 M403. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Substanz auch den Efflux von Tetramethylrosamin durch das endogene Nager-ABCB1 stimuliert. Ein davon abweichendes Verhalten weist das Acridonsäureamid MAC-238 auf: Wie Abbildung 5.18 C zu entnehmen ist, ist die Verbindung in der Lage, den Transport von Tetramethylrosamin durch das humane Protein zu aktivieren. In CHO-K1 pcDNA Zellen ist jedoch keine Abnahme der Fluoreszenz feststellbar. Folglich erhöht MAC-238 die Aktivität des Hamster-Proteins nicht.

Die beiden Aktivatoren unterscheiden sich somit in ihrer Fähigkeit die Transportfunktion des Nager-ABCB1 zu beeinflussen. Dies erklärt jedoch nicht ihr Abweichen von der Korrelation der an A2780 Adr und CHO-K1 M403 ermittelten Aktivitätswerte, da ein analoges Verhalten auch für die übrigen untersuchten Verbindungen beobachtet wird: Einige der Substanzen beeinflussen die Transportfunktion in CHO-K1 pcDNA Zellen, andere nicht; die Übereinstimmung der an den beiden Zelllinien bestimmten  $pEC_{50}$ -Werte ist dennoch groß. Insgesamt kann die Ursache für die differierenden Aktivitätsdaten von LM-8.4 und MAC-238 daher anhand der vorliegenden Daten nicht identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports einen hochspezifischen Prozess darstellt, der von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Dies zeigt sich insbesondere an der großen Substratabhängigkeit der Wirkung: Sogar zwischen den strukturell sehr ähnlichen Substraten Rhodamin 123 und Tetramethylrosamin

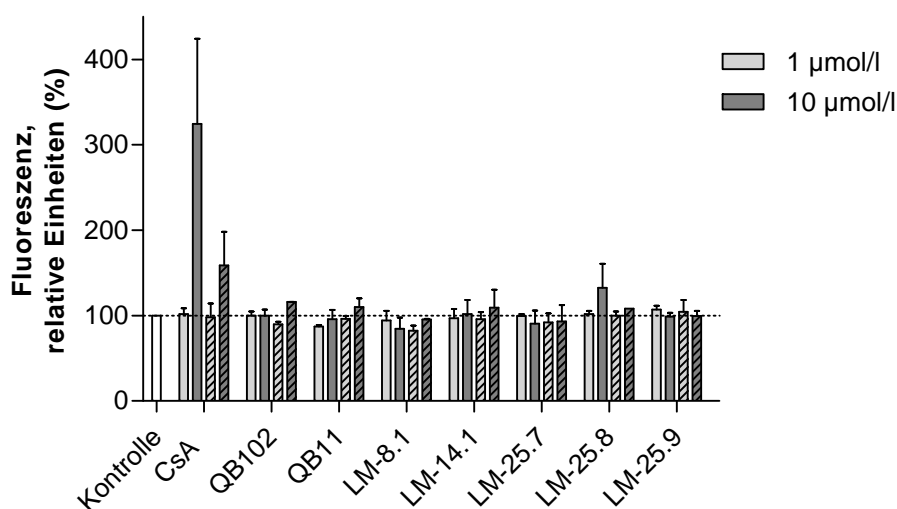


**Abbildung 5.18:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven von GF120918 (A), LM-8.4 (B) und MAC-238 (C) erhalten im Tetramethylrosamin-Akkumulationsassay unter Verwendung von CHO-K1 M403 und CHO-K1 pcDNA Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei Versuchen;  $pIC_{50}$  (GF120918) = 6,96,  $pEC_{50}$  (LM-8.4) = 6,24,  $pEC_{50}$  (MAC-238) = 6,91.

kann keine Korrelation der Aktivitätsdaten festgestellt werden. Des Weiteren konnte unter Verwendung der mit dem humanen *ABCB1*-Gen transfizierten Zelllinie CHO-K1 M403 gezeigt werden, dass die durch die Verbindungen induzierte Fluoreszenzabnahme ausschließlich auf die Aktivierung des Transporters zurückzuführen ist. Diese Versuchsreihe unterstreicht außerdem die große Spezifität dieses Mechanismus: Einige der untersuchten Substanzen sind zusätzlich in der Lage, den Transport von Tetramethylrosamin durch Hamster-ABCB1 zu stimulieren, während andere – trotz einer Sequenzhomologie von 87% zum humanen Protein – diesen nicht beeinflussen.

### 5.3.3 Screening an weiteren ABC-Transportern

Die im vorherigen Kapitel an ABCB1 getesteten Modulatoren vom Benzimidazol-Typ sollten zusätzlich hinsichtlich einer möglichen Aktivität gegenüber den ebenfalls MDR-assoziierten Transportern ABCC1 und ABCG2 charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Auswahl strukturell unterschiedlicher LM-Derivate im Calcein-AM-Assay (ABCC1) und im Pheophorbid A-Akkumulationsassay (ABCG2) untersucht. Diese Gruppe von Verbindungen umfasste neben den Ausgangsverbindungen QB11 und QB102 jeweils repräsentative Vertreter der unterschiedlich N<sup>9</sup>-substituierten 9H-Imidazobenzimidazole.



**Abbildung 5.19:** Screening der LM-Derivate hinsichtlich ihrer ABCC1-Aktivität. Es wurden jeweils 1 und 10 µmol/l der Substanzen sowie des Standardinhibitors Ciclosporin (CsA) im Calcein-AM-Assay mit 2008 (schraffierte Balken) und 2008 MRP1 Zellen (einfarbige Balken) untersucht. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.

Die Untersuchung einer potentiellen Aktivität gegenüber ABCC1 erfolgte mit Hilfe des Calcein-AM-Assays unter Verwendung von 2008 MRP1 sowie der zugehörigen sensitiven Zelllinie 2008. Die Inkubation mit 10 µmol/l des Standardinhibitors Ciclosporin (CsA) führt hierbei zu einer vollständigen Hemmung des ABCC1 vermittelten Transports von Calcein-AM in der Zelllinie 2008 MRP1 (vgl. Abbildung 5.19). Daneben kann jedoch auch in den sensitiven Zellen (schraffierte Balken) ein leichter Anstieg der zellulären Calcein-Fluoreszenz festgestellt werden. Dies ist vermutlich auf die Anwesenheit weiterer Transportproteine, die in der Lage sind, Calcein oder den entsprechenden AM-Ester zu transportieren, in dieser Zelllinie zurückzuführen. So konnten Kool *et. al.* in 2008 Zellen ABCB1, ABCC1 und ABCC5 auf RNA-Ebene nachweisen [195]. Des Weiteren konnte unter Verwendung des spezifischen Antikörpers QRCL-1 auch auf Proteinebene eine geringe endogene ABCC1-Expression in der sensitiven Zelllinie detektiert werden [238].

Im Gegensatz zu Ciclosporin besitzt keine der untersuchten LM-Verbindungen eine Aktivität gegenüber ABCC1 (siehe Abbildung 5.19). Dieses Ergebnis war aufgrund vorheriger Untersuchungen an einer Serie strukturell eng mit den hier betrachteten Substanzen verwandter 2,3-Dihydro-2-imino-1*H*-benzimidazole zu erwarten [234, 238]. Hier konnte die Anwesenheit großer aromatischer N-Substituenten sowie eines Wasserstoffbrücken-Donors als essentielle Strukturmerkmale für eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber ABCC1 identifiziert werden, sodass im Falle der hier untersuchten kleineren Benzimidazole nicht von einer ABCC1-Aktivität ausgegangen werden konnte.

Die Aktivität der LM-Derivate gegenüber ABCG2 wurde im Pheophorbid A-Akkumulationsassay unter Verwendung von MDCKII/BCRP Zellen und der korrespondierenden sensitiven Zelllinie MDCKII überprüft. Als Standardinhibitor wurde das Anthranilsäure-Derivat XR9577 verwendet, welches in den ABCG2 exprimierenden Zellen zu einer vollständigen Inhibition des Transports von Pheophorbid A (Pheo A) führt (vgl. Abbildung 5.20, A).

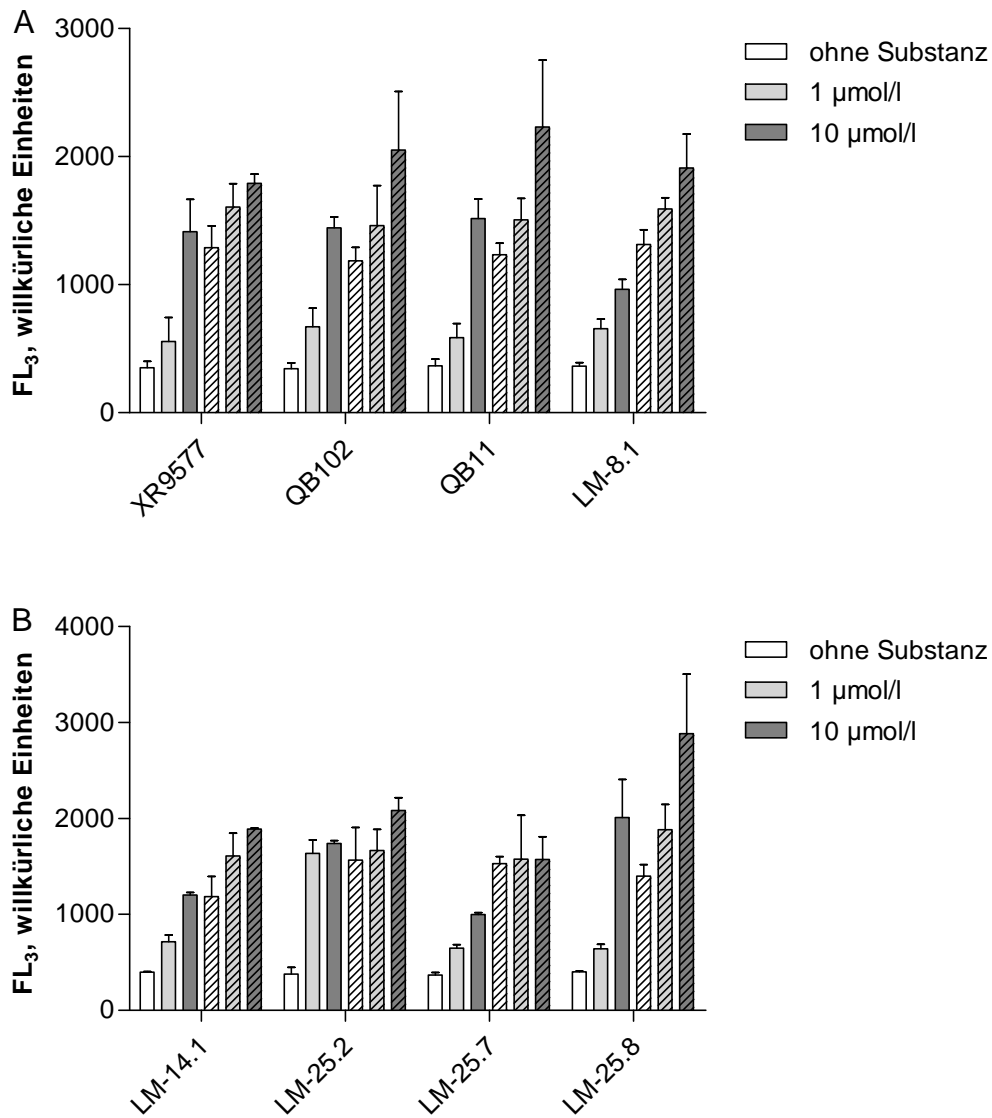
Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen an ABCC1 ist hier bei praktisch allen untersuchten Substanzen eine konzentrationsabhängige absolute Steigerung der Pheophorbid A-Fluoreszenz zu beobachten. Diese tritt jedoch in ähnlichem Ausmaß auch in der sensitiven Zelllinie auf (schraffierte Balken). Die Steigerung der Fluoreszenz ist dabei vermutlich auf unspezifische Effekte zurückzuführen, da aufgrund der ABCG2-Selektivität des Pheophorbid A nicht von einer Interaktion mit anderen potentiell in MDCKII-Zellen exprimierten ABC-Transportern auszugehen ist [152]. Eine endogene ABCG2-Expression in dieser Zelllinie konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Es ist somit davon auszugehen, dass die 9*H*-Imidazobenzimidazole keine Aktivität gegenüber diesem Transporter besitzen.

Eine Ausnahme stellt diesbezüglich – neben dem Standard XR9577 – das N<sup>9</sup>-Naphthyl-Derivat LM-25.7 dar. Die Substanz verursacht ausschließlich in der resistenten Zelllinie eine Erhöhung der Pheophorbid A-Fluoreszenz und ist somit in der Lage, ABCG2 zu inhibieren (Abbildung 5.20).

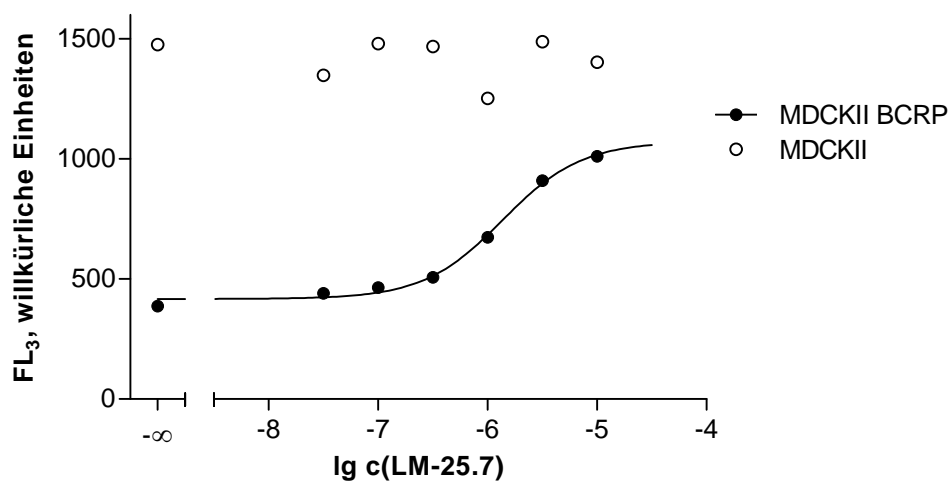
Basierend auf dieser Beobachtung wurde anschließend eine minimale Konzentrations-Effekt-Kurve von LM-25.7 aufgenommen (siehe Abbildung 5.21), wobei die Substanz mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 5,83 (n = 2) nur wenig schwächer wirksam ist, als der Standardinhibitor XR9577 (pIC<sub>50</sub> = 5,91). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Topwert der Konzentrations-Effekt-Kurve nicht das Niveau der sensitiven Zellen erreicht. Dies kann auf unzureichende Löslichkeit der Substanz oder eine nur partielle Inhibition des Transportvorgangs zurückzuführen sein. Beide Effekte führen zu einer geringfügigen Überschätzung des tatsächlichen pIC<sub>50</sub>-Wertes.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die repräsentativ ausgewählten 9*H*-Imidazobenzimidazole – mit Ausnahme von LM-25.7, welches in der Lage ist, ABCG2 zu hemmen – keine





**Abbildung 5.20:** Screening der LM-Derivate hinsichtlich ihrer ABCG2-Aktivität. Es wurden jeweils 1 und 10 µmol/l der Substanzen sowie des Standardinhibitors XR9577 im Pheophorbid A-Akkumulationassay mit MDCKII (schraffierte Balken) und MDCKII/BCRP Zellen (einfarbige Balken) untersucht. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.



**Abbildung 5.21:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurve von LM-25.7 gegenüber ABCG2 (Pheophorbid A-Akkumulationsassay mit MDCKII BCRP und MDCKII). Der  $pIC_{50}$ -Wert beträgt in diesem Beispiel 5,86;  $n_H = 1,20$ .

Aktivität an den MDR-assoziierten Transportern ABCC1 und ABCG2 besitzen. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der übrigen Substanzen (vgl. Kapitel 5.3.1) erscheint auch eine Wirksamkeit dieser gegenüber den genannten Proteinen unwahrscheinlich. Somit stellen die LM-Verbindungen selektive Aktivatoren von ABCB1 dar.

## 5.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

### 5.4.1 Einleitung

Basierend auf den in Kapitel 5.3.1 dargestellten Ergebnissen sollten die für die Aktivierung von ABCB1 essentiellen strukturellen Merkmale identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden unter Berücksichtigung der Derivate des QB11 und des QB102 sowie der im Arbeitskreis von Prof. Gütschow synthetisierten QB13-Abkömmlinge [214, 239] Pharmakophormodelle erstellt.

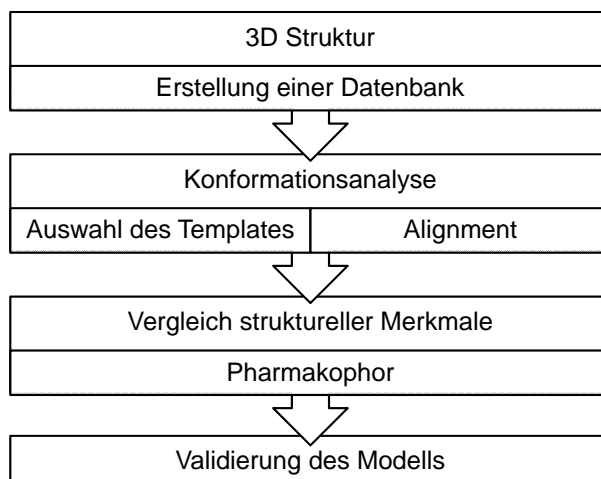
Laut IUPAC-Definition handelt es sich bei einem Pharmakophor um „die Gesamtheit aller räumlichen und elektronischen Merkmale, die notwendig sind, um eine optimale molekulare Interaktion mit einer spezifischen biologischen Zielstruktur zu gewährleisten und deren biologischen Effekt auszulösen oder zu hemmen“ [241]. Es beschreibt damit die essentiellen strukturellen bzw. physikochemischen Charakteristika (nicht definierte funktionelle Gruppen), die für eine optimale Wirkung an einer pharmakologischen Zielstruktur – in diesem Falle für die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports – notwendig sind. Pharmakophormodelle sind somit den qualitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Structure-Activity-Relationships, SAR), bei denen der prinzipielle Einfluss struktureller Merkmale auf die biologische Aktivität betrachtet wird, zuzuordnen. Davon abzugrenzen sind die quantitativen Verfahren (QSAR), die hier – mit Ausnahme weniger Deskriptor-basierter Betrachtungen in Kapitel 5.3.1 – aufgrund der geringen Aktivitätsunterschiede innerhalb der untersuchten Substanzklasse keine Anwendung fanden.

Bei der Erstellung der Modelle wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach dem in Abbildung 5.22 dargestellten allgemeinen Schema vorgegangen. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten dabei mit dem Programm MOE 2009.10 (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Kanada) unter Verwendung des MMFF94x Kraftfeldes. Die hierbei angewendeten Methoden sowie die erhaltenen Ergebnisse sollen in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt werden.

### 5.4.2 Erstellung der Pharmakophormodelle

#### 5.4.2.1 Konformationsanalyse

Flexible Moleküle wie die hier betrachteten *9H*-Imidazobenzimidazole und 2-Aryl-*1H*-benzimidazole können durch Rotationen um die in der Struktur enthaltenen Einfachbindungen in einer Vielzahl unterschiedlicher Konformationen vorliegen. Die biologische Aktivität einer Verbindung ist dabei theoretisch auf eine dieser Konformationen zurückzuführen. Diese ist



**Abbildung 5.22:** Schematische Vorgehensweise zur Erstellung eines Pharmakophormodells.

mit hoher Wahrscheinlichkeit unter den energiearmen Konformationen der Verbindung zu finden, muss jedoch nicht die energieärmste darstellen [242]. Damit stellt die Generierung und Analyse möglicher Konformere der zu untersuchenden Substanzen einen wichtigen initialen Schritt bei der Erstellung eines Pharmakophormodells dar.

Zur Bestimmung der lokalen Minima des Konformationsraumes wurde zunächst eine Konformationsuche durchgeführt. Zu diesem Zweck stehen prinzipiell unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, über die im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden soll.

Bei der systematischen Konformationsuche werden sämtliche Bindungswinkel eines Moleküls in definierten Schritten variiert und so jeweils neue mögliche Konformationen generiert. Bei Auswahl ausreichend kleiner Winkelintervalle ist hier von einer vollständigen Erfassung des Konformationsraumes auszugehen. Aufgrund der sehr großen generierten Datenmenge ist dieses Verfahren jedoch insbesondere für kleinere Substanzbibliotheken, die Moleküle mit wenigen Rotationsmöglichkeiten beinhalten, geeignet [242, 243].

Im Gegensatz dazu werden bei der stochastischen Suche zufällig neue Atomkoordinaten und Torsionswinkel generiert. Nach erfolgter Energieminimierung werden die erhaltenen Konformationen mit den bereits vorhandenen verglichen und ausschließlich noch nicht existierende neue Konformere gespeichert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis innerhalb einer zuvor definierten Anzahl von Zyklen keine neue Konformation erhalten werden kann oder eine bestimmte Gesamtzahl an Zyklen überschritten wird. Bei einer ausreichend langen Analysedauer kann auch mit diesem Verfahren eine umfassende Abdeckung des Konformationsraumes eines Moleküls erreicht werden [242, 243].

Moleküldynamik-Verfahren simulieren die zeitabhängige Bewegung der Atome innerhalb ei-

nes Moleküls und generieren so neue Konformationen. Ein häufig angewandtes Moleküldynamik-Verfahren ist beispielsweise das sogenannte Simulated Annealing. Einen limitierenden Faktor stellen hier jedoch die langen Simulationszeiten dar [242, 243].

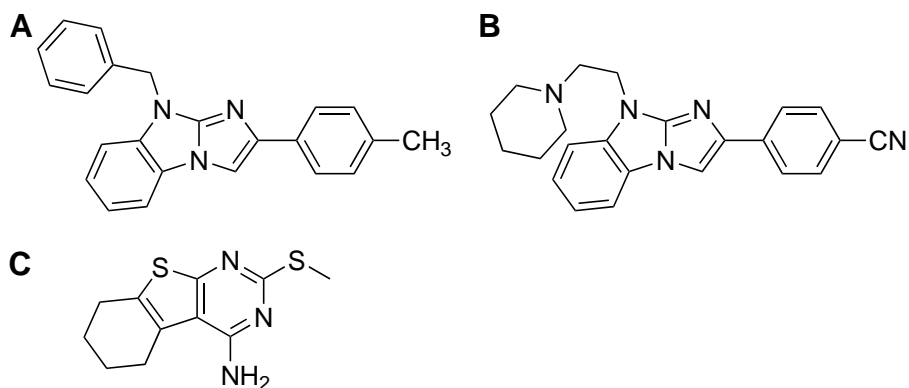
Da im Falle der hier betrachteten Modulatoren von ABCB1 aufgrund des starren Grundgerüsts und der meist geringen Anzahl an rotierbaren Bindungen davon auszugehen ist, dass mittels stochastischer Konformationssuche in einer kurzen Simulationszeit eine vollständige Abdeckung des Konformationsraums erreicht werden kann, wurde diese Methode für die Analyse der LM-Verbindungen ausgewählt. Die genauen Simulationsbedingungen sind Anhang C zu entnehmen.

#### 5.4.2.2 Alignment und Pharmakophor-Erstellung

Als Grundlage für die Erstellung eines Pharmakophormodells dient ein Alignment, in welchem die Konformationen aller aktiven Verbindungen möglichst exakt räumlich überlagert werden. Basierend auf diesem können die Substanzen anschließend miteinander verglichen und die für die Wirkung essentiellen Strukturmerkmale identifiziert werden [241]. Für die Generierung der in der vorliegenden Arbeit enthaltenen Modelle wurden unterschiedliche Alignments verwendet, deren Erstellung nachfolgend erläutert werden soll.

In der Regel erfolgte die Überlagerung der Strukturen mittels „Flexible Alignment“. Bei dieser Methode werden mehrere Moleküle simultan einer stochastischen Konformationssuche unterworfen und der zugehörige Überlagerungsraum ermittelt. Der Vergleich der für unterschiedliche Substanzen generierten Konformationen erfolgt dabei basierend auf einer Ähnlichkeitsfunktion, in die der Beitrag bestimmter Atome und Atomgruppen zu definierten physikochemischen Eigenschaften der Struktur (P-density) eingeht [244]. Auf diese Art werden in der Regel mehrere mögliche Überlagerungen erhalten, die anhand eines Scores, in den sowohl die Ähnlichkeit zweier Konformationen als auch deren potentielle Energie eingehen, bewertet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Modulatoren mit einem fixierten Template überlagert und die für das spätere Alignment verwendete Konformation durch visuelle und Score-basierte Beurteilung der Ergebnisse des Flexible Alignments ausgewählt.

Alternativ konnte eine manuelle Überlagerung der Substanzen durchgeführt werden. Diese Vorgehensweise wurde bei strukturell sehr ähnlichen Verbindungen wie z.B. den unterschiedlich substituierten N<sup>9</sup>-methylierten Imidazobenzimidazolen (LM-8.x) angewendet. Hier wurden die Konformationen für das Alignment ausgehend von einem geeigneten Template durch manuellen Austausch der sich unterscheidenden Reste und anschließende Energieminimierung des neuen Substituenten generiert.



**Abbildung 5.23:** Strukturen der als Templates für die unterschiedlichen Alignments verwendeten Verbindungen LM-14.2 (A), LM-25.8 (B) und Gü 139 (C).

### Alignment A1: Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ

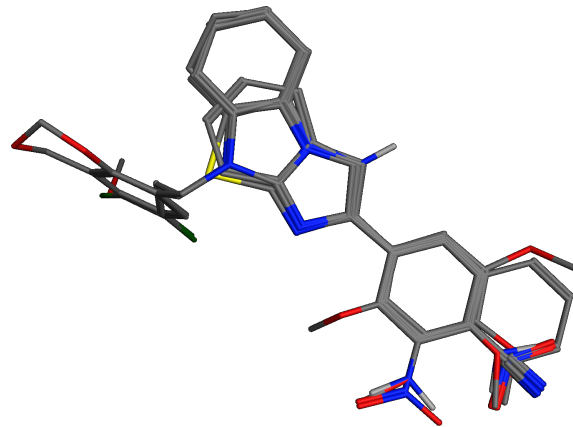
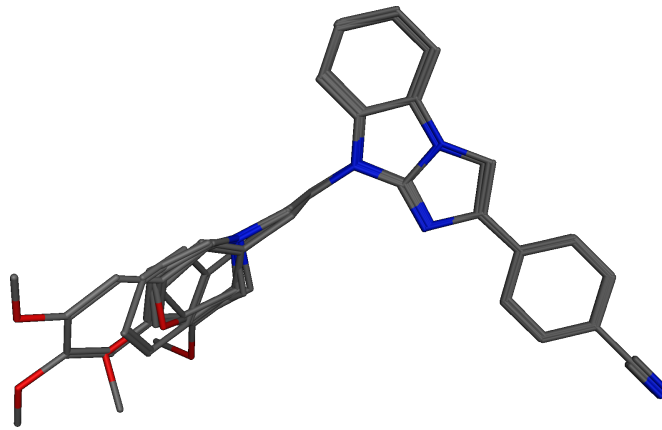
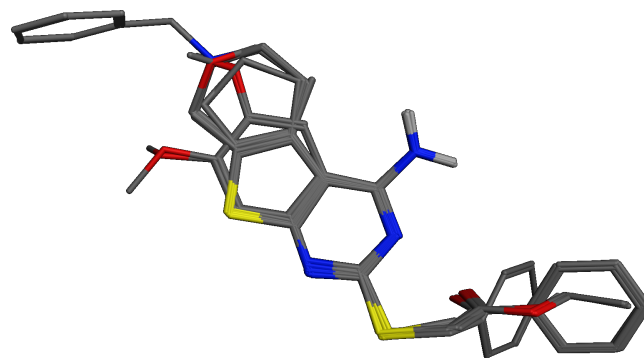
Bei der Erstellung des Alignments der aktivatorisch wirksamen LM-Verbindungen wurden all jene Substanzen berücksichtigt, für die in Kapitel 5.3.1 sowohl im Daunorubicin- als auch im Rhodamin 123-Akkumulationsassay aktivierende Wirksamkeit gegenüber ABCB1 nachgewiesen werden konnte (QB11, QB102, LM-7.x, LM-8.x, LM-14.x, LM-25.1, LM-25.5, LM-25.6, LM-25.9, LM-25.10, LM-H-1 und LM-H-10). Als Template für die Überlagerung diente die Verbindung LM-14.2 (Abbildung 5.23, A). Da für diese Substanz keine großen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen bei der stochastischen Konformationsuche erhaltenen Strukturen zu beobachten sind, wurde die energieärmste Konformation als Ausgangsstruktur für das Alignment festgelegt.

### Alignment A2: Inhibitoren vom Benzimidazol-Typ

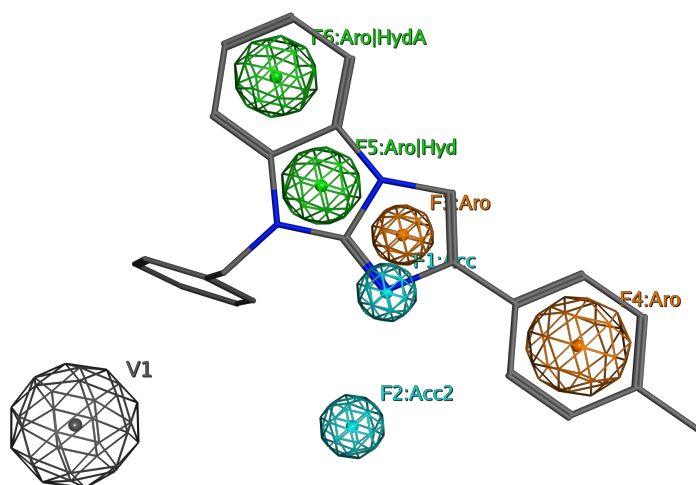
Ein zweites Alignment umfasste die inhibitorisch wirksamen Substanzen aus Tabelle 5.6 (LM-25.2, LM-25.3, LM-25.12, LM-25.21 bis 25.24). Hier wurde die energieärmste Konformation des LM-25.8 (Abbildung 5.23, B) als Template verwendet. Die 2-Aryl-1*H*-benzimidazole, welche unterschiedliche Effekte gegenüber Rhodamin 123 und Daunorubicin besitzen, wurden hier zunächst nicht einbezogen und später separat betrachtet.

### Alignment A3: Aktivatoren vom 4-Aminothienopyrimidin-Typ

Da zusätzlich die strukturellen Merkmale unterschiedlicher aktivierend wirksamer Verbindungsklassen verglichen werden sollten, wurde ein drittes Alignment unter Verwendung der Gü-Substanzen [214, 239] erstellt (Strukturen siehe Anhang B). Hierbei wurden alle im Daunorubicin-Akkumulationsassay aktivierend wirksamen Derivate berücksichtigt.

**Alignment A1****Alignment A2****Alignment A3**

**Abbildung 5.24:** Alignments der für die Erstellung der Pharmakophormodelle verwendeten Strukturen. A1: Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ, A2: Inhibitoren vom Benzimidazol-Typ, A3: Aktivatoren vom 4-Aminothienopyrimidin-Typ.



**Abbildung 5.25:** Pharmacophormodell für Aktivatoren von ABCB1 basierend auf Alignment A1. Orange: Aromatisches Zentrum (Aro), grün: hydrophobes Zentrum bzw. Atom (Hyd bzw. HydA), cyan: Wasserstoffbrückenakzeptor (Acc) und Projektion (Acc2), grau: Ausschlussvolumen (V1). Zusätzlich dargestellt ist die Struktur des als Template verwendeten LM-14.2.

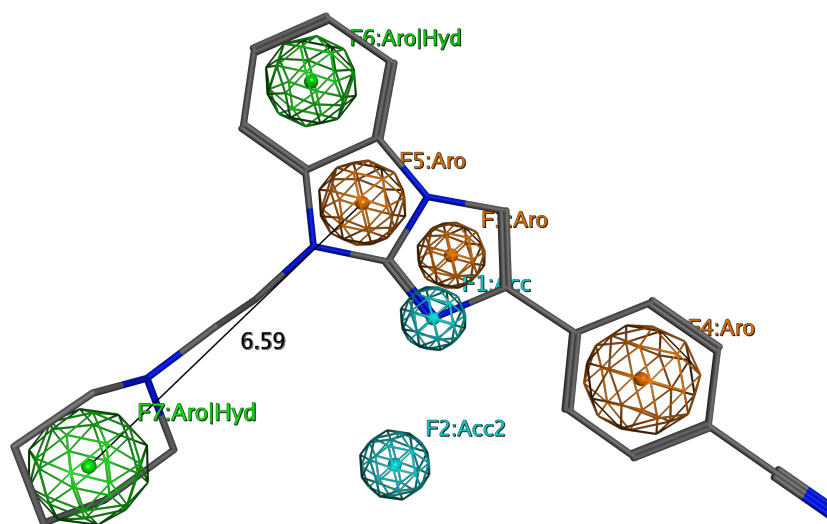
Basierend auf diesen Alignments (siehe Abbildung 5.24) wurden mittels des in MOE implementierten Moduls „Consensus“ die strukturellen Gemeinsamkeiten der Substanzen analysiert und verschiedene Pharmacophormodelle erstellt. Die exakte Vorgehensweise ist in Anhang C beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse sollen nachfolgend dargestellt werden.

### 5.4.3 Ergebnisse

Um die für die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports durch Derivate des QB11 und des QB102 essentiellen Strukturmerkmale zu charakterisieren wurde zunächst basierend auf den Substanzen, die gegenüber Daunorubicin und Rhodamin 123 aktivatorische Wirksamkeit besitzen, ein Pharmacophormodell erstellt. Jene Vertreter der 2-Aryl-1*H*-benzimidazole, die nur den Transport von Rhodamin 123 stimulieren, wurden von dieser Betrachtung zunächst ausgeschlossen, da in diesen Fällen von einer differierenden Interaktion mit dem Transporter ausgegangen werden muss.

Als wichtige Strukturelemente können die hydrophoben bzw. aromatischen Zentren (F3:Aro, F4:Aro, F5:Aro|Hyd, F6:Aro|HydA) sowie die Wasserstoffbrückenakzeptorfunktion (F1:Acc, F2:Acc2) identifiziert werden, wobei alle diese Bereiche in einer Ebene liegen (Abbildung 5.25).





**Abbildung 5.26:** Pharmacophormodell für Inhibitoren von ABCB1 basierend auf Alignment A2. Orange: Aromatisches Zentrum (Aro), grün: hydrophobes Zentrum (Hyd), cyan: Wasserstoffbrückenakzeptor (Acc) und Projektion (Acc2). Zusätzlich dargestellt ist die als Template eingesetzte Struktur des LM-25.8.

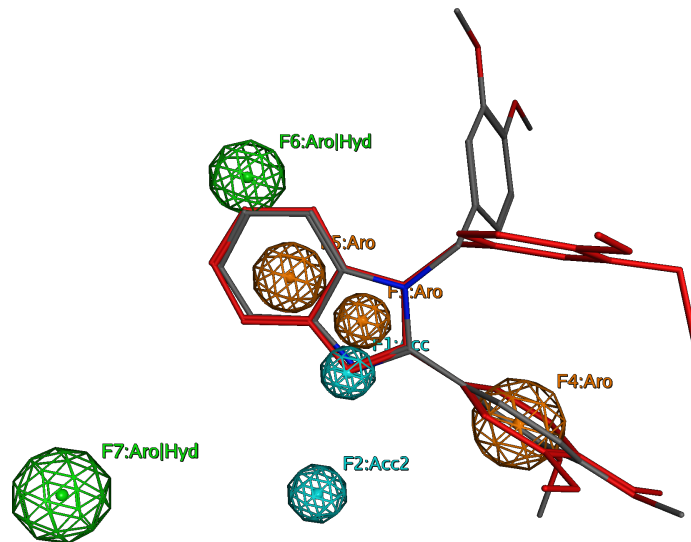
Basierend auf der hier untersuchten umfangreicheren Serie von Substanzen werden somit erwartungsgemäß vergleichbare strukturelle Voraussetzungen für die Aktivierung von ABCB1 erhalten, wie bei Pajeva *et al.* [237]. Insbesondere das Vorhandensein des Wasserstoffbrückenakzeptors (F1/F2) spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit der Verbindungen. Während beispielsweise das Benzimidazol LM-H-10 in der Lage ist, den ABCB1 vermittelten Transport zu stimulieren, besitzt das analoge 2-Phenylindol keinerlei Aktivität gegenüber dem Transporter (siehe Kapitel 5.3.1). Das hydrophobe Zentrum F6 hingegen scheint für die aktivierende Wirkung nicht essentiell zu sein.

Anhand der ausschließlich inhibierend wirksamen Benzimidazole aus Kapitel 5.3.1 sollten anschließend jene strukturellen Merkmale identifiziert werden, die zu einem vollständigen Verlust der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften dieser Substanzklasse führen. Hierbei wurden auch die Verbindungen einbezogen, die den Transport von Daunorubicin hemmen während gegenüber Rhodamin 123 keine Aktivität festgestellt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die  $pIC_{50}$ -Werte von Inhibitoren im Daunorubicin-Akkumulationsassay in der Regel über denen des Rhodamin 123-Akkumulationsassay liegen, ist in diesen Fällen dennoch von einem ähnlichen Effekt gegenüber beiden Substraten auszugehen, der jedoch erst in hohen Konzentrationen auftritt und unter Verwendung von Rhodamin 123 nicht detektierbar ist.

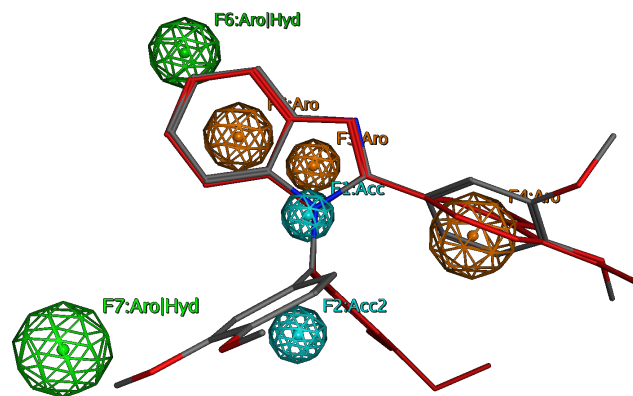
Basierend auf einem Alignment dieser Verbindungen (Alignment A2) wurde daher ein zweites Pharmakophormodell erstellt, welches in Abbildung 5.26 dargestellt ist. Hierbei ergeben sich die gleichen grundlegenden strukturellen Merkmale wie im Falle der Aktivatoren, wobei jedoch ein zusätzliches aromatisches oder hydrophobes Zentrum (F7:Aro|Hyd) im Abstand von 6,59 Å zum Aromaten F5 identifiziert werden kann. Neben aromatischen und zyklischen aliphatischen Substituenten in Position N<sup>9</sup> erreichen auch die aliphatischen Seitenketten des Diethylaminoethylrestes in LM-25.21 diesen Bereich. Somit scheint im Falle dieser Verbindungen alleine die Größe bzw. die Linkerlänge des Substituenten in Position N<sup>9</sup> entscheidend für den Verlust der aktivierenden Wirksamkeit der Benzimidazole zu sein; größere zyklische oder aromatische Reste sind hier nicht notwendig. Ausgehend von dieser Beobachtung kann das zusätzliche hydrophobe Zentrum (F7) der Inhibitoren als Ausschlussvolumen (V1 in Abbildung 5.25) für das Pharmakophormodell der Aktivatoren definiert werden, welches nicht durch einen Substituenten erreicht werden darf, um die aktivierenden Eigenschaften der Benzimidazole zu erhalten.

Anhand der zuvor erhaltenen Modelle kann jedoch nicht das Verhalten der N<sup>1</sup>-substituierten 2-Aryl-1*H*-benzimidazole LM-H-2, LM-H-6 und LM-H-7, die den ABCB1 vermittelten Transport von Daunorubicin hemmen während im Falle des Rhodamin 123 weiterhin eine aktivierende Wirksamkeit detektierbar ist (vgl. Tabelle 5.7), erklärt werden. In Abbildung 5.27 ist exemplarisch die Überlagerung des Inhibitorpharmakophors mit zwei ausgewählten Konformationen des LM-H-2 dargestellt. Dabei handelt es sich um die energieärmste (rot) sowie die dazu strukturell unähnlichste Konformation (grau), in welcher der N<sup>1</sup>-Substituent entgegengesetzt ausgerichtet ist. Diese wurde aus den bei der stochastischen Suche erhaltenen Strukturen mit Hilfe des in MOE enthaltenen Moduls „Diverse Subset“ ermittelt. Dieser Algorithmus erstellt basierend auf ihrer Ähnlichkeit (Berechnung des RMSD) eine Rangfolge von Konformationen, wobei jeweils die zu den bereits erfassten Strukturen am wenigsten ähnliche Konformation hinzugefügt wird. Wird hierbei beispielsweise von der energieärmsten Konformation des LM-H-2 ausgegangen, so steht die zu dieser am wenigsten ähnliche Struktur an zweiter Stelle der Rangfolge.

Anhand der Abbildung 5.27 wird deutlich, dass bei Übereinstimmung der aromatischen Strukturmerkmale (F3 und F5) und der Akzeptorfunktion (F1/F2) in diesem Fall keine Interaktion mit dem hydrophoben Zentrum F7 stattfinden kann, welche die inhibitorische Aktivität gegenüber Daunorubicin erklären würde. Der Verlust der aktivierenden Eigenschaften könnte jedoch auch auf die Anwesenheit des aromatischen N<sup>1</sup>-Substituenten in der dem hydrophoben Zentrum F7 entgegengesetzten Richtung zurückzuführen sein. Hier könnte es aus sterischen Gründen zu einer Aufhebung der aktivatorischen Wirksamkeit kommen. Diese Möglichkeit kann anhand des hier zur Verfügung stehenden Datensatzes jedoch nicht näher untersucht werden.



**Abbildung 5.27:** Vergleich der Struktur des LM-H-2 mit dem Pharmakophormodell für Inhibitoren wobei N<sup>3</sup> als Wasserstoffbrückenakzeptor dient. Dargestellt ist die energieärmste (rot) sowie die zu dieser am wenigsten ähnliche Konformation (grau).



**Abbildung 5.28:** Alternative Überlagerung der Struktur des LM-H-2 mit dem Pharmakophormodell für Inhibitoren wobei N<sup>1</sup> als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert. Dargestellt ist die energieärmste (rot) sowie die zu dieser am wenigsten ähnliche Konformation (grau).

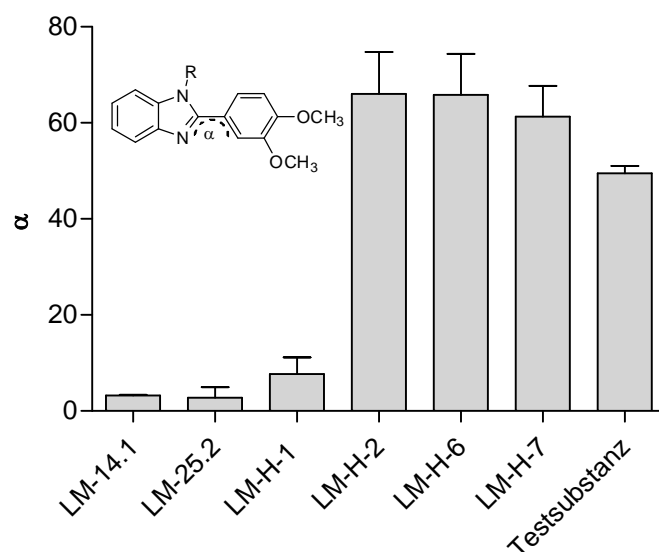
Ein alternatives Modell, bei welchem der substituierte Stickstoff N<sup>1</sup> als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert ist in Abbildung 5.28 dargestellt. Auch in diesem Fall kommt es zu keiner direkten Interaktion des N<sup>1</sup>-Substituenten mit dem hydrophoben Zentrum F7. Es wird jedoch deutlich, dass durch diesen keine Wasserstoffbrücke zwischen der Akzeptorfunktion und dem in der Ringebene liegenden korrespondierenden Donor (Acc2) gebildet werden kann. Die Donorfunktionalität des Transporters müsste bei einem derartigen Bindungsmodus demnach entgegen dem zuvor erstellten Modell – ebenso wie die freien Elektronen des N<sup>1</sup> – oberhalb der Ringebene lokalisiert sein. Anhand der vorliegenden Daten kann dieser Sachverhalt allerdings nicht umfassend geklärt werden.

Des Weiteren fällt jedoch auf, dass der 3,4-Dimethoxyphenylrest im Falle beider Konformationen des LM-H-2 nicht in der Ebene des Benzimidazolsystems liegt, sondern gegenüber diesem gedreht ist (siehe Abbildungen 5.27 und 5.28).

Um dies näher zu untersuchen wurde für verschiedene LM-Verbindungen der Torsionswinkel ( $\alpha$ ) zwischen dem Benzimidazol-Grundgerüst und dem Phenylrest aller bei einer stochastischen Konformationssuche erhaltenen Strukturen berechnet (MOE 2009.10). Dieser kann prinzipiell zwischen 0 und 90° liegen. Da sich die für die unterschiedlichen Konformationen jeder Substanz berechneten Winkel insgesamt nur wenig unterscheiden und normalverteilt sind, werden nachfolgend die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aller Konformationen betrachtet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5.29 grafisch dargestellt.

Es zeigt sich zunächst, dass im Falle der Aktivatoren LM-14.1 und LM-H-1 mittlere Torsionswinkel von 3,3 bzw. 7,7° erhalten werden. Somit bilden das Benzimidazolgrundgerüst und der Phenylsubstituent eine Ebene. Dies trifft auch auf das 9*H*-Imidazobenzimidazol LM-25.2 zu, dessen inhibitorische Aktivität entsprechend dem zugehörigen Pharmakophor (vgl. Abbildung 5.26) auf das Vorhandensein des voluminösen Substituenten in Position N<sup>9</sup> zurückzuführen ist. Dagegen weisen alle an N<sup>1</sup> substituierten 2-Aryl-1*H*-benzimidazole (LM-H-2, LM-H-6, LM-H-7) Torsionswinkel über 60° auf. Die Planarität des gesamten aromatischen Systems ist somit in diesen Fällen nicht gegeben, was zum Verlust der aktivierenden Eigenschaften gegenüber Daunorubicin führen könnte. Im Falle des Rhodamin 123 hingegen bleibt die Wirksamkeit trotz dieser strukturellen Veränderung erhalten, sodass von einer unterschiedlichen Interaktion der Modulatoren mit den verschiedenen Substraten ausgegangen werden kann.

Um sicherzustellen, dass diese Beobachtung nicht auf das Artefakt einer bei der Konformationsanalyse im Vakuum auftretenden Interaktion zwischen dem 3,4-Dimethoxyphenylrest des Grundgerüsts und dem aromatischen Substituenten in Position N<sup>1</sup> zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 5.27 und 5.28, rot), wurde zusätzlich die Struktur einer zu den LM-H-Derivaten analogen hypothetischen Testsubstanz mit einer Methylgruppe an N<sup>1</sup> generiert. Die bei einer

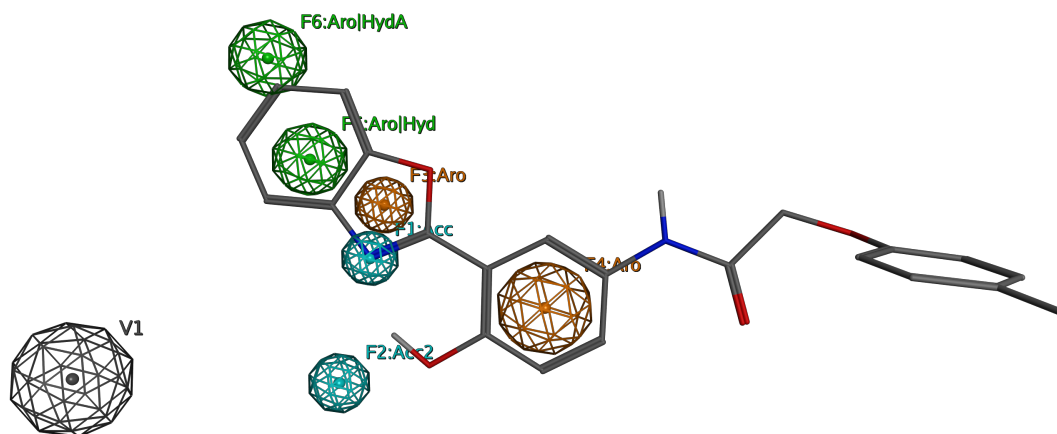


**Abbildung 5.29:** Torsionswinkel ( $\alpha$ ) zwischen Benzimidazol- und Phenylpartialstruktur ausgewählter 2-Aryl-1*H*-benzimidazole. Neben den LM-Verbindungen wurde zusätzlich eine hypothetische Testsubstanz mit R = Methyl analysiert. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung aller bei der stochastischen Suche erhaltenen Konformationen.

stochastischen Suche erhaltenen Konformationen dieser Verbindung weisen einen mittleren Torsionswinkel von etwa  $50^\circ$  auf. Somit führt bereits der Methylsubstituent in Position N<sup>1</sup> zum Verlust der Planarität des Grundgerüsts, sodass dieser tatsächlich als eine mögliche Ursache für die fehlende aktivierende Wirksamkeit der Substanzen LM-H-2, LM-H-6 und LM-H-7 gegenüber Daunorubicin angesehen werden kann.

Ähnliche Tendenzen zeigten sich auch innerhalb der bei Kondratov *et al.* beschriebenen Substanzreihe [123]. Eine Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports von Rhodamin 123 und Daunorubicin wurde hier lediglich für die starren, vollständig planaren Substanzen QB11, QB13 und QB102 beschrieben. Die übrigen Derivate, welche sich in vielen Fällen durch weitaus voluminösere oder flexiblere Strukturen auszeichnen, waren dagegen nur in der Lage, den Transport von Rhodamin 123 zu stimulieren, während kein Einfluss auf den Daunorubicin Efflux beobachtet werden konnte.

Unter Verwendung des zuvor erstellten Modells für Aktivatoren wurde daher eine Pharmakophorsuche mit diesem Literaturdatensatz (Strukturen siehe Anhang B) durchgeführt. Erwartungsgemäß werden bei dieser QB11, QB13 und QB102 als aktive Verbindungen erkannt, während die übrigen Substanzen die strukturellen Voraussetzungen für eine Stimulation des Daunorubicin- und Rhodamin 123-Transports nicht erfüllen. Eine Ausnahme bildet hier die Verbindung QB10, die ebenfalls als aktiv erkannt wird obwohl sie laut Kondratov *et al.* gegenüber Daunorubicin keine Aktivität besitzt [123]. Dies ist auf die planare Grundstruktur, welche der der 2-Aryl-1*H*-benzimidazole stark ähnelt, zurückzuführen (sie-

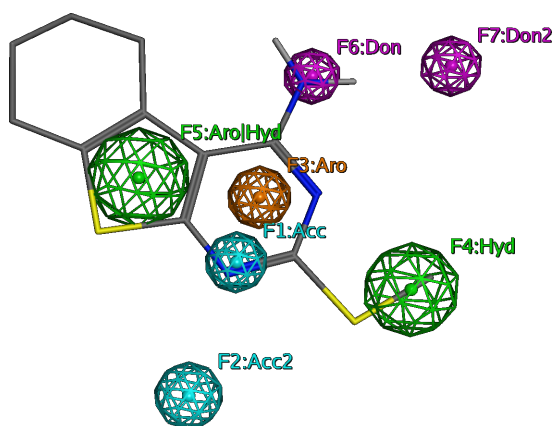


**Abbildung 5.30:** Ergebnis der Pharmakophorsuche der QB-Derivate aus [123]. Dargestellt ist die Überlagerung des Aktivator-Pharmakophors mit der am besten übereinstimmenden Konformation des QB10.

he Abbildung 5.30). Der Verlust der aktivierenden Wirksamkeit gegenüber Daunorubicin kann hier auf den großen Substituenten am Phenylring zurückzuführen sein. Da in dem für die Erstellung des Pharmakophormodells verwendeten Datensatz keine Verbindungen mit derartigen strukturellen Merkmalen enthalten waren, kann dessen Einfluss auf die Wirksamkeit nicht charakterisiert werden. Bei der Pharmakophorsuche wird dieser Substituent entsprechend nicht berücksichtigt, sodass QB10 ebenfalls als Aktivator identifiziert wird.

Insgesamt sind somit für die Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports von Daunorubicin sehr spezielle Strukturmerkmale notwendig. Die erstellten Pharmakophormodelle besitzen entsprechend nur für dieses Substrat Gültigkeit. Im Falle des Rhodamin 123-Transports können hingegen aufgrund der größeren strukturellen Diversität der entsprechenden Aktivatoren keine derartig eindeutigen Aussagen getroffen werden. Grundsätzlich beinhalten jedoch auch diese Modulatoren mehrere hydrophobe bzw. aromatische Bereiche sowie verschiedene Wasserstoffbrückenakzeptorfunktionen.

Anschließend sollte das ausschließlich auf den Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ beruhende Modell mit den strukturell sehr eng verwandten 4-Aminothienopyrimidinen verglichen werden (Strukturen siehe Anhang B). Basierend auf dem Alignment A3 wurden auch hier mittels „Consensus“ die charakteristischen Strukturmerkmale all jener Verbindungen, die im Daunorubicin-Akkumulationsassay aktivierende Wirksamkeit gegenüber ABCB1 aufweisen



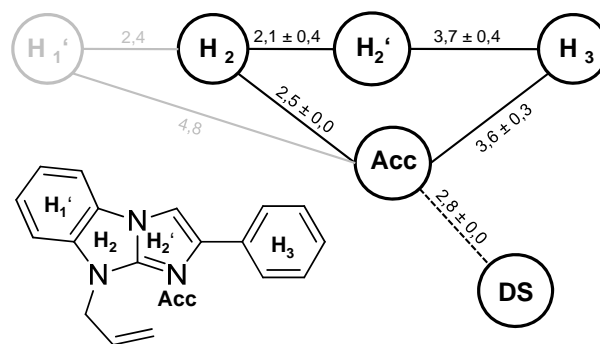
**Abbildung 5.31:** Pharmakophor der Aktivatoren vom 4-Aminothienopyrimidin-Typ mit der Struktur des Templates Gü 139. Orange: Aromatisches Zentrum, grün: hydrophobes Zentrum, cyan: Wasserstoffbrückenakzeptor und Projektion, magenta: Wasserstoffbrückendonator und Projektion. Das Modell basiert auf Alignment A3.

[214, 239] identifiziert.

Erwartungsgemäß ergeben sich dabei prinzipiell ähnliche Merkmale, wie im Falle der Benzimidazole (siehe Abbildung 5.31). Die zusätzlich vorhandene Wasserstoffbrückendonorfunktion (F6:Don/F7:Don2) ist aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse als nicht essentiell für die aktivatorische Wirksamkeit der Verbindungen einzuordnen. Des Weiteren wird deutlich, dass das Zentrum F4 nicht in jedem Fall aromatisch sein muss. Da auch Verbindungen mit aliphatischen Thioetherstrukturen Aktivität besitzen, scheint hier die Anwesenheit eines hydrophoben Restes (F4:Hyd) ausreichend zu sein. In Analogie zu den zuvor beschriebenen Modellen liegen des Weiteren auch hier alle essentiellen Strukturmerkmale in einer Ebene, was die Wichtigkeit der Planarität der Strukturen für die Aktivierung von ABCB1 zusätzlich unterstreicht. Solange diese gewährleistet ist können offenbar viele der aromatischen Zentren durch nicht-aromatische hydrophobe Strukturen ersetzt werden.

Basierend auf den verschiedenen Pharmakophormodellen können schließlich die für die Aktivierung von ABCB1 essentiellen Strukturmerkmale entsprechend Abbildung 5.32 zusammengefasst werden: Neben den aromatischen oder hydrophoben Zentren H<sub>1</sub>-H<sub>3</sub> wird für die aktivierende Wirksamkeit ein Wasserstoffbrückenakzeptor (Acc) benötigt. Wie sich anhand der Aktivität der 2-Aryl-1*H*-benzimidazole und der 4-Aminothienopyrimidine ableiten lässt, ist dabei das hydrophobe Zentrum H<sub>1</sub>' für die Wirkung nicht essentiell. Große Substituenten an H<sub>2</sub> führen hingegen zum Verlust der aktivierenden Eigenschaften. Die Planarität des gesamten Grundgerüsts ist eine weitere grundlegende Voraussetzung für die aktivatorischen Eigenschaften der Verbindungen.

Somit kann das bereits in Kapitel 5.3.1 vorgestellte Modell von Pajeva *et al.* [237] anhand der



**Abbildung 5.32:** Zusammenfassung der für Aktivatoren von ABCB1 charakteristischen Strukturmerkmale am Beispiel des QB11 (H = hydrophobes Zentrum, Acc = Wasserstoffbrückenakzeptor, DS = Donorfunktion des Transporters). Das in grau dargestellte hydrophobe Zentrum  $H_1'$  ist für die Wirkung nicht essentiell. Die angegebenen Abstände stellen den Mittelwert  $\pm$  SD aus den unter Verwendung der Alignments A1 und A3 erhaltenen Modellen dar.

hier erhobenen Daten bestätigt und um ein hydrophobes Zentrum ( $H_1'$ ) reduziert werden. Diese Betrachtungen beziehen sich jedoch nur auf solche Verbindungen, die in der Lage sind, den ABCB1 vermittelten Transport von Daunorubicin und Rhodamin 123 zu stimulieren. Aktivatoren des Rhodamin 123-Transports, die keine Wirksamkeit gegenüber Daunorubicin besitzen, zeichnen sich durch eine größere strukturelle Vielfalt und weniger streng definierte Strukturmerkmale aus.



# 6 Acridonsäureamide als Modulatoren von ABCB1 und ABCG2

## 6.1 Derivate des GF120918 als Inhibitoren von ABCB1

### 6.1.1 Funktionelle Untersuchungen an ABCB1

Das Acridonsäureamid GF120918 (Elacridar, Abbildung 6.1) stellt einen der potentesten bekannten Inhibitoren von ABCB1 dar, dessen Wirksamkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte [101, 102]. Neben der ABCB1 inhibitorischen Aktivität besitzt die Substanz auch gegenüber ABCG2 MDR-modulierende Eigenschaften [106], während der ABCC1 und ABCC2 vermittelte Transport unbeeinflusst bleibt [103, 105]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Serie von Derivaten des GF120918, die von Matthias Christlieb synthetisiert wurde [245], hinsichtlich ihrer ABCB1 inhibierenden Eigenschaften untersucht. Innerhalb dieser Gruppe von Substanzen wurde sowohl die Acridonsäurepartialstruktur als auch das Substitutionsmuster des 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolin-Restes variiert.

Die Aktivität der GF120918-Derivate gegenüber ABCB1 wurde mittels des Rhodamin 123-Akkumulationsassays unter Verwendung der Zelllinie A2780 Adr und der zugehörigen sensitiven Zelllinie A2780 ermittelt (siehe Tabelle 6.1). Der hier bestimmte  $pIC_{50}$ -Wert der Ausgangsverbindung GF120918 von 6,69 ( $IC_{50} = 0,20 \mu\text{mol/l}$ ) liegt dabei in der Größenordnung

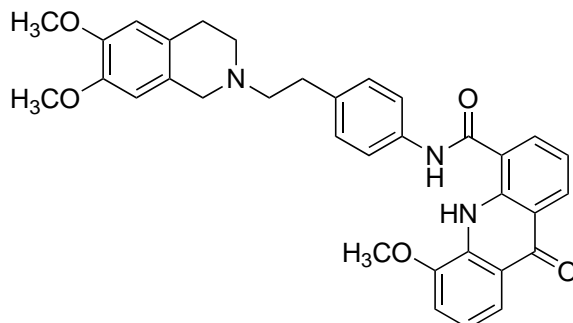
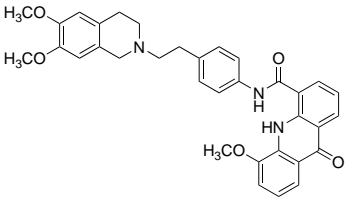
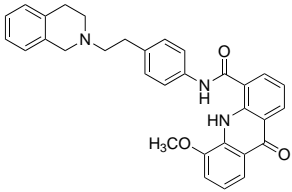
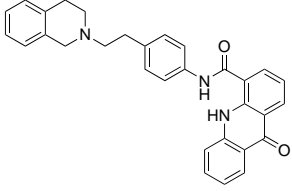
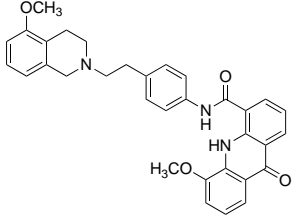


Abbildung 6.1: Struktur des Acridonsäureamids GF120918 (Elacridar).

der in der Literatur veröffentlichten Werte [102, 105, 210]. Diese wurden mit unterschiedlichen Methoden ermittelt und liegen in der Regel zwischen 0,02 und 0,5  $\mu\text{mol/l}$ .

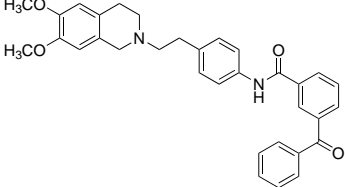
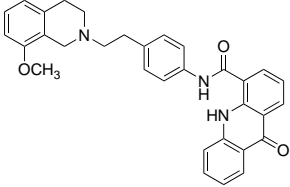
**Tabelle 6.1:** Untersuchung der ABCB1 inhibitorischen Eigenschaften der GF120918-Derivate im Rhodamin 123- und Hoechst 33342-Akkumulationsassay (1  $\mu\text{mol/l}$  Hoechst 33342) unter Verwendung von A2780 Adr Zellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängigen Experimenten (k.E.: kein Effekt bis 10  $\mu\text{mol/l}$ ).

Substanz	Struktur	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SD}$ (Rho 123)	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SD}$ (Hoe 33342)
GF120918		$6,69 \pm 0,23$	$7,19 \pm 0,18$
MAC-192		$4,51 \pm 0,13$	$6,08 \pm 0,16$
MAC-198		$4,92 \pm 0,09$	$6,05 \pm 0,09$
MAC-206		k.E.	$5,62 \pm 0,32$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pIC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pIC <sub>50</sub> ± SD (Hoe 33342)
MAC-235		4,52 ± 0,19	6,34 ± 0,11
MAC-240		4,64 ± 0,11	6,19 ± 0,14
MAC-252		k.E.	6,05 ± 0,11
MAC-257		5,84 ± 0,10	6,76 ± 0,09
MAC-275		5,70 ± 0,10	6,10 ± 0,11
MAC-289		4,84 ± 0,12	6,11 ± 0,06

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pIC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)	pIC <sub>50</sub> ± SD (Hoe 33342)
MAC-306		5,56 ± 0,10	6,07 ± 0,14
MAC-315		k.E.	6,01 ± 0,14

Im Falle der von GF120918 abgeleiteten Derivate besitzen relativ kleine strukturelle Modifikationen einen großen Einfluss auf die Fähigkeit der Substanzen, den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 zu hemmen (vgl. Tabelle 6.1). So besitzt beispielsweise MAC-257 mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 5,84 eine um den Faktor 7 reduzierte Aktivität gegenüber ABCB1, obwohl es sich von der Ausgangsverbindung nur durch das Fehlen der Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäure unterscheidet.

Weitere Modifikationen der Acridonsäurepartialstruktur führen ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der inhibitorischen Wirksamkeit der Substanzen, wobei insbesondere der Carbonylfunktion ein großer Einfluss zuzuschreiben ist. Dies wird anhand der zu GF120918 analogen Verbindung MAC-275 deutlich, die mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 5,70 eine verglichen mit der Ausgangssubstanz zehnfach geringere Hemmwirkung aufweist. Ein identischer Effekt kann im Falle der Verbindungen ohne C<sup>5</sup>-Methoxygruppe beobachtet werden. Auch MAC-289 (pIC<sub>50</sub> = 4,84) besitzt eine um den Faktor 10 geringere Aktivität als das entsprechende Acridonsäurederivat MAC-257. Hierbei scheint das Vorliegen einer nicht zyklischen Aminstruktur anstelle der Acridonsäure von untergeordneter Bedeutung für die beobachtete Aktivitätsverringerng zu sein, da das ebenfalls nicht zyklisierte Benzophenonderivat MAC-306 (pIC<sub>50</sub> = 5,56) nur eine geringfügig schwächere Wirksamkeit als MAC-257 besitzt. Auch der Einfluss der H-Brückendonorfunktion der Acridonsäure auf die Bindung des Inhibitors an ABCB1 ist aufgrund dieser Daten als deutlich geringer einzuschätzen als jener der H-Akzeptorfunktionalität.

Diese Beobachtungen bestätigen die Erkenntnisse von Dodic *et al.*, welche die essentiellen strukturellen Merkmale derartiger hochpotenter Inhibitoren von ABCB1 identifizierten [102]. Hier erwiesen sich insbesondere Acridonsäureamide wie das GF120918 als gut wirksame Modulatoren, wobei auch hier das Fehlen der Carbonylgruppe zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität führte. Des Weiteren konnte in der zitierten Arbeit die Wirksamkeit der Verbindungen durch das Einbringen unterschiedlicher Substituenten in Position C<sup>5</sup> zusätzlich gesteigert werden.

Die Variation des Methoxy-Substitutionsmusters der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur besitzt ebenfalls einen erstaunlich großen Einfluss auf die Fähigkeit der Substanzen, den Rhodamin 123-Transport zu inhibieren. So besitzen die unsubstituierten Derivate MAC-192 und MAC-198 lediglich IC<sub>50</sub>-Werte im mittleren mikromolaren Bereich (vgl. Tabelle 6.1). Des Weiteren weisen auch die monosubstituierten Verbindungen erst in gegenüber GF120918 hundertfach erhöhter Konzentration ABCB1 inhibierende Eigenschaften auf bzw. sind vollständig inaktiv.

In der bereits erwähnten Studie von Dodic *et al.* zeigten ebenfalls jene Substanzen, die im basischen Molekülteil ein o-Dimethoxy-Substitutionsmuster aufwiesen, eine deutlich stärkere Wirksamkeit als die entsprechenden unsubstituierten Derivate [102]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen und unterstreichen den starken Einfluss dieses Strukturmerkmals auf die inhibitorische Wirkung der Acridonsäureamide gegenüber ABCB1. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die beiden strukturell sehr eng verwandten Substanzen XR9576 (Tariquidar) und XR9577 (siehe Kapitel 4.2.4): Während XR9576 einen hochpotenten Inhibitor von ABCB1 darstellt, besitzt XR9577, das entsprechende Derivat ohne 6,7-Dimethoxy substitution, eine um den Faktor fünf reduzierte Wirksamkeit [211]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektierten, durch sehr geringfügige strukturelle Modifikationen innerhalb der Serie von GF120918-Derivaten verursachten Aktivitätsunterschiede sind jedoch weitaus größer.

Auch in der Literatur existieren Berichte über Inhibitoren von ABCB1, bei denen minimale strukturelle Variationen zu massiven Aktivitätsunterschieden führen. So wurde unter anderem für Chinidin eine gegenüber dessen Stereoisomer Chinin um den Faktor 5-100 gesteigerte Wirksamkeit festgestellt ([246], siehe auch Abbildung 6.9). Ein weiteres Beispiel stellen die cis/trans-Isomere des als Neuroleptikum eingesetzten Dopaminantagonisten Flupentixol dar. Zwar sind beide Isomere in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport zu hemmen, sie besitzen jedoch deutlich unterschiedlichen Einfluss unter anderem auf die ATPase-Aktivität des Transporters. Während cis-Flupentixol sowohl die basale ATPase-Aktivität als auch die Bindung des Substratanalogons [<sup>125</sup>I]IAAP stimuliert, besitzt das trans-Isomer in beiden Fällen eine inhibitorische Wirkung [72].

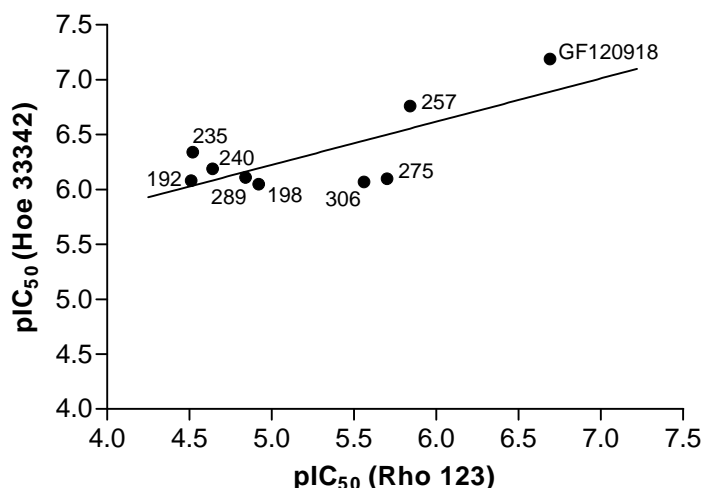
Um diese – insbesondere vor dem Hintergrund des breiten Substratspektrums des ABCB1 – erstaunlichen Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Acridonsäureamide zusätzlich in einem zweiten Testsystem, dem Hoechst 33342-Akkumulationsassay, untersucht (siehe Tabelle 6.1). Auch in diesem Fall wurde mit einem  $pIC_{50}$ -Wert von 7,19 ( $IC_{50} = 0,06 \mu\text{mol/l}$ ) für die Ausgangsverbindung GF120918 eine Aktivität im Bereich der Literaturdaten ermittelt [102, 105, 210]. Insgesamt sind die in diesem Testsystem gemessenen  $pIC_{50}$ -Werte etwas höher als die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay bestimmten.

Hinsichtlich des Einflusses von Modifikationen der Acridonsäure auf die Wirksamkeit der Verbindungen können innerhalb der im Hoechst 33342-Akkumulationsassay generierten Daten ähnliche Tendenzen erkannt werden, wie im Falle der Rhodamin 123-Daten. Die Abwesenheit der  $C^5$ -Methoxygruppe in MAC-257 führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Wirksamkeit ( $pIC_{50} = 6,76$ ), die jedoch schwächer ausgeprägt ist, als im Falle von Rhodamin 123. Auch die Verbindung MAC-275 besitzt hier mit einem  $pIC_{50}$ -Wert von 6,10 eine etwa zehnfach geringere Aktivität als GF120918, was die Wichtigkeit der Carbonylfunktion der Acridonsäure für die Interaktion mit ABCB1 weiter unterstreicht. Signifikante Differenzen hinsichtlich der Wirksamkeit der beiden azyklischen Derivate MAC-289 und MAC-306 können hier im Gegensatz zu den im Rhodamin 123-Akkumulationsassay erhaltenen Ergebnissen jedoch nicht festgestellt werden.

Deutliche Unterschiede zwischen der ABCB1 inhibitorischen Aktivität gegenüber Rhodamin 123 und Hoechst 33342 können dagegen im Falle der Verbindungen mit modifizierter Tetrahydroisochinolinpartialstruktur festgestellt werden. Die unsubstituierten Derivate MAC-192 und MAC-198 besitzen im Hoechst 33342-Akkumulationsassay eine inhibitorische Aktivität mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration im Bereich von  $1 \mu\text{mol/l}$ , wobei hier jedoch kein zusätzlicher Einfluss der Methoxygruppe in Position  $C^5$  der Acridonsäure zu beobachten ist.

Auch die monosubstituierten Verbindungen, inklusive der im Rhodamin 123-Akkumulationsassay inaktiven Derivate MAC-206 ( $pIC_{50} = 5,62$ ) und MAC-252 ( $pIC_{50} = 6,05$ ), weisen hier bereits in mikromolaren Konzentrationen eine eindeutige ABCB1 inhibitorische Wirksamkeit auf. Dabei unterscheiden sich die Aktivitätsdaten, der unterschiedlich substituierten Substanzen nur wenig. Das Einbringen einer Methoxygruppe in Position 8 des Tetrahydroisochinolins in MAC-252 führt verglichen mit der unsubstituierten Verbindung MAC-192 zu keiner Veränderung des  $pIC_{50}$ -Wertes. Ebenso wie im Falle des Substanzpaares MAC-192 und MAC-198 besitzt auch hier das Fehlen der  $C^5$ -Methoxygruppe an der Acridonsäurepartialstruktur des MAC-315 ( $pIC_{50} = 6,01$ ) keinen Einfluss auf die Wirksamkeit.

Anhand der Verbindung MAC-240 wird deutlich, dass der Beitrag der 7-Methoxygruppe zu der sehr guten biologischen Aktivität des GF120918 vermutlich eher gering ist. Mit einem



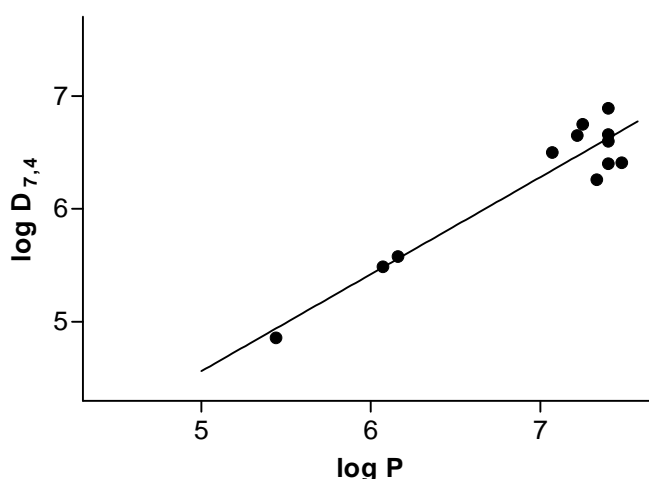
**Abbildung 6.2:** Korrelation der im Rhodamin 123- und Hoechst 33342-Akkumulationsassay erhaltenen pIC<sub>50</sub>-Werte ( $r^2 = 0,551$ ). Nicht dargestellt sind die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay inaktiven Substanzen MAC-206, MAC-252 und MAC-315.

pIC<sub>50</sub>-Wert von 6,19 besitzt die Verbindung keine gegenüber dem unsubstituierten Derivat MAC-192 signifikant erhöhte Wirksamkeit. Als geringfügig größer ist der Einfluss des Methoxyrestes in Position 6 der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur einzuschätzen, da die inhibitorische Aktivität des MAC-235 (pIC<sub>50</sub> = 6,34) entsprechend höher ist. Beide Einflüsse erklären jedoch nicht die außergewöhnlich starke Wirksamkeit des GF120918, sodass hier nicht von rein additiven Effekten der beiden Substituenten ausgegangen werden kann.

Die Aktivität des 5-Methoxytetrahydroisochinolins MAC-206 hingegen ist mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 5,62 tendenziell geringer, als die des unsubstituierten Vertreters MAC-192 sowie der weiteren monosubstituierten Verbindungen. Möglicherweise wirkt sich die Anwesenheit eines Substituenten in dieser Position aus sterischen Gründen negativ auf die ABCB1 inhibitorische Wirksamkeit dieser Substanzklasse aus.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass innerhalb der Gruppe der hier untersuchten Derivate des GF120918 sowohl im Rhodamin 123- als auch im Hoechst 33342-Akkumulationsassay ähnliche Tendenzen hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen festzustellen sind. Dabei sind die bei Verwendung des Substrates Rhodamin 123 detektierten Aktivitätsunterschiede deutlich stärker ausgeprägt, wobei einige Substanzen sogar keinerlei Wirksamkeit gegenüber ABCB1 aufweisen. Die im Hoechst 33342-Akkumulationsassay erhaltenen pIC<sub>50</sub>-Werte liegen hingegen in einem deutlich engeren Bereich; strukturelle Modifikationen wirken sich hier weniger stark auf die Wirksamkeit der Verbindungen aus.

Dies wird auch beim direkten Vergleich der in beiden funktionellen Testsystemen erhaltenen Aktivitätsdaten deutlich (siehe Abbildung 6.2). Im Gegensatz zu vielen anderen ABCB1-



**Abbildung 6.3:** Korrelation der für die GF120918-Derivate berechneten log P und log D (pH 7,4) Werte.  $r^2 = 0,898$ .

Inhibitoren korrelieren die mit den verschiedenen Methoden ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte innerhalb dieser Serie von Substanzen nur mäßig ( $r^2 = 0,551$ ), was unter anderem auf die sehr ähnlichen Aktivitätswerte im Hoechst 33342-Akkumulationsassay zurückzuführen ist. Des Weiteren sind einige Substanzen im Rhodamin 123-Akkumulationsassay vollkommen inaktiv und können hier nicht berücksichtigt werden.

Da im Rhodamin 132-Akkumulationsassay deutlichere Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Verbindungen festgestellt werden können, beziehen sich die nachfolgenden Betrachtungen auf diese Daten. Unter Verwendung der Hoechst 33342-Daten werden ähnliche Ergebnisse erhalten, die jedoch nicht ausführlich dargestellt werden sollen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Bindung von Substraten an ABCB1 mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran erfolgt [45, 48, 50], kann die Akkumulation eines Modulators in dieser als mitbestimmend für dessen Aktivität angesehen werden. So konnte in verschiedenen Studien ein direkter Zusammenhang zwischen Lipophilie und ABCB1 inhibitorischer Aktivität festgestellt werden [179, 247, 248].

Um ausschließen zu können, dass die Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Acridonsäureamiden ausschließlich auf eine differierende Verteilung der Substanzen in die Zytoplasmamembran zurückzuführen sind, wurden zunächst die Verteilungskoeffizienten der Verbindungen berechnet (ACD 5.09, Advanced Chemistry Development Inc. Toronto, Kanada). Hierbei wurden aufgrund der schwachen Basizität der Substanzen sowohl die Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten (log P) als auch jene bei physiologischem pH-Wert (log D<sub>7,4</sub>) ermittelt.

In Abbildung 6.3 ist zu erkennen, dass eine gute Korrelation der Octanol-Wasser Verteilungs-



koeffizienten mit den bei physiologischem pH-Wert ermittelten Werten vorliegt ( $r^2 = 0,898$ ). Da die strukturellen Modifikationen innerhalb der untersuchten Serie von Substanzen nur einen geringen Einfluss auf die Basizität der Verbindungen besitzen, war diese Beobachtung zu erwarten. Die weiteren Betrachtungen beziehen sich auf log P-Werte.

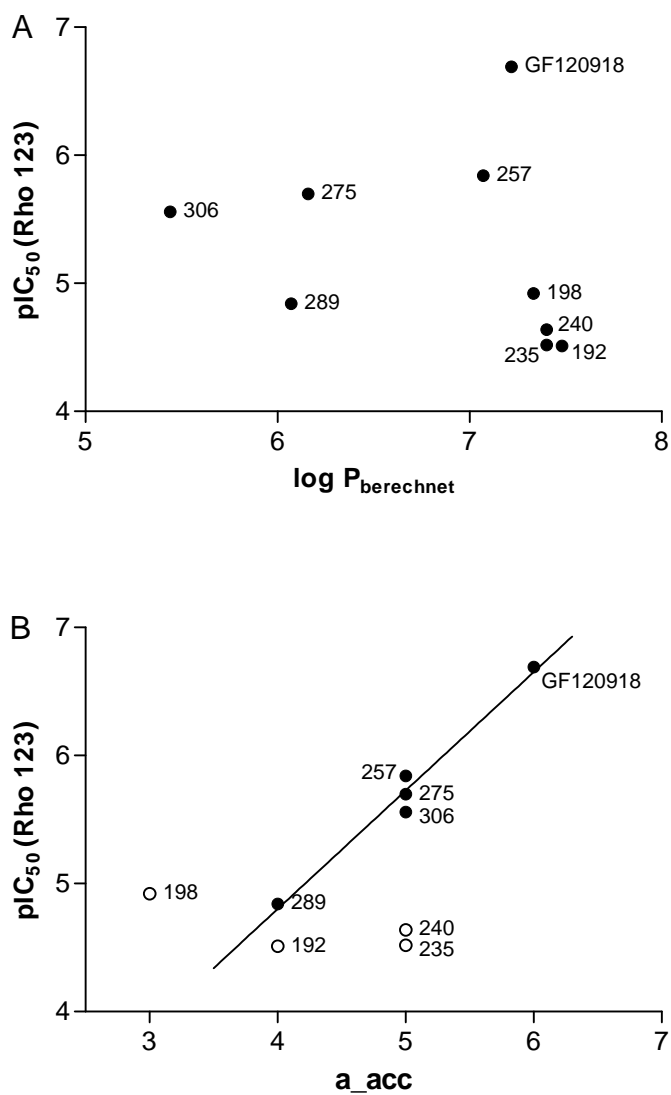
Ein Zusammenhang zwischen Lipophilie und ABCB1 inhibitorischer Aktivität im Rhodamin 123-Akkumulationsassay kann hier nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 6.4, A). Da sich die innerhalb der Substanz-Reihe eingeführten strukturellen Modifikationen – insbesondere die Variationen des Methoxygruppen-Substitutionsmusters – nur geringfügig auf die Lipophilie der Verbindungen auswirken, aber dennoch großen Einfluss auf deren Wirksamkeit besitzen, war dieses Ergebnis zu erwarten. Somit sind die innerhalb der Gruppe der GF120918-Derivate festgestellten Aktivitätsunterschiede nicht auf den unspezifischen Effekt einer variablen Verteilung in die Zellmembran sondern auf die direkte Interaktion mit dem Protein zurückzuführen.

Anhand der Testungsdaten in Tabelle 6.1 wird deutlich, dass insbesondere die in unterschiedlichen Positionen des Moleküls eingefügten, als Wasserstoffbrückenakzeptor fungierenden Methoxygruppen einen erstaunlich großen Einfluss auf die Wirksamkeit der Verbindungen besitzen. Ähnliche Effekte wurden auch in der Literatur beschrieben. So konnten Ecker *et al.* anhand einer Serie von Propafenonderivaten zeigen, dass die ABCB1 inhibitorische Aktivität dieser Substanzen hauptsächlich durch deren Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und weniger durch ihre Lipophilie oder Basizität beeinflusst wird [179, 249].

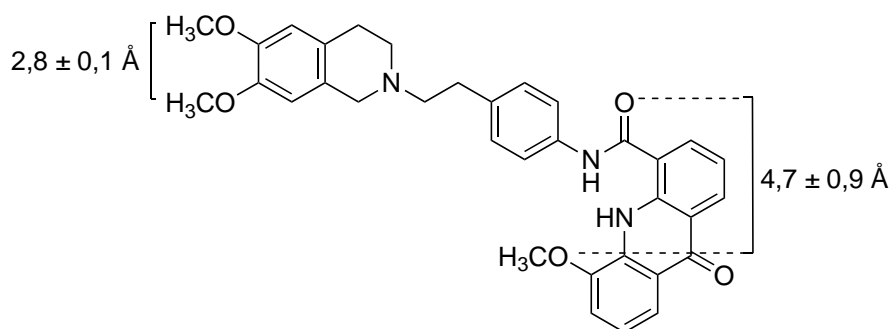
Innerhalb der hier untersuchten Gruppe von Substanzen kann ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit der Verbindungen und der Anzahl der im Molekül enthaltenen Wasserstoffbrückenakzeptorfunktionen festgestellt werden (siehe Abbildung 6.4, B). So korrelieren die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte im Falle der an der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur in Position 6 und 7 substituierten Verbindungen insgesamt gut mit der Gesamtzahl der Akzeptorfunktionalitäten ( $r^2 = 0,975$ ).

Bestimmend für die inhibitorische Aktivität ist jedoch nicht ausschließlich die Anzahl dieser funktionellen Gruppen. So weisen insbesondere die Monomethoxyderivate (Abbildung 6.4, B, offene Kreise) bezogen auf die im Molekül enthaltene Gesamtzahl an Akzeptorfunktionen eine zu geringe Wirksamkeit auf. Dies unterstreicht den großen Beitrag des 6,7-Dimethoxy-Substitutionsmuster an der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur zur hohen Aktivität einiger Acridonsäureamide (siehe auch [102]).

Der Einfluss des Wasserstoffbrückenakzeptor-Musters verschiedener Substanzen auf deren Interaktion mit ABCB1 ist auch in der Literatur beschrieben [250]. So weisen viele bekannte Substrate und Inhibitoren dieses Transporters charakteristische Substitutionsmuster auf,



**Abbildung 6.4:** Struktur-Wirkungs-Beziehungen der GF120918-Derivate. A: Korrelation der im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte mit log P ( $r^2 = 0,064$ ). B: Korrelation der Aktivitätsdaten mit der Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptorfunktionen (a\_acc) der Strukturen ( $r^2 = 0,975$ ). Offene Kreise: Substanzen wurden von der Korrelation ausgeschlossen.



**Abbildung 6.5:** Struktur des GF120918. Die Methoxygruppen in Position 6 und 7 der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur besitzen einen Abstand von  $2,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$ . Der Abstand zwischen der Methoxygruppe der Acridonsäure und der Amidbindung beträgt  $4,7 \pm 0,9 \text{ \AA}$ . Es handelt sich um den mittleren Abstand der Funktionalitäten (Mittelwert  $\pm$  SD) aller bei einer stochastischen Suche erhaltenen Konformationen.

die Akzeptorfunktionen – häufig Ether- oder Carbonylgruppierungen – in definierten Abständen zueinander enthalten. Ein bevorzugt auftretendes Strukturmerkmal stellen dabei die sogenannten „Typ I-Gruppierungen“ dar, die aus zwei benachbarten Akzeptorfunktionen mit einem Abstand von  $2,5 \pm 0,3 \text{ \AA}$  zusammengesetzt sind. Auch ortho-substituierte Aromaten wie die 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolinpartialstruktur des GF120918 können als eine solche bevorzugte funktionelle Einheit verstanden werden, die für eine hohe Affinität gegenüber ABCB1 verantwortlich ist (siehe Abbildung 6.5). Auch die Methoxygruppe der Acridonsäure ist Bestandteil einer ähnlichen funktionellen Einheit, der „Typ II-Gruppierung“ bestehend aus zwei Akzeptorfunktionen im Abstand von  $4,6 \pm 0,6 \text{ \AA}$ . Die könnte deren ebenfalls großen Einfluss auf die Wirksamkeit der betrachteten Substanzen erklären.

Des Weiteren ist auch die Carbonylfunktion der Acridonsäure, welche ebenfalls einen starken Wasserstoffakzeptor darstellt, wichtig für die Bindung an ABCB1, während unter anderem sekundären Aminen, die zwar über freie Elektronenpaare verfügen, dabei jedoch zusätzliche Wasserstoffbrückendonoreigenschaften besitzen, ein geringerer Einfluss auf die Affinität gegenüber ABCB1 zugesprochen wird [250]. Dies kann anhand der Substanzen MAC-289 und MAC-306 verdeutlicht werden: Das Fehlen der Carbonylgruppe in MAC-289 führt verglichen mit MAC-257 zu einer Verringerung der Aktivität um den Faktor zehn während das Benzophenon MAC-306 nur eine geringfügig verminderte Wirksamkeit aufweist (siehe Tabelle 6.1).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die innerhalb der hier untersuchten Serie von Acridonsäureamiden vorhandenen geringen strukturellen Variationen einen großen Einfluss auf deren ABCB1 inhibitorische Wirksamkeit besitzen. Die Hypothese von Seelig *et al.*, dass definierte Gruppierungen von Wasserstoffbrückenakzeptorfunktionen für die hohe Affinität von Inhibitoren gegenüber ABCB1 verantwortlich sind [250], kann dabei als einfaches

Modell für grundlegende Betrachtungen bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen dienen. Diese werden in der Dissertation von Matthias Christlieb ausführlich diskutiert [245].

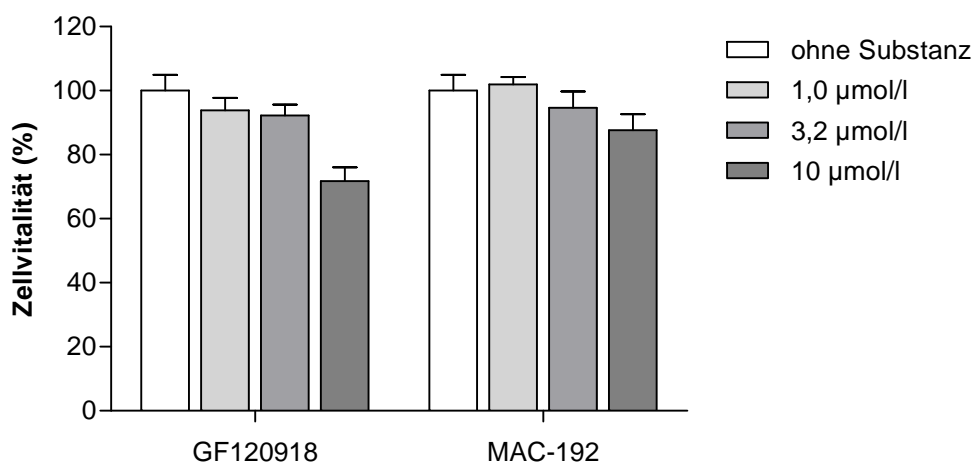
Weiterhin besitzen viele Substanzen in den beiden verwendeten Akkumulationsassays stark unterschiedliche inhibitorische Aktivität, wobei einige Verbindungen gegenüber Rhodamin 123 vollständig inaktiv sind, während der Transport von Hoechst 33342 effektiv gehemmt werden kann. Auf die Substratabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung der GF120918-Derivate wird in den nachfolgenden Abschnitten eingegangen.

### 6.1.2 Einfluss ausgewählter Derivate auf die ABCB1 vermittelte Resistenz

Das Acridonsäureamid GF120918 stellt einen der potentesten Inhibitoren von ABCB1 dar, welcher den ABCB1 vermittelten Transport bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen hemmt. So konnten für diese Verbindung in Kapitel 6.1.1  $pIC_{50}$ -Werte von 6,69 ( $IC_{50} = 0,20 \mu\text{mol/l}$ , Rhodamin 123) bzw. 7,19 ( $IC_{50} = 0,06 \mu\text{mol/l}$ , Hoechst 33342) ermittelt werden. GF120918 besitzt damit – unter Berücksichtigung der relativ großen Standardabweichungen – gegenüber den beiden Substraten eine vergleichbare inhibitorische Wirksamkeit.

Im Gegensatz dazu besitzt ein großer Teil der davon abgeleiteten Derivate in den beiden funktionellen Testsystemen deutlich unterschiedliche Aktivitätswerte. Dies trifft insbesondere auf die an der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur mono- oder unsubstituierten Verbindungen zu (siehe Tabelle 6.1). Diese weisen gegenüber Rhodamin 123 erst in Konzentrationen deutlich über  $10 \mu\text{mol/l}$  ABCB1 inhibierende Eigenschaften auf oder sind vollständig inaktiv, während der Transport von Hoechst 33342 bereits durch weitaus geringere Konzentrationen effektiv gehemmt wird.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob sich diese Aktivitätsunterschiede auch auf Resistenzebene nachweisen lassen. Zu diesem Zweck wurde die Toxizität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342 gegenüber den Zelllinien A2780 und A2780 Adr in An- und Abwesenheit zweier Acridonsäureamide mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt. Hierbei wurde neben der Ausgangsverbindung GF120918 auch das unsubstituierte Derivat MAC-192, welches im Rhodamin 123-Akkumulationsassay nur eine sehr geringe Wirksamkeit besitzt, betrachtet.



**Abbildung 6.6:** Toxizität von GF120918 und MAC-192 ermittelt mittels MTT-Assay. Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier Replikate.

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob die Inhibitoren selbst unter den gewählten Ver-

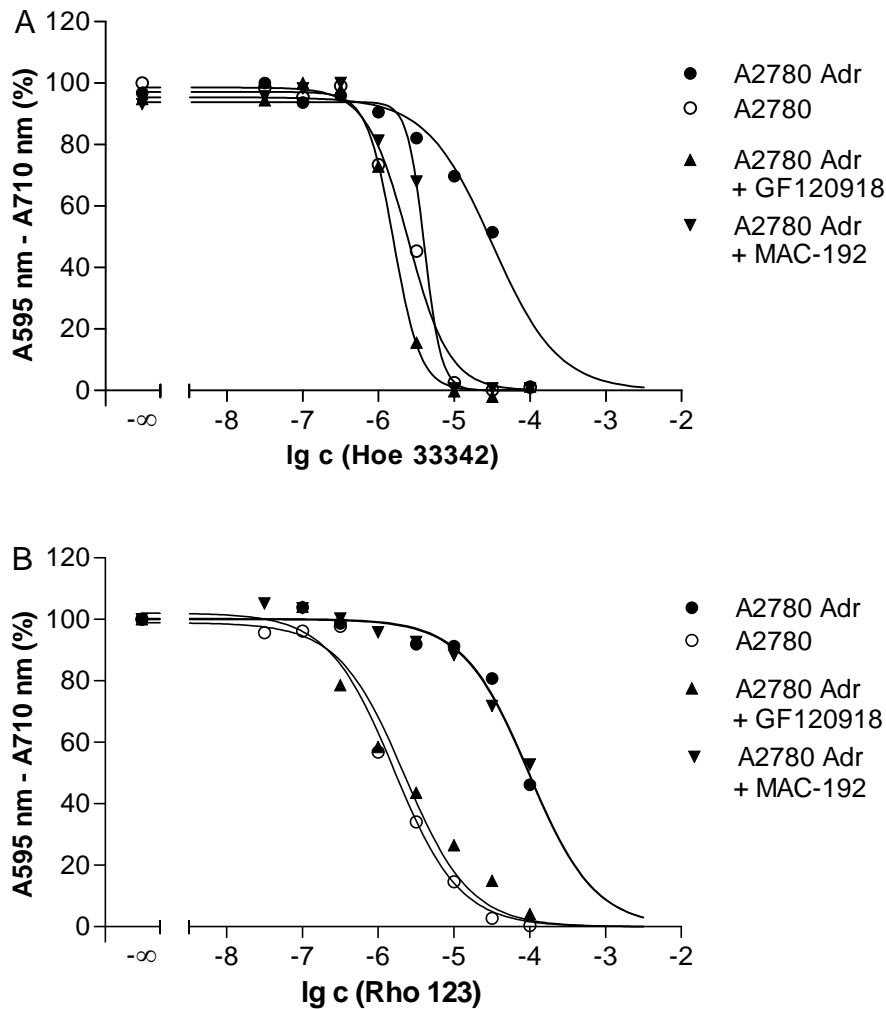
suchsbedingungen (72 h MTT-Assay) zytotoxische Eigenschaften besitzen. In Abbildung 6.6 ist die Zellvitalität nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren grafisch dargestellt. Sowohl GF120918 als auch MAC-192 besitzen demnach erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Toxizität. Basierend auf dieser Beobachtung wurde für die nachfolgenden Kombinationsversuche eine Inhibitorkonzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt.

Wie Abbildung 6.7 beispielhaft zu entnehmen ist, kann, wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, eine durch ABCB1 verursachte relative Unempfindlichkeit der Zelllinie A2780 Adr gegenüber den bekannten Substraten Hoechst 33342 ( $F_R = 12,9$ ) und Rhodamin 123 ( $F_R = 60,4$ ) beobachtet werden. Die Koinkubation mit 5  $\mu\text{mol/l}$  GF120918 führt dabei zu einer vollständigen Aufhebung der Resistenz von A2780 Adr gegenüber beiden Substraten, was sich in einer Linksverschiebung der zugehörigen Konzentrations-Effekt-Kurven äußert. In der sensitiven Zelllinie A2780 dagegen kann erwartungsgemäß kein Einfluss des Inhibitors festgestellt werden. Die zugehörigen Konzentrations-Effekt-Kurven sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 6.7 nicht dargestellt.

Des Weiteren wird auch durch die Behandlung mit 5  $\mu\text{mol/l}$  MAC-192 die Resistenz von A2780 Adr gegenüber Hoechst 33342 vollständig aufgehoben (Abbildung 6.7, A). Dagegen werden für Rhodamin 123 in An- und Abwesenheit dieser Verbindung identische  $\text{pGI}_{50}$ -Werte erhalten (siehe Abbildung 6.7, B). Die Koinkubation mit MAC-192 führt demnach nicht zu einer Steigerung der Toxizität von Rhodamin 123 gegenüber ABCB1 überexprimierenden Zellen. Somit kann die in Kapitel 6.1.1 beschriebene Substratabhängigkeit der ABCB1 inhibitorischen Wirkung bestimmter Acridonsäureamide am Beispiel des MAC-192 auch auf Resistenzebene nachgewiesen werden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde dann der Einfluss der beiden zuvor verwendeten Substanzen auf die Resistenz von A2780 Adr Zellen gegenüber weiteren Substraten des ABCB1 untersucht. Hierzu wurden exemplarisch die Zytostatika Doxorubicin, Vinblastin und Colchicin ausgewählt. Die zuvor betrachteten Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Rhodamin 123 wurden in den nachfolgend beschriebenen Experimenten als Vergleichssubstanzen eingesetzt.

Die für die unterschiedlichen Substrate im MTT-Assay ermittelten  $\text{pGI}_{50}$ -Werte in An- und Abwesenheit von GF120918 und MAC-192 sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Erwartungsgemäß zeichnet sich die ABCB1 überexprimierende Zelllinie A2780 Adr auch in dieser Versuchsreihe durch eine verglichen mit A2780 reduzierte Empfindlichkeit gegenüber den zytotoxischen Substraten aus. Die aus den  $\text{pGI}_{50}$ -Werten errechneten Resistenzfaktoren (siehe Abbildung 6.8) sind allerdings insgesamt etwas geringer, als die in Kapitel 4.1.1 bestimmten. Eine Ausnahme bilden hier die Mitosehemmstoffe Vinblastin und Colchicin, für die etwas



**Abbildung 6.7:** Einfluss von 5  $\mu\text{mol/l}$  GF120918 und MAC-192 auf die ABCB1 vermittelte Resistenz gegenüber Hoechst 33342 (A) und Rhodamin 123 (B). Dargestellt sind exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven (MTT-Assay mit A2780 Adr und A2780) der Fluoreszenzfarbstoffe in An- und Abwesenheit der beiden Inhibitoren (5  $\mu\text{mol/l}$ ). A:  $\text{pGI}_{50}$  (A2780) = 5,61,  $\text{pGI}_{50}$  (A2780 Adr) = 4,50,  $\text{pGI}_{50}$  (A2780 Adr)<sub>GF120918</sub> = 5,80,  $\text{pGI}_{50}$  (A2780 Adr)<sub>MAC-192</sub> = 5,40. B:  $\text{pGI}_{50}$  (A2780) = 5,79,  $\text{pGI}_{50}$  (A2780 Adr) = 4,01,  $\text{pGI}_{50}$  (A2780 Adr)<sub>GF120918</sub> = 5,66,  $\text{pGI}_{50}$  (A2780 Adr)<sub>MAC-192</sub> = 4,02.

**Tabelle 6.2:** Einfluss von GF120918 und MAC-192 auf die Resistenz von A2780 Adr Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika. Angegeben sind die mittels MTT-Assay ermittelten  $pGI_{50}$ -Werte dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  SD.

Substanz	A2780 Adr	+ GF120918	+ MAC-192	A2780
Hoechst 33342	4,72 $\pm$ 0,09	5,69 $\pm$ 0,14	5,54 $\pm$ 0,19	5,54 $\pm$ 0,06
Colchicin	6,06 $\pm$ 0,11	7,61 $\pm$ 0,24	7,11 $\pm$ 0,21	7,92 $\pm$ 0,16
Vinblastin	5,72 $\pm$ 0,12	7,28 $\pm$ 0,18	6,76 $\pm$ 0,05	7,38 $\pm$ 0,31
Rhodamin 123	4,08 $\pm$ 0,04	5,62 $\pm$ 0,09	4,50 $\pm$ 0,16	5,96 $\pm$ 0,06
Doxorubicin	5,54 $\pm$ 0,14	6,33 $\pm$ 0,08	5,95 $\pm$ 0,00	6,60 $\pm$ 0,04

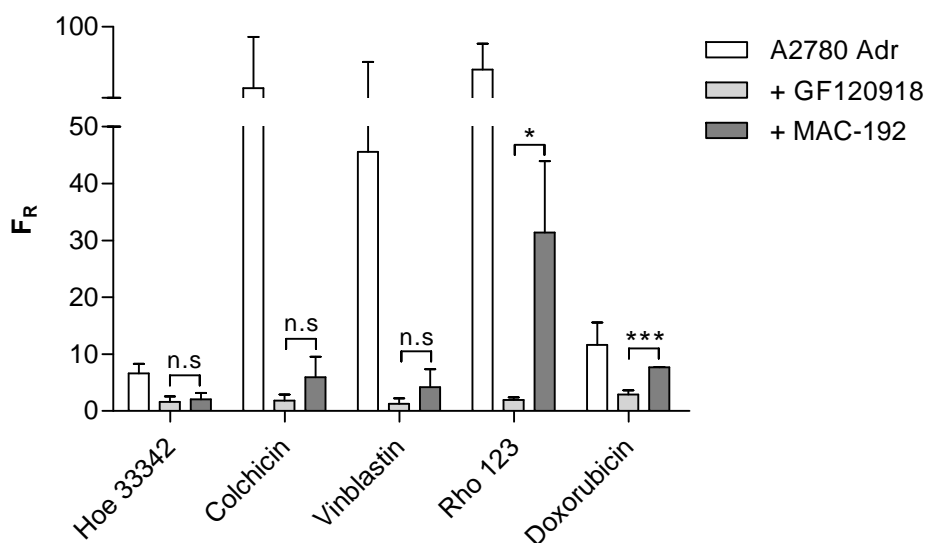
höhere Resistenzfaktoren ermittelt werden können, die jedoch gleichzeitig relativ starken Schwankungen unterliegen. Dies ist auf die variable Expression des ABCB1 in den durch Zytostatikabehandlung selektierten resistenten Zellen zurückzuführen. Innerhalb einer Versuchsreihe können die für verschiedene Zytostatika erhaltenen Ergebnisse jedoch miteinander verglichen werden.

In Analogie zum bereits zuvor beschriebenen Hoechst 33342 kann auch die ABCB1 vermittelte Resistenz gegenüber Vinblastin und Colchicin durch Behandlung mit beiden Inhibitoren praktisch vollständig aufgehoben werden (vgl. Abbildung 6.8). Der Effekt des MAC-192 ist dabei tendenziell etwas geringer als jener des GF120918, diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant. Die verglichen mit GF120918 geringere inhibitorische Wirksamkeit des MAC-192 (siehe Tabelle 6.1) ist somit – in deutlich schwächerer Ausprägung – auch auf Resistenzebene erkennbar.

Dagegen besitzt MAC-192 auch in dieser Versuchsreihe nur einen äußerst geringen oder keinen Effekt auf die Toxizität des Rhodamin 123 gegenüber A2780 Adr Zellen (vgl. Abbildung 6.8), während die Resistenz gegenüber diesem Substrat durch GF120918 vollständig aufgehoben wird. Dies äußert sich in signifikant unterschiedlichen Resistenzfaktoren in Anwesenheit der unterschiedlichen Inhibitoren. Ein derartiger Effekt kann auch im Falle des Doxorubicin beobachtet werden. Während die Resistenz gegenüber dem Zytostatikum durch 5  $\mu$ mol/l GF120918 praktisch vollständig aufgehoben werden kann, führt MAC-192 nur zu einer geringfügigen Sensitivierung der ABCB1 überexprimierenden Zellen. Auch hier unterscheiden sich die in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren errechneten Resistenzfaktoren signifikant.

Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den in den unterschiedlichen Akkumulationsassays erhaltenen Daten: Wie in Kapitel 6.1.1 dargestellt, ist sowohl GF120918 als auch MAC-192 in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport von Hoechst 33342 effektiv zu inhibieren. Auf Resistenzebene kann dies auch für Colchicin und Vinblastin, die nach Shapiro und Ling an die gleiche Bindungsstelle des ABCB1 binden sollen, nachgewiesen werden





**Abbildung 6.8:** Resistenz der Zelllinie A2780 Adr gegenüber verschiedenen Zytostatika in An- und Abwesenheit von 5 µmol/l GF120918 und MAC-192. Dargestellt sind die aus den pGI<sub>50</sub>-Werten in Tabelle 6.2 berechneten Resistenzfaktoren (Mittelwert ±SD). Zweiseitiger t-Test, ns nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

[64]. Eine inhibitorische Wirkung von MAC-192 auf den Transport von Rhodamin 123 kann hingegen weder im Rhodamin 123-Akkumulationsassay noch in den hier beschriebenen Zytotoxizitätsassays festgestellt werden. Dies trifft auch auf Doxorubicin zu, dessen Toxizität gegenüber der Zelllinie A2780 Adr durch diese Verbindung nur geringfügig beeinflusst wird. Dies konnte auf funktioneller Ebene auch für das mit Doxorubicin strukturell eng verwandte Anthrazyklinderivat Daunorubicin gezeigt werden (nicht dargestellt). Während GF120918 im DNR-Akkumulationsassay eine sehr gute ABCB1 inhibitorische Wirksamkeit besitzt (siehe Kapitel 4.2.4), kann im Falle des MAC-192 ebenfalls kein Einfluss auf die intrazelluläre Akkumulation des Zytostatikums festgestellt werden. Da auch Rhodamin 123 und die Anthrazykline sich durch ein identisches oder wenigstens ähnliches Bindungsverhalten am Transporter auszeichnen, kann aus den hier erhobenen Daten die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich MAC-192 insbesondere gegenüber solchen Substraten, die Affinität zur sogenannten Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 besitzen, durch eine ungewöhnlich geringe inhibierende Aktivität auszeichnet. Aufgrund der in Kapitel 6.1.1 dargestellten Daten ist des Weiteren davon auszugehen, dass dies auch auf die übrigen von GF120918 abgeleiteten mono- und unsubstituierten Acridonsäureamide zutrifft.

Auch in der Literatur existiert eine Reihe von Beispielen, in denen trotz der allgemein hohen Übereinstimmung verschiedener Testsysteme (vgl. Kapitel 4.2.4) für bestimmte Inhibitoren deutlich unterschiedliche Aktivitätswerte ermittelt wurden. So konnte innerhalb einer Serie von Derivaten des XR9576 zwar eine sehr gute Korrelation der unter Verwendung unter-

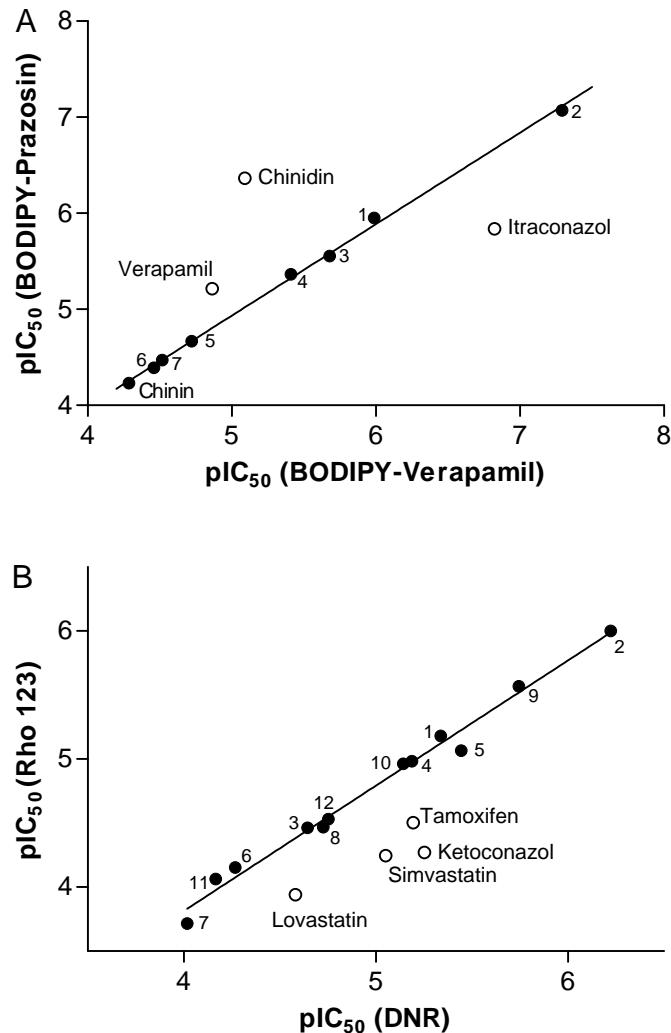
schiedlicher Substrate (Hoechst 33342, Cal-AM, DNR) ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte festgestellt werden, einige der Substanzen wiesen jedoch im Hoechst 33342-Akkumulationsassay eine verglichen mit Cal-AM und DNR deutlich stärkere inhibitorische Wirksamkeit auf [168, 211].

In weiteren Studien konnte für einige Verbindungen ebenfalls eine starke Substratabhängigkeit der ABCB1 inhibierenden Eigenschaften festgestellt werden, während insgesamt eine gute Korrelation der gegenüber verschiedenen Substraten ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte beobachtet wurde [246, 251]. So weisen insbesondere Chinidin und Itraconazol im Gegensatz zu den sonstigen in [246] untersuchten Hemmstoffen (inklusive GF120918) deutlich differierende Aktivitätswerte gegenüber BODIPY-Verapamil und BODIPY-Prazosin auf (siehe Abbildung 6.9, A).

Wang *et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss bestimmter Arzneistoffe auf den ABCB1 vermittelten Transport unterschiedlicher fluoreszierender Substrate [251]. In Abbildung 6.9, B ist exemplarisch die Korrelation der unter Verwendung von DNR und Rhodamin 123 erhaltenen Aktivitätsdaten dargestellt. Auch hier weisen einige Inhibitoren gegenüber den beiden Substraten eine unterschiedliche Wirksamkeit auf. Des Weiteren konnten die Autoren unter anderem im Falle des Itraconazol, welches den ABCB1 vermittelten Transport von DNR in mikromolaren Konzentrationen hemmt, keine inhibitorische Aktivität gegenüber Rhodamin 123 feststellen.

Diese in der Literatur und innerhalb der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Acridonsäureamide getätigten Beobachtungen lassen sich durch die Anwesenheit einer Vielzahl verschiedener potentieller Bindungsstellen innerhalb der TMDs des ABCB1 erklären. Bis heute wurden sehr viele unterschiedliche Hypothesen bezüglich deren Anzahl und Substratspezifität publiziert (unter anderem [62, 64, 66, 70, 71]), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Hemmung des ABCB1 vermittelten Transports immer durch die spezifische Interaktion des Inhibitors mit einem definierten Substrat bestimmt wird. Die von Shapiro und Ling postulierte Theorie zweier positiv-kooperativ interagierender Bindungsstellen [44], mit der sich viele der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse interpretieren lassen, stellt dabei lediglich ein mögliches Modell für die Interaktion unterschiedlicher Substrate und Modulatoren mit ABCB1 dar.

Die häufig beobachtete gute Übereinstimmung der gegenüber verschiedenen Substraten ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte kann dabei auf bevorzugte einfache Mechanismen der Hemmung zurückzuführen sein (vgl. Kapitel 4.2.4). Am Beispiel der in dieser Arbeit untersuchten Derivate des GF120918 wird jedoch auch deutlich, dass die spezifische Interaktion eines Inhibitors mit unterschiedlichen Substraten stark differieren kann, sodass es – beispielsweise im Rahmen der präklinischen Prüfung pharmazeutischer Wirkstoffe – sinnvoll ist, eine mögliche Interaktion mit ABCB1 unter Verwendung mehrerer Substrate zu untersuchen [252].



**Abbildung 6.9:** Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit ausgewählter Arzneistoffe gegenüber verschiedenen Substraten von ABCB1. Die namentlich hervorgehobenen Substanzen mit Ausnahme des Chinin wurden von der Korrelation ausgeschlossen (offene Kreise). A: Korrelation der unter Verwendung von BODIPY-Verapamil und BODIPY-Prazosin erhaltenen  $pIC_{50}$ -Werte nach [246];  $r^2 = 0,998$ . Untersuchte Inhibitoren: Ciclosporin (1), GF120918 (2), Ketoconazol (3), Nelfinavir (4), Ritonavir (5), Saquinavir (6), Atazanavir (7). B: Korrelation der unter Verwendung von DNR und Rhodamin 123 erhaltenen  $pIC_{50}$ -Werte nach [251];  $r^2 = 0,987$ . Untersuchte Inhibitoren: Carvedilol (1), Clofazimin (2), Dipyridamol (3), Fluphenazin (4), N-Norgallopamil (5), Paclitaxel (6), Progesteron (7), Chinidin (8), Terfenadin (9), Trifluoperazin (10), Troleandomycin (11), Vinblastin (12).

Auf die spezifische Interaktion der Acridonsäureamide GF120918 und MAC-192 mit den Substraten Hoechst 33342 und Rhodamin 123 bzw. deren Bindungsstellen an ABCB1 wird im nachfolgenden Kapitel intensiver eingegangen.

### 6.1.3 Untersuchung des Bindungsverhaltens der GF120918 Derivate

Wie in den vorausgehenden Abschnitten beschrieben wurde, unterscheiden sich die von GF120918 abgeleiteten Acridonsäureamide hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber Substraten der Rhodamin- und Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1. Ausgehend von der beobachteten Substratspezifität wurde untersucht, ob die Substanzen eine Präferenz zu einer dieser beiden Bindungsstellen aufweisen. Zu diesem Zweck wurde exemplarisch die Verbindung MAC-257 ausgewählt, welche sowohl gegenüber Rhodamin 123 als auch gegenüber Hoechst 33342 inhibitorische Wirksamkeit besitzt. Des Weiteren deutet sich bei diesem Inhibitor bereits die im Falle weiterer Substanzen noch stärker ausgeprägte Substratspezifität an, da der gegenüber GF120918 beobachtete Aktivitätsverlust im Falle des Rhodamin 123-Akkumulationsassays stärker ausgeprägt ist, als dies bei Hoechst 33342 der Fall ist. Die Ausgangsverbindung GF120918 konnte in dieser Versuchsreihe nicht untersucht werden, da die bei der Testung erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven häufig sehr steil verlaufen, was die Auswahl geeigneter Inhibitorkonzentrationen sowie die nachfolgende enzymkinetische Auswertung erschwert.

Der ABCB1 vermittelte Transport kann, wie bereits in Kapitel 3.6.4 dargestellt wurde, durch die Gesetzmäßigkeiten der Enzymkinetik beschrieben werden. Die Untersuchung der Hemmung des Transporters unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen ermöglicht somit die Bestimmung des Interaktionstyps eines Inhibitors mit einem Substrat. Dessen Kenntnis erlaubt schließlich Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten von Substraten und Hemmstoffen am Transporter.

Um den Interaktionstyp der Acridonsäureamide mit der Rhodamin- und Hoechst-Bindungsstelle zu charakterisieren wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von MAC-257 unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des jeweiligen Substrats aufgenommen. Anschließend wurden die erhaltenen Fluoreszenzwerte gemäß Gleichung 3.17 (Seite 68) so transformiert, dass sie proportional zur Transportgeschwindigkeit sind. Die intrazelluläre Konzentration des Substrats wurde unter Verwendung von Gleichung 3.18 bestimmt.

Die enzymkinetische Auswertung der so generierten Daten erfolgte dann hauptsächlich basierend auf den jeweiligen doppelt reziproken Diagrammen. Am Beispiel der Interaktion von MAC-257 mit der Rhodamin-Bindungsstelle sollen jedoch zusätzlich die Auswertungen nach Hanes-Woolf sowie die direkt-lineare Darstellung exemplarisch vorgestellt werden [170, 172]. Zum Ausschluss einer möglichen Mischtyp-Inhibition wurden des Weiteren sogenannte Sekundärdiagramme verwendet, in welchen die aus dem doppelt-reziproken Diagramm erhaltenen Ordinatenschnittpunkte und Geradensteigungen analysiert werden [170, 171].

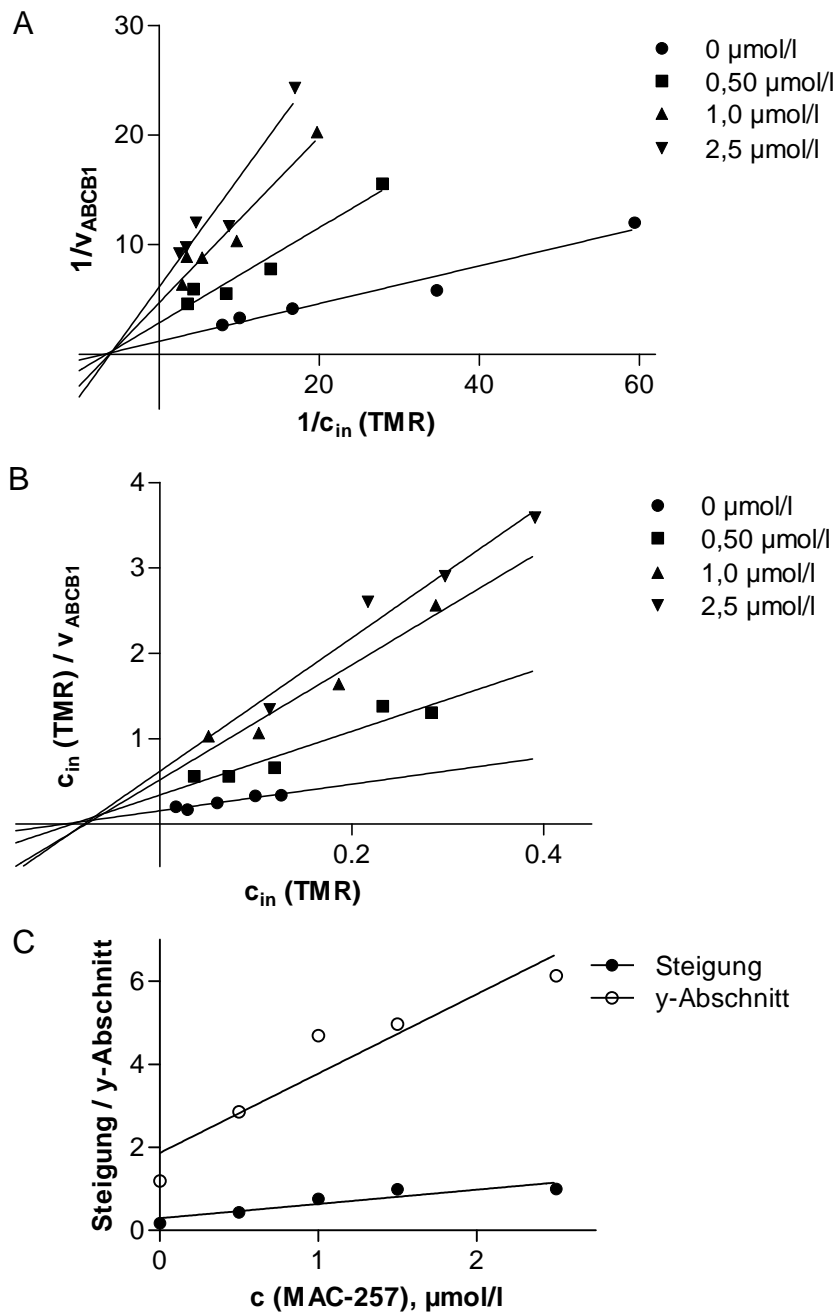
In einem ersten Schritt wurde die Art der Interaktion von MAC-257 mit der Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 bestimmt. Hierzu wurde das Substrat Tetramethylrosamin eingesetzt, da dieses insbesondere für diese sehr empfindliche Art der Messung gegenüber Rhodamin 123 einige Vorteile aufweist: Bei der Verwendung von Rhodamin 123 ist bei hohen Inhibitorkonzentrationen nahe des Topwertes der Konzentrations-Effekt-Kurve häufig eine leichte unspezifische Fluoreszenzabnahme zu beobachten. Dies ist für die enzymkinetische Auswertung von Nachteil, da sie eine exakte Bestimmung des Topwertes der Kurve, welcher für die Berechnung der Transportgeschwindigkeit essentiell ist, erschwert. Dieser Effekt tritt im Falle des Tetramethylrosamin nicht oder in deutlich schwächerer Ausprägung auf. Einen weiteren Vorteil stellt die insgesamt kürzere Inkubationszeit des Tetramethylrosamin-Akkumulationsassays dar, welche eine schnelle Durchführung sowie eine Minimierung möglicher toxischer Effekte von Substraten und Inhibitoren ermöglicht.

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von Tetramethylrosamin und Rhodamin 123 ist davon auszugehen, dass beide Substrate in vergleichbarer Art und Weise mit ABCB1 interagieren und somit beide an die Rhodamin-Bindungsstelle des Proteins binden. Die Verwendung von Tetramethylrosamin zur Bestimmung der Interaktion des Inhibitors mit der Rhodamin-Bindungsstelle ist daher möglich.

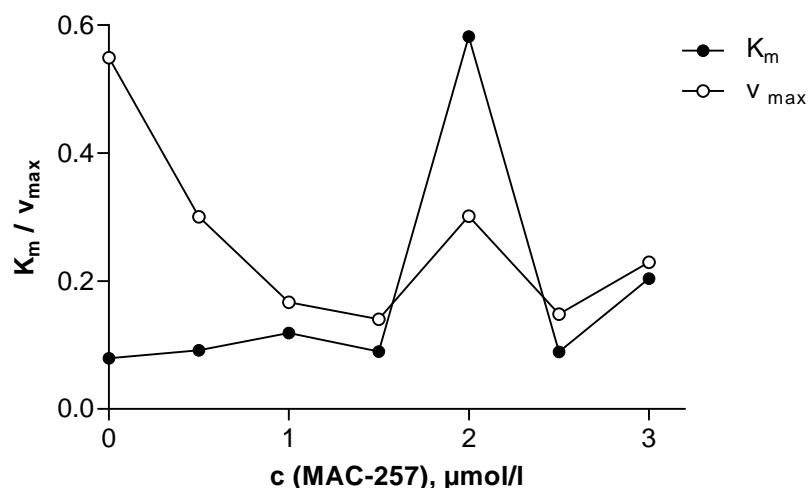
In Abbildung 6.10 A ist das Lineweaver-Burk Diagramm der Interaktionstypbestimmung von MAC-257 und Tetramethylrosamin dargestellt: Die erhaltenen Geraden besitzen einen gemeinsamen Schnittpunkt, der links der Ordinate auf der Abszisse liegt. MAC-257 beeinflusst demnach die apparente Affinität des Tetramethylrosamin gegenüber dem Transporter nicht, während die maximale Transportgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) gesenkt wird. Dieses Muster entspricht dem einer nicht-kompetitiven Hemmung.

Diese Hypothese wird durch das zugehörige Hanes-Woolf Diagramm (siehe Abbildung 6.10, B) unterstützt. Auch hier schneiden sich die erhaltenen Geraden in einem Punkt links der Ordinate, was ebenfalls auf eine nicht-kompetitive Interaktion von MAC-257 und Tetramethylrosamin hindeutet.

Neben den klassischen in Kapitel 3.6.4 beschriebenen Hemmtypen existieren auch sogenannte partielle oder Mischtyp-Interaktionen, bei denen der Enzym-Substrat-Komplex im Gegensatz zur reinen nicht-kompetitiven Inhibition weiterhin katalytisch aktiv ist [170]. Im Falle eines derartigen Hemmtyps liegt der Schnittpunkt der Geraden im doppelt Lineweaver-Burk Diagramm nicht genau auf der Abszisse. Aufgrund der relativ großen Fehleranfälligkeit der enzymkinetischen Betrachtung von ABC-Transportern – speziell im doppelt reziproken Diagramm – ist die Lage des Schnittpunktes auf oder über bzw. unter der Abszisse allerdings nicht immer eindeutig festzustellen. Zur Abgrenzung eines reinen nicht-kompetitiven Interaktionstyps von einer partiellen Hemmung sind jedoch sogenannte Sekundärdiagramme



**Abbildung 6.10:** Nicht-kompetitive Interaktion von MAC-257 und Tetramethylrosamin in A2780 Adr Zellen. A: Doppelt reziprokes Diagramm nach Lineweaver-Burk. B: Hanes-Woolf Diagramm. C: Sekundärplot der Steigungen und Ordinatenabschnitte der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Plot.



**Abbildung 6.11:** Bestimmung des nicht-kompetitiven Interaktionstyps von MAC-257 und Tetramethylrosamin nach direkt-linear Auftragung. Dargestellt sind die aus dem Median der Geradenschnittpunkte ermittelten apparenten Werte von  $K_m$  und  $v_{\max}$  bei unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors.

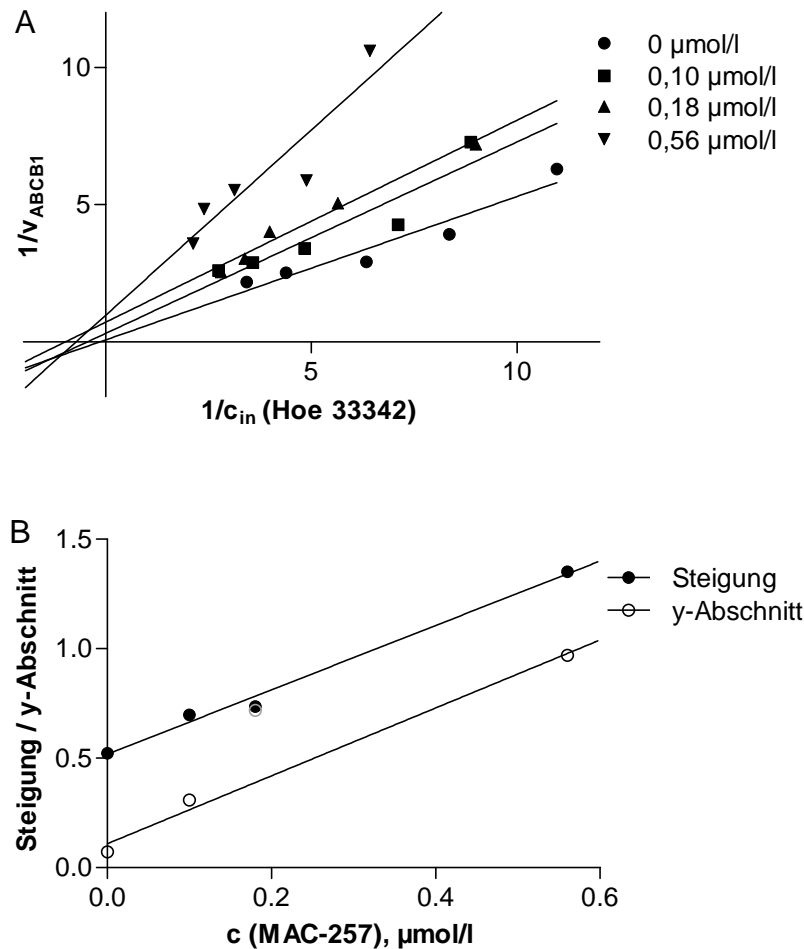
geeignet. In diesen wird die Steigung oder der Ordinatenschnittpunkt der im Lineweaver-Burk Diagramm erhaltenen Geraden gegen die jeweils eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen.

Das Sekundärdiagramm der Interaktionstypbestimmung von MAC-257 und Tetramethylrosamin ist in Abbildung 6.10 C dargestellt: Es wird deutlich, dass mit steigender Inhibitorkonzentration sowohl der Ordinatenschnittpunkt als auch die Steigung der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Diagramm näherungsweise linear ansteigt, was charakteristisch für eine reine nicht-kompetitive Hemmung ist. Im Falle einer partiellen oder Mischtyp-Hemmung wäre ein nicht-linearer Kurvenverlauf zu erwarten (siehe auch Kapitel 7.3).

Eine weitere Methode zur Interpretation enzymkinetischer Daten stellt die direkt-lineare Auftragung nach Eisenthal und Cornish-Bowden dar [172]. Bei dieser Darstellung wird für jede einzelne Inhibitorkonzentration eine charakteristische Geradenschar mit einem gemeinsamen Schnittpunkt erhalten, aus welchem sich die Parameter  $K_m$  und  $v_{\max}$  abschätzen lassen (siehe Kapitel 3.6.4.3).

Das zuvor beschriebene Experiment zur Bestimmung des Interaktionstyps von MAC-257 und Tetramethylrosamin wurde zusätzlich exemplarisch entsprechend der in Kapitel 3.6.4.3 beschriebenen Vorgehensweise ausgewertet. Die ermittelten Schätzwerte für  $K_m$  und  $v_{\max}$  wurden in Abbildung 6.11 gegen die jeweilige Konzentration des MAC-257 aufgetragen. Anhand des Diagramms wird zunächst deutlich, dass es sich bei den für eine Inhibitorkonzentration von 2,0 und 3,0  $\mu\text{mol/l}$  ermittelten Messwerten, um Ausreißer handelt, die im Falle der zuvor beschriebenen Auswertungen bereits ausgeschlossen wurden. Wie für eine nicht-kompetitive





**Abbildung 6.12:** Nicht-kompetitive Interaktion von MAC-257 und Hoechst 33342 in A2780 Adr Zellen. A: Doppelt reziprokes Diagramm nach Lineweaver-Burk. B: Sekundärplot der Steigungen und Ordinatenabschnitte der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Plot. Der grau dargestellte Punkt wurde von der Auswertung ausgeschlossen.

Hemmung zu erwarten, kann des Weiteren auch hier eine Abnahme der maximalen Transportgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) bei konstanter apparenter Affinität ( $K_m$ ) beobachtet werden. Die direkt-lineare Auswertung ist somit in diesem Fall ebenfalls für die Bestimmung des Interaktionstyps geeignet. Anhand eines theoretisch generierten Testdatensatzes konnte allerdings festgestellt werden, dass diese Methode bei größeren experimentellen Fehlern keine aussagekräftigen Ergebnisse liefert (siehe Kapitel 3.6.4.3). Aus diesem Grund wurde dieses Verfahren für die nachfolgend beschriebenen Experimente nicht verwendet.

Basierend auf den dargestellten Ergebnissen kann zusammenfassend festgehalten werden, dass MAC-257 den ABCB1 vermittelten Transport von Tetramethylrosamin nicht-kompetitiv hemmt. Der Inhibitor bindet somit vermutlich nicht an die Rhodamin-Bindungsstelle des Transporters.

In einem zweiten Schritt sollte in analoger Art und Weise der Hemmtyp von MAC-257 und Hoechst 33342 untersucht werden, um so die Interaktion des Inhibitors mit der Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1 zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls Konzentrations-Effekt-Kurven des Hemmstoffs unter Verwendung variabler Hoechst 33342-Konzentrationen (0,25-1,0  $\mu\text{mol/l}$ ) aufgenommen und die erhaltenen Daten entsprechend der zuvor dargestellten Vorgehensweise ausgewertet.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Tetramethylrosamin ist die enzymkinetische Auswertung aufgrund des kleinen Messfensters und des großen experimentellen Fehlers in diesem Fall jedoch insgesamt problematisch. Dies wird unter anderem anhand des in Abbildung 6.12 A exemplarisch dargestellten Lineweaver-Burk Diagramms deutlich. Auch hier liegt der Schnittpunkt der Geraden tendenziell links der Ordinate, was ebenfalls auf eine nicht-kompetitive Hemmung hindeutet. Seine Bestimmung ist jedoch nicht völlig eindeutig möglich. Des Weiteren liegt der vermutliche Schnittpunkt hier leicht unterhalb der Abszisse. Dies könnte jedoch sowohl auf das Vorliegen einer partiell nicht-kompetitiven Interaktion oder experimenteller Fehler zurückzuführen sein.

Eine Differenzierung dieser beiden Möglichkeiten kann anhand des in Abbildung 6.12 B dargestellten Sekundärdiagramms erfolgen. In Analogie zu den für Tetramethylrosamin erhaltenen Daten steigen auch hier sowohl der Wert des Ordinaten Schnittpunktes als auch die Steigung der Geraden näherungsweise linear an, was ebenfalls auf eine nicht-kompetitive Hemmung hindeutet; die Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten ist hier jedoch weniger eindeutig, als im Falle des Tetramethylrosamin.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass MAC-257 auch den ABCB1 vermittelten Transport von Hoechst 33342 nicht-kompetitiv inhibiert, wobei das Vorliegen einer partiell nicht-kompetitiven Hemmung hier nicht vollständig auszuschließen ist. Somit kann außerdem postuliert werden, dass MAC-257 ebenfalls keine Affinität zur Hoechst-Bindungsstelle des Transporters besitzt. Diese Hypothese wird des Weiteren durch Literaturdaten bestätigt: Martin *et al.* zeigten mittels Radioligandbindungsstudien ebenfalls, dass Hoechst 33342 und das Acridonsäureamid GF120918 nicht an die gleiche Bindungsstelle des ABCB1 binden [70].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MAC-257 weder an die Rhodamin- noch an die Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1 bindet und somit Affinität zu einer dritten Bindungsstelle besitzt. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit innerhalb der Gruppe der von GF120918 abgeleiteten Derivate ist des Weiteren davon auszugehen, dass dies auch auf die übrigen Acridonsäureamide zutrifft. Eine mögliche Präferenz der Inhibitoren zu einer dieser beiden Bindungsstellen stellt somit nicht die Ursache für die große Substratspezifität ihrer Wirksamkeit dar.

## 6.2 Acridonsäureamide als Inhibitoren von ABCG2

### 6.2.1 Funktionelle Untersuchungen an ABCG2

Im Falle des GF120918 ist in der Literatur neben der ABCB1 inhibierenden Wirkung auch eine Hemmung des ABCG2 vermittelten Transports beschrieben [106]. Aus diesem Grund wurden die in Kapitel 6.1 beschriebenen Derivate zusätzlich hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber diesem ebenfalls MDR-assoziierten ABC-Transporter untersucht. Dies geschah mit Hilfe des Pheophorbid A- sowie des Hoechst 33342-Akkumulationsassays unter Verwendung der Zelllinie MDCKII BCRP. Die ermittelten Aktivitätsdaten sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst wobei die Werte für Hoechst 33342 aus der Dissertation von Matthias Christlieb [245] übernommen wurden. Die Testung im Pheophorbid A-Akkumulationsassay erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Für die Ausgangssubstanz GF120918 wird im Hoechst 33342-Akkumulationsassay ein  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von 6,16 ( $\text{IC}_{50} = 0,69 \mu\text{mol/l}$ ) erhalten. Dieser liegt im Bereich des beispielsweise von Boumendjel *et al.* unter Verwendung eines Mitoxantron-Effluxassays ermittelten Literatur-

**Tabelle 6.3:** Inhibitorische Wirkung der GF120918-Derivate gegenüber ABCG2. Die Aktivitätsdaten wurden im Hoechst 33342- und Pheophorbid A-Akkumulationsassay unter Verwendung der Zelllinie MDCKII BCRP ermittelt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD dreier unabhängiger Experimente. Die Daten des Hoechst 33342-Akkumulationsassays wurden übernommen aus [245]. Strukturen der Inhibitoren siehe Tabelle 6.1.

Substanz	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SD}$ (Hoe 33342)	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SD}$ (Pheo A)
GF120918	6,16 $\pm$ 0,16	5,93 $\pm$ 0,10
MAC-192	6,07 $\pm$ 0,05	6,21 $\pm$ 0,07
MAC-198	6,00 $\pm$ 0,09	6,04 $\pm$ 0,07
MAC-206	6,00 $\pm$ 0,02	6,02 $\pm$ 0,08
MAC-235	6,00 $\pm$ 0,10	5,83 $\pm$ 0,01
MAC-240	5,92 $\pm$ 0,11	6,11 $\pm$ 0,15
MAC-252	6,00 $\pm$ 0,06	5,88 $\pm$ 0,09
MAC-257	5,73 $\pm$ 0,11	5,76 $\pm$ 0,05
MAC-275	6,00 $\pm$ 0,13	6,00 $\pm$ 0,04
MAC-306	5,75 $\pm$ 0,07	5,69 $\pm$ 0,08
MAC-315	5,94 $\pm$ 0,03	5,89 $\pm$ 0,16

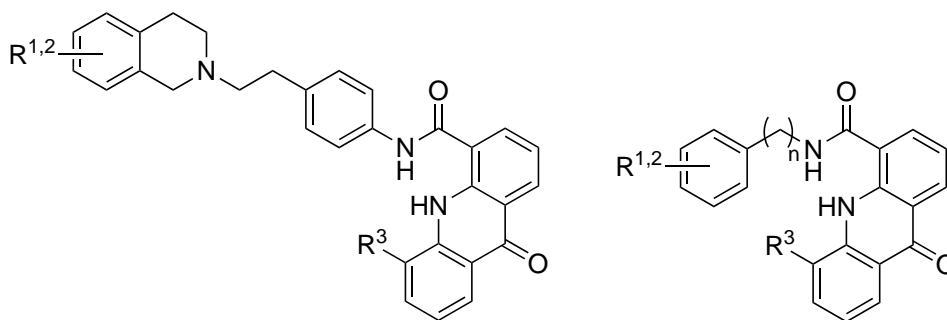
wertes von 0,41  $\mu\text{mol/l}$  [110]. GF120918 stellt somit in diesem Testsystem die potenteste Verbindung dar. Die inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Pheophorbid A hingegen ist mit einem  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von 5,93 ( $\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{mol/l}$ ) etwas geringer, liegt jedoch in der gleichen Größenordnung.

Insgesamt fällt auf, dass im Gegensatz zu den an ABCB1 erhaltenen Daten im Falle des ABCG2 nur äußerst geringe Aktivitätsunterschiede bestehen. Auch besitzen die Verbindungen hier meist eine vergleichbare Aktivität gegenüber den unterschiedlichen Substraten. Eine ähnlich starke Substratabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung wie im Falle des ABCB1 ist für ABCG2 nicht festzustellen. So weisen beispielsweise die an der Tetrahydroisochinolinalpartialstruktur mono- und unsubstituierten Verbindungen gegenüber ABCG2 nur eine minimal schlechtere Wirksamkeit auf, als die Ausgangssubstanz GF120918 (Hoechst 33342-Akkumulationsassay). Aufgrund der bei biologischen Daten üblichen experimentellen Schwankungen sind diese Differenzen als nicht signifikant einzustufen.

Auch die Modifikation der Acridonsäurepartialstruktur ruft nur sehr geringfügige Veränderungen der ABCG2 inhibitorischen Wirkung hervor. Das Fehlen der Carbonylgruppe in MAC-275 ( $\text{pIC}_{50 \text{ Hoe33342}} = 6,00$ ,  $\text{pIC}_{50 \text{ PheoA}} = 6,00$ ) führt beispielsweise zu keiner gegenüber GF120918 signifikant veränderten Aktivität, was darauf hindeutet, dass diese im Gegensatz zu ABCB1 keinen entscheidenden Einfluss auf die Affinität der Modulatoren gegenüber ABCG2 besitzt. Lediglich die Substanzen MAC-257 ( $\text{pIC}_{50 \text{ Hoe33342}} = 5,73$ ,  $\text{pIC}_{50 \text{ PheoA}} = 5,76$ ) und MAC-306 ( $\text{pIC}_{50 \text{ Hoe33342}} = 5,75$ ,  $\text{pIC}_{50 \text{ PheoA}} = 5,69$ ) weisen etwa zwei- bis dreifach höhere halbmaximale Hemmkonzentrationen gegenüber beiden untersuchten Substraten auf als GF120918. Dies könnte auf die Abwesenheit der Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäurepartialstruktur zurückzuführen sein. Derartige Effekte lassen sich jedoch im Falle der analogen Substanzpaare MAC-192/MAC-198 und MAC-252/MAC-315 nicht feststellen.

Die relativ geringen strukturellen Modifikationen, die im Falle des ABCB1 einen extrem großen Effekt auf die inhibitorische Aktivität besitzen, beeinflussen damit die ABCG2 hemmende Wirksamkeit praktisch nicht.

Auch in der Literatur wurden derartige Effekte beobachtet: Cramer *et al.* untersuchten eine Serie von Propafenonderivaten hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCB1 und ABCG2 [253]. Die Autoren stellten fest, dass die Wirksamkeit an ABCB1 insbesondere stark durch das Muster an Wasserstoffbrückenakzeptorfunktionen bestimmt wird, während dieses praktisch keinen Einfluss auf die Aktivität an ABCG2 besaß. Damit werden durch ABCG2 weitaus größere strukturelle Modifikationen der Inhibitoren toleriert, weshalb eine Selektivität gegenüber ABCG2 eher durch einen Verlust der Bindung an ABCB1 als durch spezifische Interaktion mit ABCG2 erreicht wird.



**Abbildung 6.13:** Grundstrukturen der GF120918-Derivate (links) und der davon abgeleiteten „kleinen“ Acridonsäureamide (rechts).

In der Literatur sind des Weiteren von GF120918 abgeleitete sogenannte „kleine“ Acridonsäureamide beschrieben, deren ABCG2 inhibitorische Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte, während der ABCB1 vermittelte Transport nicht gehemmt wurde [110, 111]. Eine umfangreiche Serie von Abkömmlingen dieser Verbindungen, die sich insbesondere durch das Fehlen der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur auszeichnen (siehe Abbildung 6.13, rechts), wurde ebenfalls von Matthias Christlieb synthetisiert [245]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einige exemplarisch ausgewählte Substanzen, in denen hauptsächlich Variationen der Amidlinkerlänge sowie des Substitutionsmusters am Aromaten vorgenommen wurden, hinsichtlich ihrer ABCG2 modulierenden Eigenschaften im Pheophorbid A-Akkumulationsassay untersucht. Die Auswahl erfolgte dabei basierend auf den in der Dissertation von Matthias Christlieb aufgeführten, im Hoechst 33342-Akkumulationsassay erhaltenen Aktivitätsdaten sodass diese ein möglichst breites Aktivitätsspektrum aufweisen [245]. Es sei an dieser Stelle bereits darauf hingewiesen, dass die „kleinen“ Acridonsäureamide zwar keine inhibitorische Wirkung an ABCB1 besitzen, jedoch in der Lage sind, den Efflux bestimmter Substrate durch diesen Transporter zu stimulieren. Die entsprechenden Testungsergebnisse werden in Kapitel 6.3 diskutiert.

Wie Tabelle 6.4 zu entnehmen ist, weisen die untersuchten Verbindungen pIC<sub>50</sub>-Werte in der Größenordnung der Derivate mit Tetrahydroisochinolinstruktur auf. Auch diese Beobachtung bestätigt Angaben aus der Literatur, nach denen die Acridonsäureamide mit reduzierter Grundstruktur ähnlich potent sind, wie GF120918 [110]. Des Weiteren werden auch hier in den beiden unterschiedlichen Testsystemen (Hoechst 33342- und Pheophorbid A-Akkumulationsassay) größtenteils vergleichbare Aktivitätsdaten erhalten.

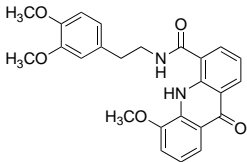
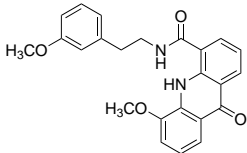
Ähnlich wie im Falle der zuvor beschriebenen Derivate sind auch hier keine sehr großen Aktivitätsunterschiede zwischen den Substanzen detektierbar; dennoch lassen sich einige Tendenzen hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkennen: Das Fehlen der Methoxygruppe in Position 4 des Phenylsubstituenten der Verbindung MAC-243 (pIC<sub>50</sub> Hoe33342 = 5,70,

$pIC_{50} \text{ Pheo A} = 5,86$ ) führt verglichen mit MAC-238 zu einer leichten Verringerung der Aktivität. Ebenfalls negativ wirkt sich die Verkürzung des Ethyllinkers um eine  $CH_2$ -Einheit aus. So besitzt MAC-281 ( $pIC_{50} \text{ Hoe 33342} = 5,54$ ,  $pIC_{50} \text{ Pheo A} = 5,34$ ) in beiden funktionellen Assays eine nahezu vierfach geringere Aktivität als MAC-238.

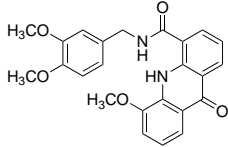
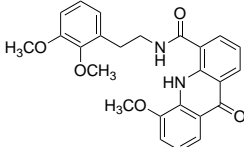
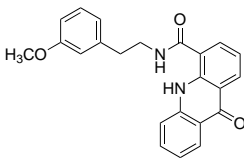
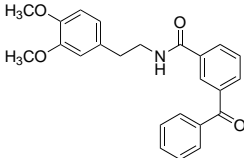
Bezüglich des Einflusses von Modifikationen der Acridonsäurepartialstruktur existieren Parallelen zu den GF120918 Analoga mit Tetrahydroisochinolinpartialstruktur. So besitzt das Benzophenon MAC-344 ( $pIC_{50} \text{ Hoe 33342} = 5,52$ ,  $pIC_{50} \text{ Pheo A} = 5,66$ ) eine gegenüber MAC-238 um den Faktor 2 bzw. 4 reduzierte Wirksamkeit. Die alleinige Abwesenheit der Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäure in der Verbindung MAC-323 ( $pIC_{50} \text{ Hoe 33342} = 6,25$ ,  $pIC_{50} \text{ Pheo A} = 5,80$ ) führt jedoch verglichen mit dem analogen MAC-243 zu keiner signifikanten Aktivitätsänderung.

Aus den beschriebenen Tendenzen können aufgrund der geringen Anzahl der betrachteten Substanzen jedoch keine allgemeingültigen Schlüsse hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen gezogen werden. Dennoch wird deutlich, dass auch die stärkeren strukturellen Modifikationen, wie die Reduktion der Struktur des GF120918 um den Tetrahydroisochinolinrest, zu keiner deutlichen Veränderung der inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber ABCG2 führen.

**Tabelle 6.4:** Zusammenfassung der inhibitorischen Aktivität ausgewählter kleiner Acridonsäureamide gegenüber ABCG2 im Hoechst 33342- und Pheophorbid A-Akkumulationsassay mit MDCKII BCRP Zellen. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Daten des Hoechst 33342-Akkumulationsassays wurden übernommen aus [245].

Substanz	Struktur	$pIC_{50} \pm SD$ (Hoe 33342)	$pIC_{50} \pm SD$ (Pheo A)
MAC-238		$6,12 \pm 0,03$	$5,91 \pm 0,07$
MAC-243		$5,70 \pm 0,10$	$5,86 \pm 0,03$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	pIC <sub>50</sub> ± SD (Hoe 33342)	pIC <sub>50</sub> ± SD (Pheo A)
MAC-281		5,54 ± 0,12	5,34 ± 0,05
MAC-288		6,00 ± 0,02	5,84 ± 0,12
MAC-323		6,25 ± 0,06	5,80 ± 0,16
MAC-344		5,52 ± 0,03	5,66 ± 0,13

Derartige Effekte wurden bereits zuvor für eine Serie von Verbindungen beschrieben, welche sich vom potenten ABCB1 und ABCG2 Inhibitor XR9576 (Tariquidar) ableiteten (Grundstruktur siehe Abbildung 6.17, Seite 210). Auch hier führte die Abwesenheit der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur zu einem Verlust der Aktivität gegenüber ABCB1 während weiterhin eine Hemmung des ABCG2 vermittelten Transports beobachtet werden konnte [254].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass jene strukturellen Modifikationen, die im Falle des ABCB1 teilweise einen extremen Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanzen besitzen, nur zu minimalen Veränderungen der Aktivität gegenüber ABCG2 führen. Des Weiteren induziert auch die Abwesenheit der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur keine signifikante Veränderung der Wirksamkeit an diesem ABC-Transporter.

## 6.2.2 Bindungsverhalten der Acridonsäureamide an ABCG2

Um das Bindungsverhalten der Acridonsäureamide an verschiedenen ABC-Transportern näher charakterisieren und vergleichen zu können, wurde in Analogie zu Kapitel 6.1.3 auch deren Interaktionstyp mit den unterschiedlichen Substraten des ABCG2 (Hoechst 33342 und Pheophorbid A) ermittelt.

In einer vorherigen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass GF120918 den Transport von Pheophorbid A kompetitiv inhibiert, während mit Hoechst 33342 eine nicht-kompetitive Interaktion festgestellt wurde. Aus diesen Beobachtungen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Hoechst 33342 und Pheophorbid A an zwei unterschiedliche Bindungsstellen des ABCG2 binden. Aus der kompetitiven Interaktion des Inhibitors GF120918 mit Pheophorbid A geht weiterhin hervor, dass diese beiden Substanzen Affinität zu der gleichen Bindungsstelle besitzen [255].

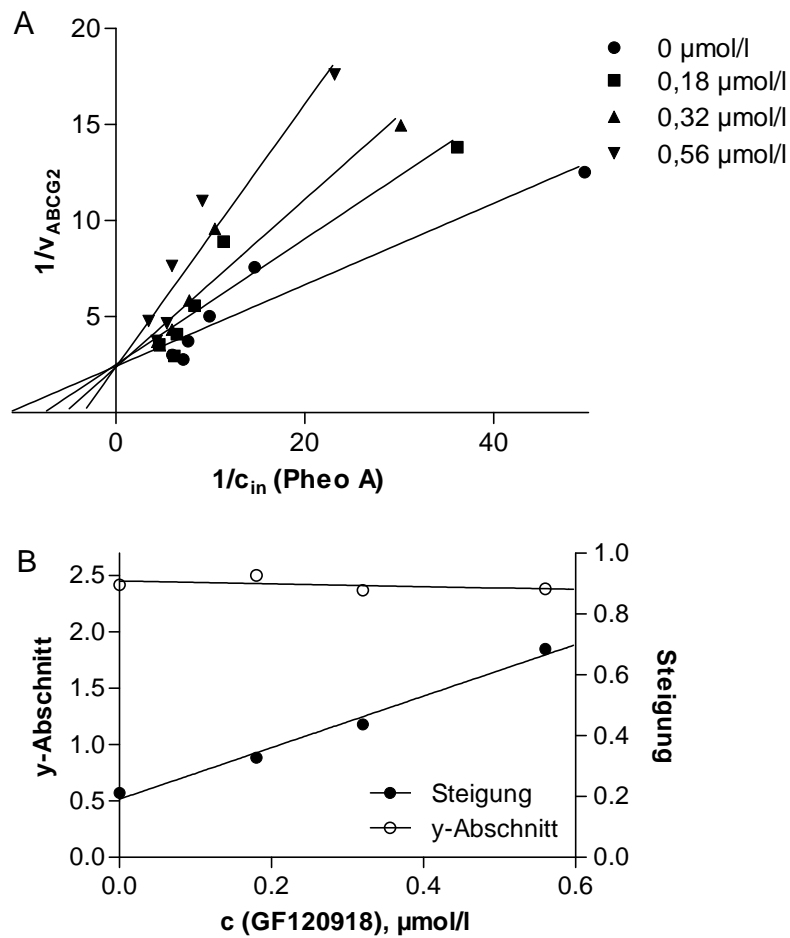
Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die kompetitive Interaktion von GF120918 mit Pheophorbid A bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden Konzentrations-Effekt-Kurven des Inhibitors unter Verwendung verschiedener Pheophorbid A-Konzentrationen (0,1-0,6  $\mu\text{mol/l}$ ) aufgenommen und die Daten in Analogie zu Kapitel 6.1.3 ausgewertet.

In Abbildung 6.14 A ist das doppelt reziproke Diagramm für die Inhibition des ABCG2 vermittelten Transports von Pheophorbid A durch GF120918 dargestellt: Die erhaltenen Geraden besitzen einen gemeinsamen Schnittpunkt, der auf der Ordinate liegt. Somit hat der Hemmstoff keinen Einfluss auf die maximale Transportgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) während der apparente  $K_m$ -Wert ansteigt. Dieses Geradenmuster entspricht dem des zu erwartenden kompetitiven Interaktionstyps. Auch das in Abbildung 6.14 B dargestellte Sekundärdiagramm weist das für die kompetitive Hemmung charakteristische Aussehen auf. Die Steigung der Geraden erhöht sich mit steigender Inhibitorkonzentration linear, während der Ordinatenabschnitt konstant bleibt. Somit kann hier die kompetitive Interaktion von GF120918 und Pheophorbid A und damit eine gemeinsame Bindungsstelle der beiden Substanzen an ABCG2 verifiziert werden.

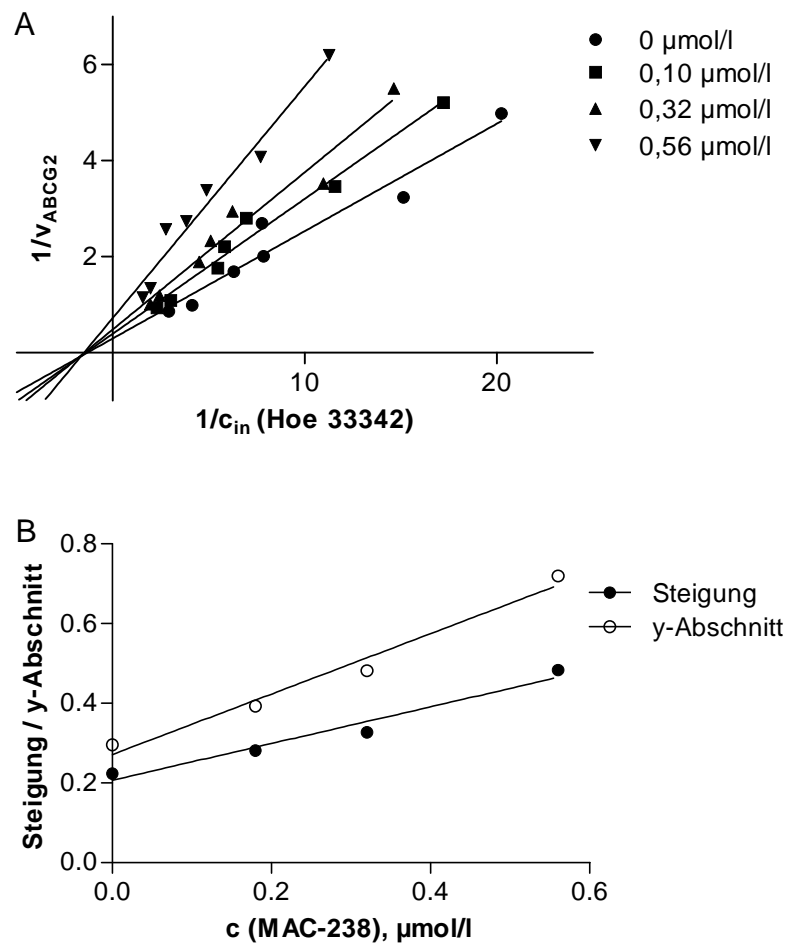
In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss des Fehlens der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur auf das Bindungsverhalten der Acridonsäureamide untersucht. Dies geschah exemplarisch anhand der Verbindung MAC-238, wobei sowohl die Interaktion mit Pheophorbid A als auch jene mit Hoechst 33342 charakterisiert wurde. Die jeweils erhaltenen doppelt reziproken und Sekundärdiagramme sind in den Abbildungen 6.15 und 6.16 dargestellt.

Wie Abbildung 6.15 A zu entnehmen ist, hemmt MAC-238 den ABCG2 vermittelten Transport von Hoechst 33342 nicht-kompetitiv: Während der apparente  $K_m$ -Wert des Substrats





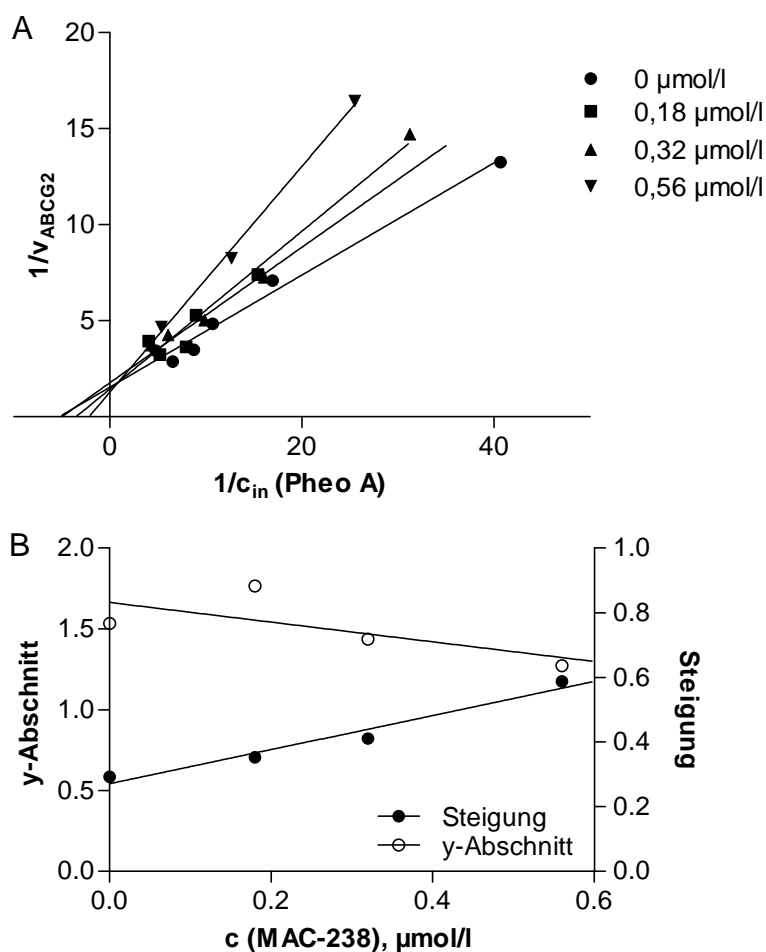
**Abbildung 6.14:** Kompetitive Interaktion von GF120918 und Pheophorbid A in MDCKII BCRP Zellen. A: Doppelt reziprokes Diagramm nach Lineweaver-Burk. B: Sekundärplot der Steigungen und Ordinatenabschnitte der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Plot.



**Abbildung 6.15:** Nicht-kompetitive Interaktion von MAC-238 und Hoechst 33342 in MDCKII BCRP Zellen. A: Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. B: Sekundärdiagramm der Steigungen und Ordinatenabschnitte der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Diagramm.

nicht beeinflusst wird, sinkt die maximale Transportgeschwindigkeit  $v_{\max}$  in Anwesenheit des Inhibitors. Die erhaltenen Geraden schneiden sich somit in einem Punkt links der Ordinate auf der Abszisse. Anhand des zugehörigen Sekundärdiagramms (Abbildung 6.15 B) kann des Weiteren das Vorliegen einer Mischtyp-Inhibition sicher ausgeschlossen werden, da sowohl die Steigung als auch die Werte der Ordinatenabschnitte mit steigender Inhibitorkonzentration linear ansteigen.

In Analogie dazu wurde auch der Interaktionstyp des MAC-238 mit Pheophorbid A ermittelt; das erhaltene doppelt reziproke Diagramm ist in Abbildung 6.16 A dargestellt. Es ergibt sich ein für die kompetitive Hemmung charakteristisches Geradenmuster mit einem Schnittpunkt auf der Ordinate. Auch das in Abbildung 6.16 B dargestellte Sekundärdiagramm deutet auf eine kompetitive Inhibition des Pheophorbid A Transports durch MAC-238 hin: Während der Ordinatenabschnitt der Geraden näherungsweise konstant bleibt, erhöht sich deren Steigung

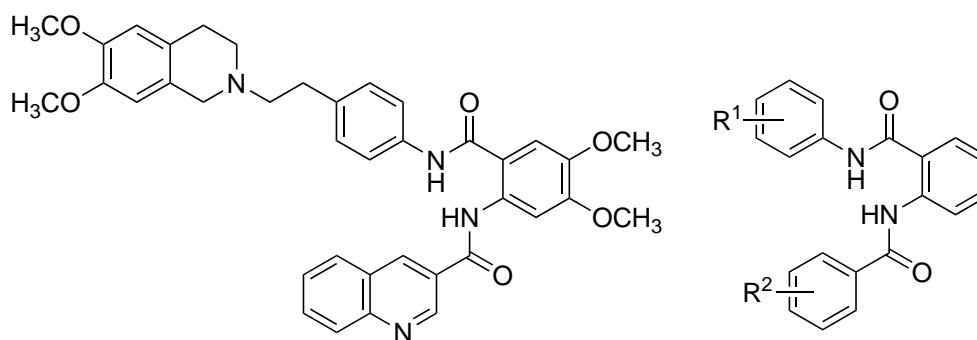


**Abbildung 6.16:** Kompetitive Interaktion von MAC-238 und Pheophorbid A in MDCKII BCRP Zellen. A: Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. B: Sekundärdiagramm der Steigungen und Ordinaten Schnittpunkte der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Diagramm.

mit steigender Inhibitorkonzentration linear.

Aus der kompetitiven Interaktion von MAC-238 und Pheophorbid A kann geschlossen werden, dass beide Substanzen an die gleiche Bindungsstelle des ABCG2 binden. Dies wird durch die nicht-kompetitive Hemmung des Transports von Hoechst 33342 zusätzlich unterstützt. Somit weist MAC-238 das gleiche Bindungsverhalten auf, wie GF120918, welches ebenfalls Affinität zur Pheophorbid A Bindungsstelle des Proteins besitzt. Das Fehlen des Tetrahydroisochinolinrestes in MAC-238 wirkt sich demnach nicht auf das Bindungsverhalten der Acridonsäureamide aus, weshalb postuliert werden kann, dass dieser nicht direkt an der Interaktion der Inhibitoren mit ABCG2 beteiligt ist.

Ein vergleichbares Verhalten wurde auch für die Analoga des XR9576 beschrieben [254]: Sowohl für XR9576 als auch für dessen „kleine“ Analoga (siehe Abbildung 6.17) konnte



**Abbildung 6.17:** Struktur des XR9576 (links) und Grundstruktur der davon abgeleiteten „kleinen“ Anthranilsäurederivate (rechts) aus [254] und [256].

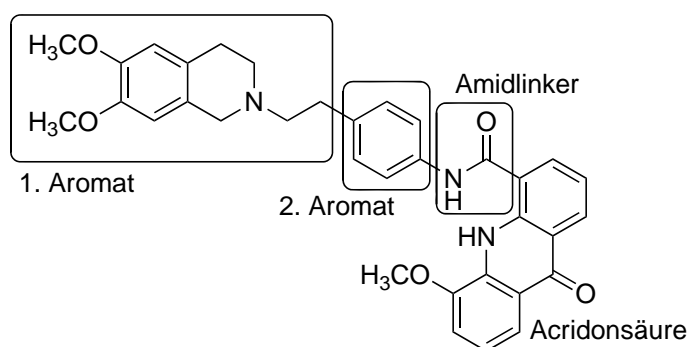
eine kompetitive Interaktion mit Hoechst 33342 und damit eine Affinität der unterschiedlichen Derivate zu der gleichen Bindungsstelle nachgewiesen werden. Auch hier besitzt der Tetrahydroisochinolinrest keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Inhibitoren gegenüber ABCG2.

Demnach lassen sich hinsichtlich der biologischen Aktivität der Acridonsäureamide gegenüber den beiden Transportern ABCB1 und ABCG2 gravierende Differenzen feststellen. Im Falle des ABCG2 führen strukturelle Modifikation – insbesondere der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur – nur zu sehr geringen Unterschieden der inhibitorischen Potenz der Verbindungen. Selbst das vollständige Fehlen dieses Restes besitzt keinen großen Einfluss auf deren Wirksamkeit oder Bindungsverhalten am Transporter. Im Gegensatz dazu haben die gleichen Variationen im Falle des ABCB1 massive Unterschiede bezüglich der inhibitorischen Wirksamkeit zur Folge, welche außerdem stark von dem betrachteten Substrat abhängig sind. Fehlt die Tetrahydroisochinolinpartialstruktur ganz, wird sogar ein Verlust der inhibitorischen Aktivität beobachtet, wobei die „kleinen“ Acridonsäureamide eine aktivierende Wirksamkeit gegenüber ABCB1 besitzen. Auf diesen Aspekt soll im nachfolgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

## 6.3 Kleine Acridonsäureamide als Aktivatoren von ABCB1

### 6.3.1 Funktionelle Untersuchungen an ABCB1

Neben den direkten Abkömmlingen des GF120918 (vgl. Kapitel 6.1.1) wurde auch die vollständige von Matthias Christlieb synthetisierte bereits in Kapitel 6.2.1 erwähnte Serie von „kleinen“ Acridonsäureamiden hinsichtlich ihrer ABCB1 modulierenden Wirksamkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurde hauptsächlich der Rhodamin 123-Akkumulationsassay unter Verwendung der Zelllinien A2780 Adr und A2780 eingesetzt.



**Abbildung 6.18:** Grundstruktur der Acridonsäureamide am Beispiel des GF120918. Die MAC-Verbindungen zeichnen sich durch Austausch der N-Ethyl-6,7-dimethoxytetrahydroisochinolinpartialstruktur (1. Aromat) sowie Modifikationen des 2. Aromaten, des Amidlinkers und der Acridonsäure aus.

Innerhalb dieser Gruppe von Substanzen, die in vier Klassen eingeteilt werden kann, wurden unterschiedliche strukturelle Variationen eingefügt (vgl. Abbildung 6.18): Zunächst wurde die N-Ethyl-6,7-dimethoxytetrahydroisochinolin-Partialstruktur (1. Aromat) des GF120918 unter Erhalt des Ethyllinkers durch verschiedene aliphatische Reste ersetzt bzw. vollständig entfernt (Substanzreihe 1). Eine zweite Serie von Verbindungen enthielt strukturell von diesen abgeleitete Derivate, in denen die Länge des Amidlinkers und das Substitutionsmuster des 2. Aromaten sowie der Acridonsäurepartialstruktur systematisch variiert wurden (Substanzreihe 2). Zuletzt wurden einige Verbindungen mit modifizierter Acridonsäure (Substanzreihe 3) und weitere strukturell abweichende Arylamide (Substanzreihe 4) untersucht.

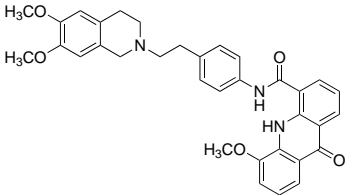
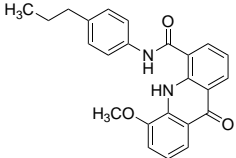
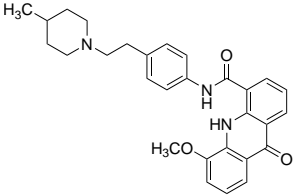
#### 6.3.1.1 Substanzreihe 1: Derivate mit modifiziertem 1. Aromaten

Wie aus Tabelle 6.5 hervorgeht führt bereits der Austausch der Tetrahydroisochinolinpartialstruktur des GF120918 gegen den 4-Methylpiperidinrest in MAC-222 zu einer drastischen Abnahme der ABCB1 inhibierenden Wirkung. Zwar ist die Verbindung in der Lage den Transport von Rhodamin 123 zu hemmen, die Aktivität ist jedoch mit einem  $pIC_{50}$ -Wert

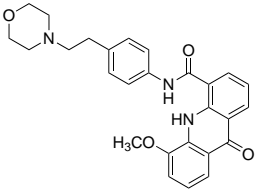
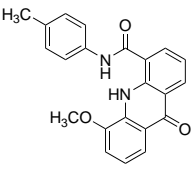
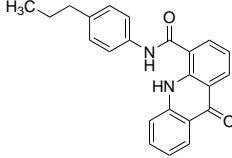
von 4,99 ( $IC_{50} = 10 \mu\text{mol/l}$ ) fast fünzigfach geringer als die des GF120918 (siehe Abbildung 6.19, A). In niedrigen Konzentrationen ist des Weiteren zusätzlich eine schwach aktivierende Wirkung von MAC-222 detektierbar, sodass die Konzentrations-Effekt-Kurve einen biphasischen Verlauf aufweist. Der entsprechende aktivatorische Ausschnitt der Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abbildung 6.19, B dargestellt.

Hier wird des Weiteren deutlich, dass die Stimulation des Rhodamin 123-Transports durch diese Substanz insgesamt schwächer ausgeprägt ist als im Falle reiner Aktivatoren wie dem später betrachteten MAC-226: Während in Anwesenheit von MAC-226 eine Senkung der intrazellulären Fluoreszenz auf ca. 55 % der unbehandelten Kontrolle beobachtet wird, führt MAC-222 nur zu einer 20 %igen Abnahme. Die Verbindung weist damit ein ähnliches Verhalten auf, wie es bereits für einige Modulatoren vom Benzimidazol-Typ (siehe Kapitel 5.3.1) sowie mehrere literaturbekannte Aktivatoren von ABCC2 [216, 217, 238] gezeigt wurde.

**Tabelle 6.5:** Zusammenfassung der biologischen Aktivität der von GF120918 abgeleiteten MAC-Derivate mit ausgetauschtem 1. Aromaten gegenüber ABCB1 (Substanzreihe 1). Die angegebenen  $pEC_{50}$ -Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit A2780 Adr).

Substanz	Struktur	Aktivität	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)
GF120918		Inhibition	$6,69 \pm 0,23$
MAC-213		Aktivierung	$5,94 \pm 0,08$
MAC-222		biphasisch	A: $6,92 \pm 0,11$ I: $4,99 \pm 0,14$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)
MAC-226		Aktivierung	5,90 ± 0,14
MAC-279		Aktivierung	6,39 ± 0,10
MAC-329		Aktivierung	6,28 ± 0,15

Wie zuvor bereits angedeutet, wird durch das Einfügen des Morpholinrestes in MAC-226 eine gegenüber Rhodamin 123 ausschließlich aktivierend wirksame Verbindung erhalten, welche mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 5,90 eine Aktivität in der Größenordnung der bereits charakterisierten Aktivatoren QB11 und QB102 besitzt.

Eine aktivierende Wirkung gegenüber ABCB1 wurde kürzlich auch für einige strukturell eng mit den Acridonsäureamiden verwandte Thioxanthere beschrieben. Die Verbindungen, welche ursprünglich als ABCB1 Inhibitoren mit zusätzlichen zytotoxischen Eigenschaften konzipiert waren (siehe auch Kapitel 7.1), waren ebenfalls in der Lage den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 zu stimulieren [120]. Zwar wurden die aktivierenden Eigenschaften der Substanzen in dieser Publikation nicht näher charakterisiert, sie belegt jedoch zusätzlich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Aktivierung von ABCB1 durch strukturell vergleichbare Acridonsäureamide. Somit können die „kleinen“ MAC-Substanzen als neuartige Klasse von Aktivatoren des ABCB1 erschlossen werden. Auf den Einfluss struktureller Modifikationen der Verbindungen auf deren Wirksamkeit soll nachfolgend eingegangen werden.

Ausgehend von MAC-226 führt die weitere Reduktion der Struktur im Falle des MAC-213, welches nur den azyklischen Propylrest besitzt, zu keiner signifikanten Veränderung der biolo-

gischen Aktivität. Mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 5,94 ist diese Verbindung ähnlich wirksam wie MAC-226. Erstaunlicherweise führt hier jedoch – im Gegensatz zu den in Kapitel 6.1.1 beschriebenen Inhibitoren – das Fehlen der Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäure von MAC-329 ( $pEC_{50} = 6,28$ ) zu einer Verdopplung der Aktivität. Auch MAC-279, in welchem der Propylrest weiter zur Methylgruppe verkleinert wurde, besitzt mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,39 eine etwas höhere aktivierende Wirksamkeit als MAC-213. Die Einführung eines 3,4-Dimethoxysubstitutionsmusters in MAC-225 ( $pEC_{50} = 6,91$ , siehe Tabelle 6.6) steigert die Aktivität zusätzlich.

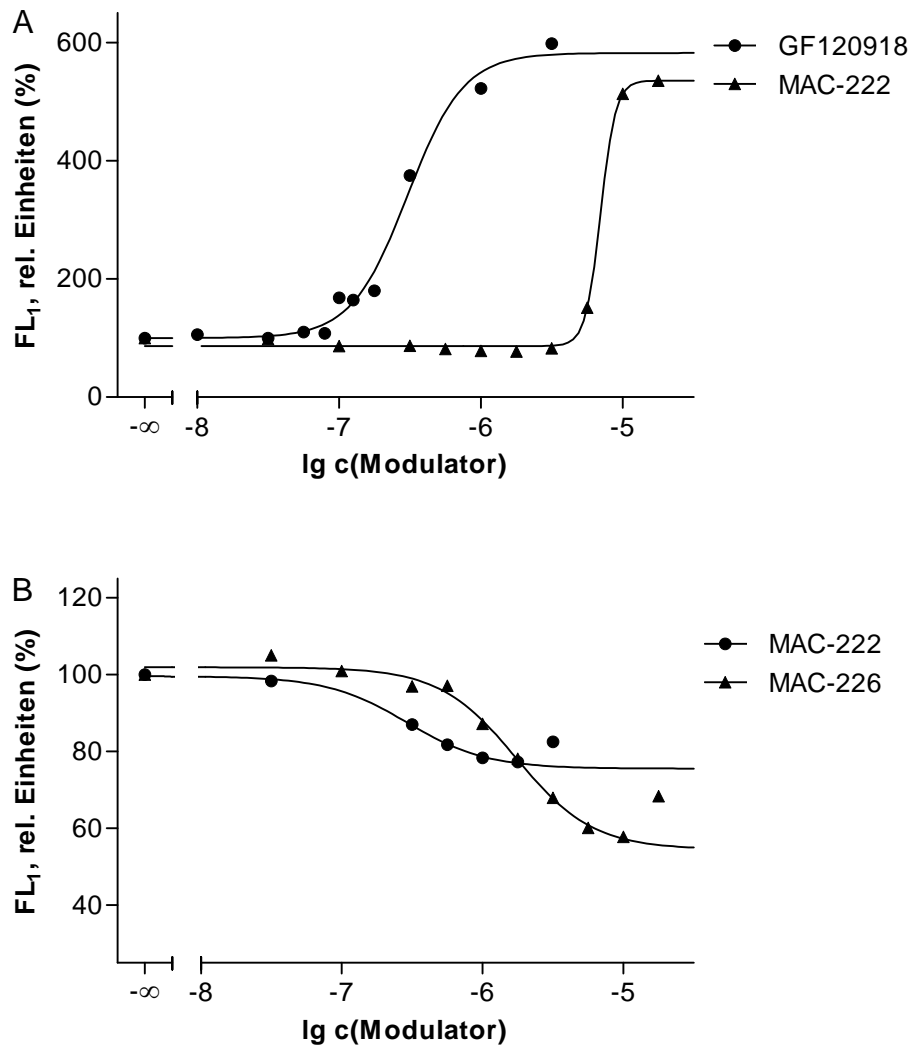
### 6.3.1.2 Substanzreihe 2: Modifikation der Linkerlänge und des Methoxysubstitutionsmusters

MAC-225, die aktivste Verbindung der 1. Substanzreihe, kann als Ausgangsstruktur für eine weitere Gruppe von Acridonsäureamiden angesehen werden, in welcher zunächst hauptsächlich die Länge des Amidlinkers sowie das Substitutionsmuster des Aromaten variiert wurde. Die für diese Substanzen erhaltenen Aktivitätsdaten sind in Tabelle 6.6 aufgeführt. Nachfolgend soll zunächst der Einfluss der Linkerlänge, dann jener des Substitutionsmusters am zweiten Aromaten diskutiert werden.

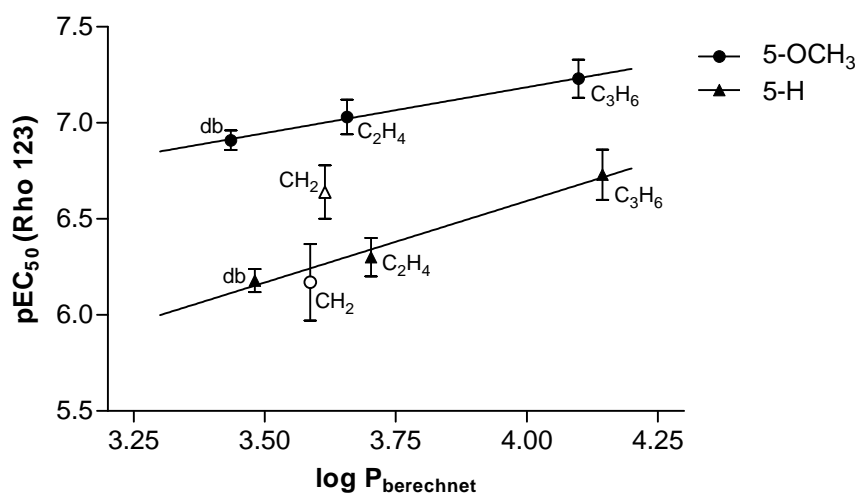
Die Verbindung MAC-281, in welcher der Linker um eine Methyleneinheit verlängert ist, weist mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,17 eine geringere Aktivität auf, als die Ausgangssubstanz MAC-225 ( $pEC_{50} = 6,91$ ). Eine weitere Erweiterung dieser Partialstruktur zur Ethylen- bzw. Propylenstruktur in MAC-238 ( $pEC_{50} = 7,03$ ) und MAC-371 ( $pEC_{50} = 7,23$ ) führt hingegen wieder zu einer Zunahme der Wirksamkeit gegenüber ABCB1. Diese bezogen auf MAC-225 leichte Aktivitätssteigerung ist vermutlich auf die mit der Verlängerung des Linkers einhergehende Erhöhung der Lipophilie zurückzuführen. So korrelieren die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte sehr gut mit den berechneten logP-Werten der genannten Substanzen (Abbildung 6.20, Kreise): Unter Ausschluss von MAC-281 ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,990.

Ein ähnlicher Effekt kann auch im Falle der von MAC-326 ( $pEC_{50} = 6,18$ ) abgeleiteten Serie von Verbindungen ohne Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäure beobachtet werden. Auch hier besitzen die homologen Substanzen MAC-249 und MAC-272 mit  $pEC_{50}$ -Werten von 6,30 bzw. 6,73 eine von ihrer Lipophilie abhängige höhere Aktivität als MAC-326 (siehe Abbildung 6.20, Dreiecke,  $r^2 = 0,980$ ). Diese Tendenz setzt sich mit der Verbindung MAC-331, welche sich durch das Fehlen der Methoxygruppen am 2. Aromaten auszeichnet, fort. Diese Substanz stellt mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,41 den bisher potentesten Aktivator dar. Aufgrund der sehr hohen Lipophilie und den möglichen starken Membraneffekten dieser Substanz unterliegt der gemessene Aktivitätswert in diesem Fall jedoch einer relativ





**Abbildung 6.19:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedener Acridonsäureamide erhalten im Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit A2780 Adr. A: Inhibitorische Wirkung von MAC-222 ( $pIC_{50} = 5,16$ ) verglichen mit GF120918 ( $pIC_{50} = 6,52$ ). B: Aktivierende Wirkung von MAC-222 ( $pEC_{50} = 5,76$ ). Auch MAC-222 besitzt in niedrigen Konzentrationen schwach aktivierende Eigenschaften ( $pEC_{50} = 6,54$ ). Dargestellt ist nur der abfallende Teil der Konzentrations-Effekt-Kurve aus A.



**Abbildung 6.20:** Abhängigkeit der aktivierenden Wirksamkeit der kleinen Acridonsäureamide von der Länge des Linkers (Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit A2780 Adr). Mit Ausnahme der Verbindungen mit einem CH<sub>2</sub>-Linker (offene Symbole) korrelieren die pEC<sub>50</sub>-Werte gut mit den berechneten log P-Werten (db, direkt gebunden). Von MAC-225 abgeleitete 5-Methoxyacridonsäureamide:  $r^2 = 0,990$ ; Von MAC-326 abstammende unsubstituierte Acridonsäureamide:  $r^2 = 0,980$ .

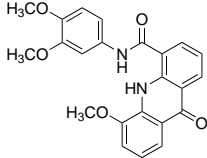
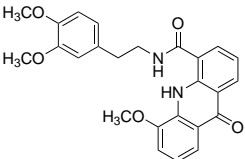
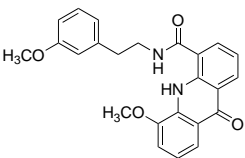
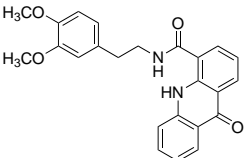
großen Unsicherheit. Im Gegensatz zu der erstgenannten Reihe von Acridonsäureamiden mit C<sup>5</sup>-Methoxygruppe besitzt hier jedoch die Substanz mit einem Methylenlinker MAC-332 (pEC<sub>50</sub> = 6,64) eine höhere Aktivität als die Ausgangssubstanz MAC-326.

Insgesamt sind die durch die Variation der Linkerlänge erzielten Aktivitätsunterschiede innerhalb der beiden betrachteten Substanzreihen somit hauptsächlich auf deren differierende Akkumulation in der Zellmembran und damit eine erleichterte Bindung an ABCB1 zurückzuführen. Ein derartiger Zusammenhang wurde wie bereits zuvor erwähnt auch für verschiedene Inhibitoren des ABCB1, unter anderem die von Ecker *et al.* publizierten Propafenonderivate, festgestellt [179, 247, 248]. Eine diesbezügliche Ausnahme unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Acridonsäureamiden stellen die Derivate mit einem Methylenlinker dar, die eine andere biologische Aktivität aufweisen, als es aufgrund ihrer Lipophilie zu erwarten wäre. Der Einfluss dieser strukturellen Modifikation auf die spezifische Interaktion mit ABCB1 ist dabei im Falle des 5-Methoxyacridonsäureamids MAC-225 und des in Position C<sup>5</sup> unsubstituierten Derivates MAC-332 gegensätzlich ausgeprägt: Während die aktivatorische Wirkung des MAC-225 geringer ist, als erwartet weist MAC-332 eine erhöhte Aktivität auf.

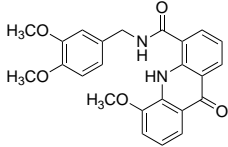
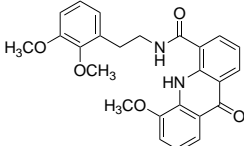
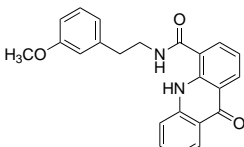
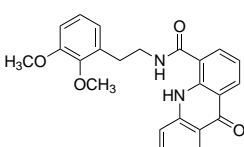
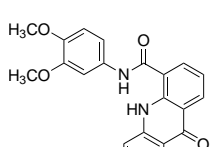
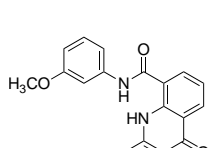
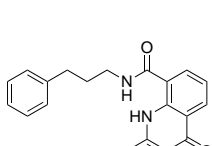
Hinsichtlich des Einflusses des Methoxysubstitutionsmusters am 2. Aromaten auf die Wirksamkeit der Substanzen können insgesamt nur wenige allgemeingültige Aussagen getätigt werden (vgl. Tabelle 6.6). Dennoch zeigen sich auch hier gewisse Tendenzen hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die nachfolgend erläutert werden sollen:

Die Verbindung MAC-330, welche sich von MAC-326 ( $pEC_{50} = 6,18$ ) nur durch das Fehlen der Methoxygruppe in Position 4 des Aromaten unterscheidet, besitzt mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,11 eine zehnfach stärkere aktivierende Wirksamkeit als das 3,4-Dimethoxyderivat. Die ausschließlich in Position 2 substituierte Substanz MAC-345 ( $pEC_{50} = 6,12$ ) hingegen ist wiederum ähnlich aktiv wie MAC-326. Eine derartige Tendenz zeigt sich auch im Falle jener Derivate, die sich von dem zu MAC-326 analogen MAC-249 ( $pEC_{50} = 6,30$ ) ableiten. So besitzt auch hier das 3-Methoxyderivat MAC-323 ( $pEC_{50} = 6,58$ ) eine höhere Wirksamkeit als die Ausgangsstruktur; dieser Aktivitätsunterschied ist jedoch nicht so deutlich ausgeprägt, wie im Falle der zuvor beschriebenen Substanzreihe. Das Einbringen einer zusätzlichen Methoxygruppe in Position 2 führt zur Verbindung MAC-324, die mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,30 genauso potent ist wie MAC-249.

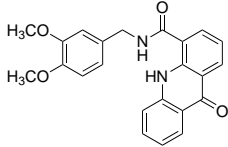
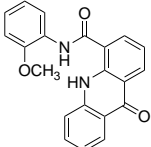
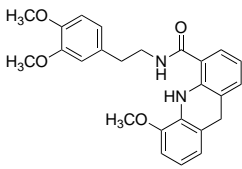
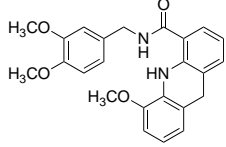
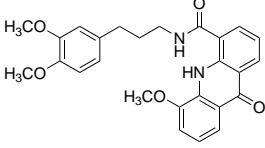
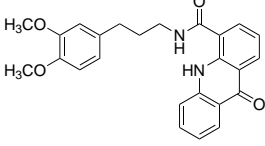
**Tabelle 6.6:** Aktivitätsdaten der Acridonsäurederivate mit veränderter Länge des Amidlinkers, variiertem Substitutionsmuster am 2. Aromaten und an der Acridonsäure (Substanzreihe 2). Die angegebenen  $pEC_{50}$ -Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit A2780 Adr).

Substanz	Struktur	Aktivität	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)
MAC-225		Aktivierung	$6,91 \pm 0,05$
MAC-238		Aktivierung	$7,03 \pm 0,09$
MAC-243		Aktivierung	$6,89 \pm 0,19$
MAC-249		Aktivierung	$6,30 \pm 0,10$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)
MAC-281		Aktivierung	6,17 ± 0,20
MAC-288		Aktivierung	6,06 ± 0,14
MAC-323		Aktivierung	6,58 ± 0,09
MAC-324		Aktivierung	6,30 ± 0,07
MAC-326		Aktivierung	6,18 ± 0,06
MAC-330		Aktivierung	7,11 ± 0,12
MAC-331		Aktivierung	7,41 ± 0,06

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD (Rho 123)
MAC-332		Aktivierung	6,64 ± 0,14
MAC-345		Aktivierung	6,12 ± 0,11
MAC-360		Aktivierung	6,86 ± 0,17
MAC-363		Aktivierung	6,48 ± 0,13
MAC-371		Aktivierung	7,23 ± 0,10
MAC-372		Aktivierung	6,73 ± 0,13

Ein anderes Verhalten kann für die hierzu analoge Reihe von Verbindungen, welche eine Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäurepartialstruktur aufweisen, beobachtet werden. Hier besitzt das ausschließlich in Position 3 substituierte Derivat MAC-243 (pEC<sub>50</sub> = 6,89) eine ähnliche Wirksamkeit wie die 3,4-disubstituierte Verbindung MAC-238 (pEC<sub>50</sub> = 7,03). Das 2,3-Dimethoxyderivat MAC-288 hingegen ist mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 6,06 zehnfach schwächer wirksam, als die in Position 3 und 4 substituierte Verbindung MAC-238.

Wie bereits für die Acridonsäureamide mit modifizierter Länge des Amidlinkers beschrieben, sind somit auch hier gewisse Unterschiede bezüglich des Einflusses bestimmter struktureller Modifikationen zwischen den Gruppen der 5-Methoxyacridonsäureamide und der unsubstituierten Vertreter zu beobachten. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Partialstruktur eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit dieser Substanzklasse spielt. Der Einfluss unterschiedlicher Modifikationen der Acridonsäure auf die ABCB1 aktivierenden Eigenschaften der Verbindungen soll nachfolgend erläutert werden.

Wie Tabelle 6.6 zu entnehmen ist, besitzen in vielen Fällen jene Verbindungen, die eine Methoxygruppe in Position C<sup>5</sup> der Acridonsäure aufweisen, eine höhere Wirksamkeit als die entsprechenden unsubstituierten Derivate. Dies trifft auf alle Substanzpaare mit direkt gebundenem zweiten Aromaten (MAC-225/MAC-326) oder einem Propyllinker (MAC-371/MAC-372) sowie mit Ausnahme der Verbindungen MAC-288 und MAC-324 auch auf die entsprechenden Ethylderivate (MAC-238/MAC-249 und MAC-243/MAC-323) zu. Ein entgegengesetztes Verhalten weisen hier erneut jene Substanzen auf, in denen ein Methylenlinker zwischen Acridonsäure und dem 2. Aromaten eingefügt wurde. So besitzt das unsubstituierte Derivat MAC-332 mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 6,64 eine etwa zweifach höhere Aktivität als das 5-Methoxyacridonsäureamid MAC-281 (pEC<sub>50</sub> = 6,17).

Unterschiede zwischen den Derivaten mit unterschiedlicher Linkerlänge lassen sich auch bei Betrachtung der beiden untersuchten Dihydroacridine erkennen: Während MAC-360 mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 6,86 etwas schwächer wirksam ist als das analoge Acridon MAC-238 (pEC<sub>50</sub> = 7,08), führt das Fehlen der Carbonylgruppe in MAC-363 (pEC<sub>50</sub> = 6,48) zu einer geringfügigen Aktivitätssteigerung gegenüber MAC-281 (pEC<sub>50</sub> = 6,17). Diese Aktivitätsunterschiede sind jedoch aufgrund der starken Streuung einiger Messwerte nicht statistisch signifikant.

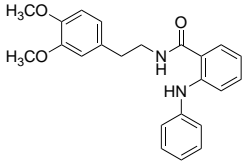
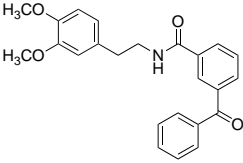
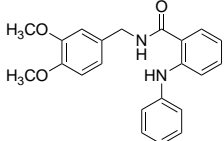
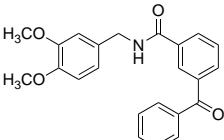
### 6.3.1.3 Substanzreihe 3: Derivate ohne Acridonsäurepartialstruktur

Innerhalb der im Folgenden beschriebenen Reihe von Verbindungen, in denen die Acridonsäuregrundstruktur systematisch verkleinert wurde, sollten anschließend in Analogie zu den LM-Verbindungen die für die aktivierenden Eigenschaften essentiellen Strukturmerkmale identifiziert werden. Die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay für diese Substanzen erhaltenen Testungsergebnisse sind in Tabelle 6.7 aufgeführt.

Die aktivierenden Eigenschaften der Verbindungen bleiben hier trotz der Ringöffnung der Acridonsäure erhalten. So besitzen die Benzophenonderivate MAC-344 und MAC-365 in submikromolaren Konzentrationen aktivierende Wirksamkeit gegenüber ABCB1. Dabei ist

MAC-344 mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,41 ähnlich wirksam wie das korrespondierende Acridonsäureamid MAC-249 ( $pEC_{50} = 6,30$ ), während MAC-365 ( $pEC_{50} = 6,16$ ) dreifach schwächer aktiv ist als das zyklische MAC-332 ( $pEC_{50} = 6,64$ ). Die Verbindungen MAC-327 und MAC-364, welche als substituierte Anthranilsäureamide angesehen werden können, besitzen hingegen beide eine geringere Wirksamkeit als die entsprechenden Acridonsäurederivate. Das Vorliegen der trizyklischen Acridonsäurepartialstruktur kann somit als nicht essentiell für die ABCB1 stimulierende Wirksamkeit der Arylamide eingestuft werden. Erstaunlicherweise scheint auch das Benzoessäureamid MAC-356 in Konzentrationen über 1  $\mu\text{mol/l}$  schwach aktivierende Eigenschaften zu besitzen.

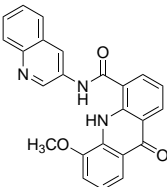
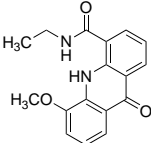
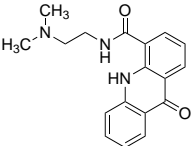
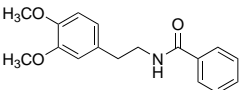
**Tabelle 6.7:** Biologische Aktivität der Derivate mit partial reduzierter Acridonsäurestruktur (Substanzreihe 3). Die angegebenen  $pEC_{50}$ -Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit A2780 Adr).

Substanz	Struktur	Aktivität	$pEC_{50} \pm SD$ (Rho 123)
MAC-327		Aktivierung	$6,10 \pm 0,14$
MAC-344		Aktivierung	$6,41 \pm 0,13$
MAC-364		Aktivierung	$5,92 \pm 0,15$
MAC-365		Aktivierung	$6,16 \pm 0,03$

## 6.3.1.4 Substanzreihe 4: Sonstige Arylamide

Abschließend wurden zusätzlich einige Acridonsäureamide mit variierten Aminokomponenten untersucht (siehe Tabelle 6.8). Es wird deutlich, dass dieser Teil des Moleküls nicht in jedem Falle aromatisch sein muss, um aktivierend wirksame Substanzen zu erhalten. So ist auch das Ethylderivat MAC-280 in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 zu stimulieren. Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Verbindung liegt dabei mit 6,43 in der Größenordnung der substituierten Phenylethylderivate aus Tabelle 6.6. Dies trifft auch auf die Dimethylaminoethylverbindung MAC-351 zu. Des Weiteren können in dieser Position auch größere aromatische Strukturen wie der Chinolinrest des MAC-216 ohne Aktivitätsverlust eingefügt werden. Dieses Derivat stellt mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 5,60 jedoch die am schwächsten wirksame Verbindung der gesamten Serie dar.

**Tabelle 6.8:** Biologische Aktivität der sonstigen Arylamide (Substanzreihe 4). Die angegebenen pEC<sub>50</sub>-Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Rhodamin 123-Akkumulationsassay mit A2780 Adr).

Substanz	Struktur	Aktivität	pEC <sub>50</sub> $\pm$ SD (Rho 123)
MAC-216		Aktivierung	5,60 $\pm$ 0,14
MAC-280		Aktivierung	6,43 $\pm$ 0,20
MAC-351		Aktivierung	6,21 $\pm$ 0,09
MAC-356		Aktivierung	5,66 $\pm$ 0,06

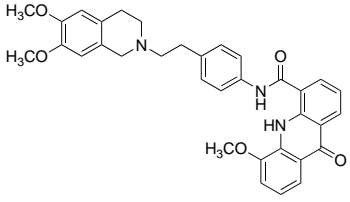
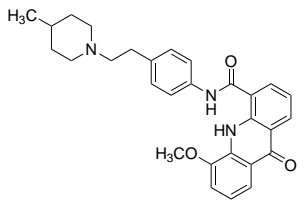


An dieser Stelle kann zusammenfassend festgehalten werden, dass mit den ursprünglich als Hemmstoffe des ABCG2 konzipierten „kleinen“ Acridonsäureamiden [110, 245] eine neue Klasse potenter ABCB1-Aktivatoren erschlossen werden konnte. Diese sind jedoch im Gegensatz zu den meisten zuvor beschriebenen Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ nicht spezifisch für diesen Transporter, da sie erwartungsgemäß zusätzlich inhibitorische Wirksamkeit gegenüber ABCG2 besitzen (siehe Kapitel 6.2.1 und [245]). Die im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten Aktivitätswerte liegen hierbei – ähnlich wie im Falle der Benzimidazole und 4-Aminothienopyrimidine – in einem relativ engen Bereich von etwa einer Zehnerpotenz, wobei im Gegensatz zu den LM-Derivaten (siehe Kapitel 5.3.1) auch durch größere strukturelle Modifikationen kein vollständiger Aktivitätsverlust erreicht wird.

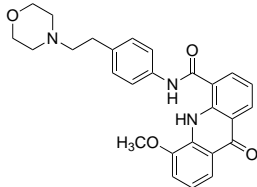
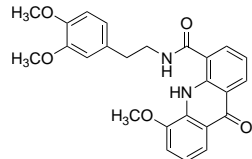
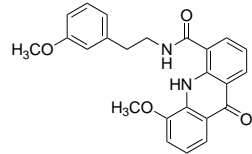
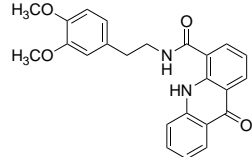
### 6.3.1.5 Testung ausgewählter Derivate im Daunorubicin-Akkumulationsassay

Da im Falle der Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ für einige Verbindungen deutliche Unterschiede hinsichtlich des Effektes auf den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 und Daunorubicin detektiert werden konnten, wurden einige wenige ausgewählte „kleine“ Acridonsäureamide sowie die Standardsubstanz GF120918 zusätzlich im Daunorubicin-Akkumulationsassay untersucht. Die erhaltenen Aktivitätsdaten sind in Tabelle 6.9 aufgeführt.

**Tabelle 6.9:** ABCB1 modulierende Eigenschaften ausgewählter Acridonsäureamide (Daunorubicin-Akkumulationsassay mit A2780 Adr Zellen). Die angegebenen  $pEC_{50}$ -Werte stellen, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

Substanz	Struktur	Aktivität	$pEC_{50} \pm SD$ (DNR)
GF120918		Inhibition	$6,90 \pm 0,20$
MAC-222		Inhibition	4,63 (n=1)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD (DNR)
MAC-226		k.E.	—
MAC-238		Aktivierung	6,88 ± 0,02
MAC-243		Aktivierung	7,14 ± 0,06
MAC-249		Aktivierung	6,15 ± 0,05

Hier sind grundsätzlich ähnliche Tendenzen erkennbar, wie im Rhodamin 123-Akkumulationsassay: Der ABCB1 vermittelte Transport von Daunorubicin wird durch GF120918 bereits in submikromolaren Konzentrationen gehemmt (pEC<sub>50</sub> = 6,90). Des Weiteren sind – in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen – die Verbindungen MAC-238, MAC-243 und MAC-249 in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport von Daunorubicin zu stimulieren. Die erhaltenen pEC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen liegen dabei im Bereich der im Rhodamin 123-Akkumulationsassay ermittelten Aktivitätsdaten (siehe Tabelle 6.6).

Ein abweichendes Verhalten ist im Falle der zum Inhibitor GF120918 strukturell ähnlichen Verbindungen MAC-222 und MAC-226 zu beobachten. So ist für das 4-Methylpiperinderivat MAC-222 lediglich eine sehr schwache inhibitorische Aktivität messbar. Die unter Verwendung von Rhodamin 123 als Substrat detektierte leicht aktivierende Wirkung dieser Verbindung kann für Daunorubicin nicht nachgewiesen werden. Weitere Unterschiede zwischen den Substraten zeigen sich auch bei Betrachtung des Morpholinderivates MAC-226. Während im

Rhodamin 123-Akkumulationsassay eine Aktivierung von ABCB1 festgestellt werden kann, besitzt die Substanz keinen Einfluss auf den Transport von Daunorubicin. Somit ist auch im Falle der Aktivatoren vom Acridonsäureamid-Typ eine gewisse Substratabhängigkeit der ABCB1 aktivierenden Eigenschaften zu beobachten. Auf diesen Aspekt soll in Kapitel 7.1 detaillierter eingegangen werden.



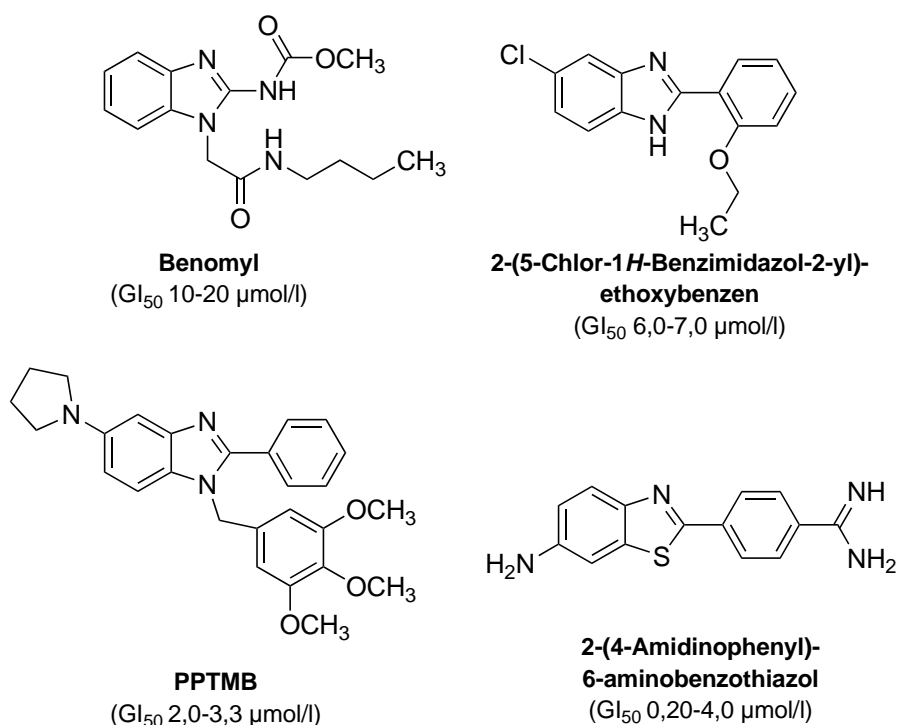
## 7 Untersuchungen zur Aktivierung von ABCB1

### 7.1 Substratspezifität der Aktivierung von ABCB1 durch Benzimidazole und Acridonsäureamide

Den Ausgangspunkt der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen stellte die Beobachtung von Kondratov *et al.* dar, dass QB102 das Substratspektrum des ABCB1 modifiziert, indem es den Transport verschiedener Substanzen in unterschiedlicher Art und Weise beeinflusst [123]. So wurde von den Autoren neben der Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports von Anthrazyklinen und Rhodamin 123 auch eine Verringerung des Efflux bestimmter Verbindungen – unter anderem Paclitaxel, *Vinca*-Alkaloide und Hoechst 33342 – nachgewiesen.

Diese Einteilung der Substrate deckt sich zum Teil mit dem von Shapiro und Ling postulierten Modell zweier Bindungsstellen, welche sich gegenseitig im Sinne einer positiven Kooperativität beeinflussen [44]. Demnach binden Rhodamin 123 und Anthrazykline an die sogenannte Rhodamin-Bindungsstelle während Hoechst 33342 und Colchicin die Hoechst-Bindungsstelle besetzen. Die *Vinca*-Alkaloide hingegen sollen Affinität zu beiden Bindungsstellen besitzen. Basierend auf diesem Modell wurde postuliert, dass QB102 den Transport von Substraten der Hoechst-Bindungsstelle kompetitiv inhibiert, während die positive Kooperativität zwischen den beiden Bindungsstellen zu einer Stimulation des Efflux von Anthrazyklinen und Rhodamin 132 führt. Demnach wäre davon auszugehen, dass QB102 an die Hoechst-Bindungsstelle von ABCB1 bindet [123, 237].

Basierend auf diesen Erkenntnissen aus der Literatur sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung der in den Kapiteln 5 und 6.3 charakterisierten neuen Aktivatoren auf den Transport verschiedener Substrate untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss einer definierten Konzentration der Benzimidazole, Benzothiazole und Acridonsäureamide auf die ABCB1 vermittelte Resistenz von A2780 Adr Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika mittels MTT-Assay bestimmt. Um sicherzustellen, dass die für diese Experimente ausgewählte Modulatorkonzentration selbst keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum besitzt, wurde zunächst die Toxizität der Verbindungen untersucht.

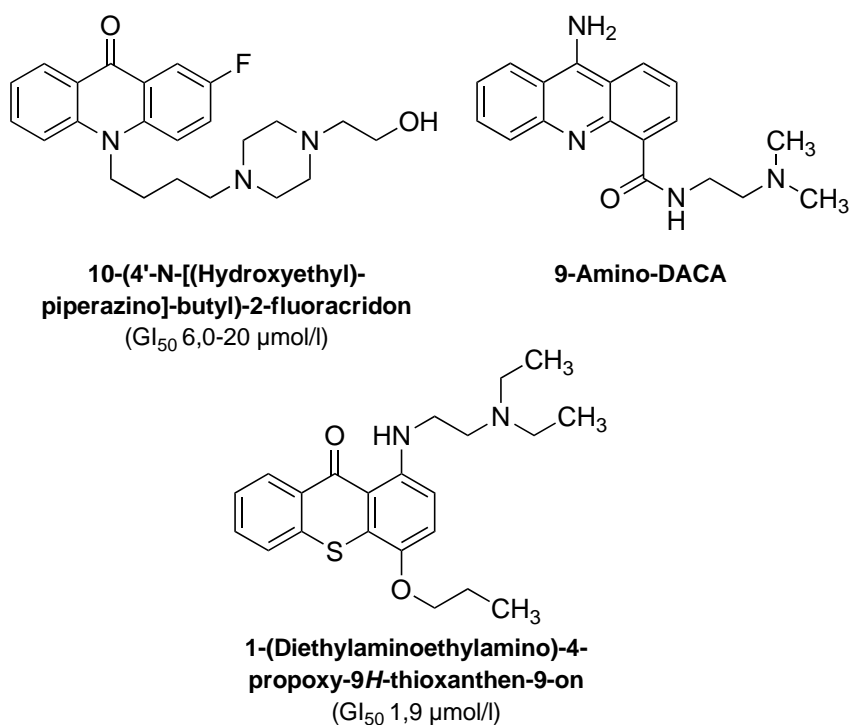


**Abbildung 7.1:** Strukturen literaturbekannter zytostatisch wirksamer Benzimidazole und Benzothiazole. Zusätzlich angegeben ist der Bereich der in unterschiedlichen Karzinomzelllinien bestimmten GI<sub>50</sub>-Werte von Benomyl [257], PPTMB (2-Phenyl-5-(pyrrolidin-1-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1H-benzimidazol) [258] sowie ausgewählter Vertreter der in [259] und [260] beschriebenen Substanzklassen.

### 7.1.1 Zytotoxizität der Modulatoren

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Modulatoren wurde jeweils der Einfluss zweier ausgewählter Konzentrationen der Substanzen (1 und 10 µmol/l) auf das Wachstum von A2780 Adr und A2780 Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Neben den für die später beschriebenen Kombinationsversuche vorgesehenen Verbindungen wurde auch ein großer Teil der übrigen Aktivatoren in dieses Screening mit einbezogen, da in der Literatur bereits eine Vielzahl strukturell eng mit den LM- und MAC-Derivaten verwandter zytostatisch wirksamer Substanzen beschrieben ist (siehe Abbildungen 7.1 und 7.2).

Laryea *et al.* konnten beispielsweise für das aufgrund seiner fungiziden Eigenschaften ursprünglich als Pflanzenschutzmittel eingesetzte Benomyl sowie dessen aktiven Metaboliten Carbendazim eine in mikromolaren Konzentrationen auftretende zytostatische Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien nachweisen [257]. Der Wirkmechanismus dieser Substanzen konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden; diskutiert werden sowohl ein Einfluss auf die Tubulinpolymerisation als auch die direkte Interaktion mit der DNA. Eine stärkere zytostatische Aktivität weist das von Chang *et al.* charakterisierte 2-Phenyl-



**Abbildung 7.2:** Strukturformeln ausgewählter mit Acridonsäureamiden strukturell verwandter zytostatisch wirksamer Verbindungen. Für die in [261, 262] und [120] beschriebenen Fluoracridone und Thioxanthere ist der Bereich der in unterschiedlichen Zellmodellen bestimmten  $GI_{50}$ -Werte angegeben. Für 9-Amino-DACA (9-Amino-N-(2-(dimethylamino)ethyl)acridin-4-carboxamid) ist keine halbmaximale Hemmkonzentration beschrieben [263].

5-(pyrrolidin-1-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1*H*-benzimidazol (PPTMB) auf, dessen  $GI_{50}$ -Wert im unteren mikromolaren Bereich liegt [258]. Auch für diese Substanz konnte unter anderem eine Inhibition der Tubulinpolymerisation als Grundlage für die zytostatischen Eigenschaften der Verbindung nachgewiesen werden. Da die genannten Substanzen – im Gegensatz zu den sonstigen therapeutisch eingesetzten Mitosehemmstoffen (*Vinca*-Alkaloide, Paclitaxel) – keine Substrate des ABCB1 sind, stellen sie interessante Ausgangspunkte für die Entwicklung neuartiger Zytostatika dar.

Weitere zytotoxische Verbindungen, welche eine große strukturelle Ähnlichkeit insbesondere zu den LM-H-Derivaten aufweisen (siehe Abbildung 7.1), stellen die von Coban *et al.* publizierten 1*H*-Benzimidazole dar [259]. Diese sollen das Zellwachstum durch eine Topoisomeraseinhibition hemmen. Einen anderen Wirkmechanismus besitzen die verwandten 2-Phenylbenzothiazole, deren in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesene Zytotoxizität vermutlich auf eine Inhibition verschiedener Kinasen zurückzuführen ist [260].

Neben den beschriebenen Benzimidazolen und -thiazolen ist auch eine Reihe von zytostatisch wirksamen Substanzen bekannt, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den „klei-

nen“ Acridonsäureamiden aufweisen (siehe Abbildung 7.2). Insbesondere Acridine wie das 9-Amino-DACA [263] sowie die von Mayur *et al.* beschriebenen Fluoracridone [261, 262] weisen eine zytostatische Aktivität auf, die hier jedoch insbesondere auf die Interkalation der Moleküle in die DNA-Doppelhelix zurückzuführen ist. Des Weiteren sind auch die bereits erwähnten Thioxanthone in niedrigen mikromolaren Konzentrationen zytotoxisch [120]. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass einige dieser Verbindungen sowohl zytostatische als auch ABCB1 inhibierende Eigenschaften besitzen. Diese stellen somit interessante dual wirksame Arzneistoffkandidaten für die Therapie von Tumoren dar, die eine ABCB1 vermittelte multiple Zytostatikaresistenz aufweisen.

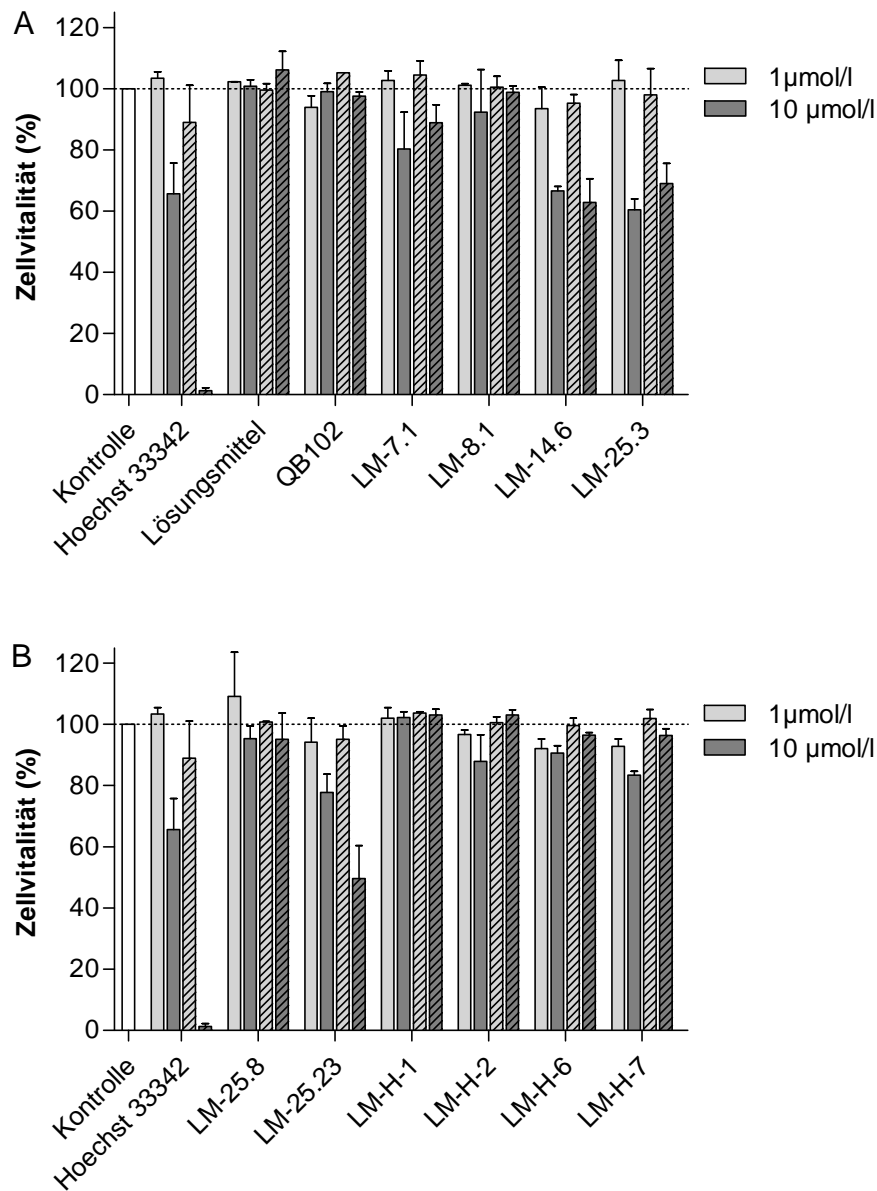
Aufgrund der bereits erwähnten strukturellen Ähnlichkeit der innerhalb dieser Arbeit untersuchten Aktivatoren von ABCB1 zu den beschriebenen zytostatisch wirksamen Verbindungen wurden fast alle LM- und MAC-Aktivatoren in einem Screening bezüglich ihrer Toxizität gegenüber ABCB1 exprimierenden und entsprechenden sensitiven Zellen (A2780 Adr und A2780) untersucht. Als Standard diente Hoechst 33342. Zusätzlich wurde der Einfluss des aufgrund der begrenzten Wasserlöslichkeit vieler Testsubstanzen benötigten Zusatzes an organischem Lösemittel (DMSO, Methanol) in einer weiteren Probe charakterisiert.

### **Modulatoren vom Benzothiazol- und Benzimidazol-Typ**

In Abbildung 7.3 sind die Ergebnisse des Toxizitätsscreenings der Aktivatoren und Inhibitoren vom Benzimidazol- und Benzothiazol-Typ grafisch dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier jedoch nicht alle untersuchten Verbindungen aufgeführt; insbesondere auf die Darstellung sämtlicher nicht toxischer Verbindungen wurde verzichtet. Es ist erkennbar, dass der als Standard eingesetzte DNA-interkalierende Farbstoff Hoechst 33342 erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Toxizität gegenüber beiden Zelllinien aufweist. Diese ist in der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie A2780 Adr aufgrund des Substratcharakters der Verbindung schwächer ausgeprägt als in den entsprechenden sensitiven Zellen. Des Weiteren wird deutlich, dass der zum Lösen der Aktivatoren eingesetzte Anteil an organischem Lösungsmittel keinen Einfluss auf das Wachstum beider Zelllinien besitzt (Abbildung 7.3, A). Die im Folgenden beschriebenen Effekte sind damit ausschließlich auf die Toxizität der Aktivatoren zurückzuführen. Dies gilt analog auch für die Acridonsäureamide, die in gleicher Art und Weise verdünnt wurden.

Der Aktivator QB102 besitzt in keiner der beiden untersuchten Konzentrationen eine erkennbare Toxizität gegenüber den eingesetzten Zelllinien (Abbildung 7.3, A). Des Weiteren weisen auch die entsprechenden Cyano- und Nitroderivate LM-7.1 und LM-7.3 (nicht dargestellt) nur eine geringfügig stärkere Zytotoxizität auf als die Ausgangsverbindung.





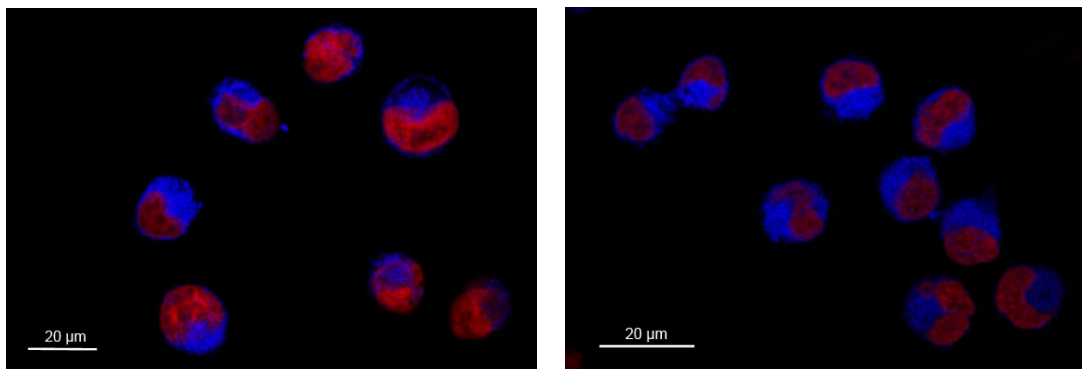
**Abbildung 7.3:** Toxizitätsscreening der ABCB1 Modulatoren vom Benzimidazol- und Benzothiazol-Typ. Die Zytotoxizität der Verbindungen (1 und 10 µmol/l) sowie des zugesetzten Lösungsmittels wurde im MTT-Assay unter Verwendung der Zelllinien A2780 Adr (nicht schraffierte Balken) und A2780 (schraffierte Balken) ermittelt (n=2). Als Standard wurde Hoechst 33342 verwendet.

Ebenfalls keinen Einfluss auf das Zellwachstum besitzen die in Position N<sup>9</sup> aliphatisch substituierten *9H*-Imidazobenzimidazole. Exemplarisch sind in Abbildung 7.3 A die für LM-8.1 erhaltenen Versuchsergebnisse dargestellt. Sowohl die übrigen N<sup>9</sup>-methylierten Derivate als auch QB11 und LM-25.1 verhalten sich diesbezüglich gleich: Das Zellwachstum in Anwesenheit von 10 µmol/l der Testsubstanzen beträgt in allen Fällen mindestens 80 % der unbehandelten Kontrolle, woraus geschlossen werden kann, dass die Verbindungen keine relevante Zytotoxizität aufweisen. Ausgehend davon wurde für die Untersuchung des Einflusses von QB102, LM-7.1 und LM-8.1 auf den Transport unterschiedlicher Substrate eine Konzentration der Aktivatoren von 10 µmol/l ausgewählt.

Leichte proliferationshemmende Eigenschaften besitzen hingegen viele der in Position N<sup>9</sup> aromatisch substituierten Verbindungen, wobei das in Abbildung 7.3 A repräsentativ aufgeführte LM-14.6 insgesamt die größte Toxizität unter den Benzylderivaten aufweist. Die Inhibitoren LM-25.2 (nicht dargestellt) und LM-25.3 besitzen insgesamt eine ähnliche Zytotoxizität. Neben den genannten Aktivatoren sollte zusätzlich auch ein Inhibitor hinsichtlich seiner Wirkung auf den ABCB1 vermittelten Transport verschiedener Zytostatika untersucht werden. Da LM-25.3 mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 5,54 (Daunorubicin-Akkumulationsassay, siehe Kapitel 5.3.1) die am stärksten inhibitorisch wirksame LM-Verbindung darstellt, wurde diese für die Kombinationsversuche ausgewählt. Trotz der Zytotoxizität der Substanz wurde auch hier eine Konzentration von 10 µmol/l eingesetzt, um überhaupt einen signifikanten Effekt des insgesamt eher schwach wirksamen Hemmstoffs detektieren zu können. Da die toxische Wirkung der Verbindung des Weiteren in beiden Zelllinien gleich stark ausgeprägt ist, ist davon auszugehen, dass dennoch aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden können.

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zu den literaturbekannten zytostatisch wirksamen Verbindungen (siehe Abbildung 7.1) erschien insbesondere die Charakterisierung der Toxizität der 2-Aryl-*1H*-benzimidazole interessant. Wie Abbildung 7.3 B zu entnehmen ist, weist jedoch keine der Verbindungen in Konzentrationen bis 10 µmol/l einen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von A2780 und A2780 Adr Zellen auf. Eine erst in höheren Konzentrationen auftretende Zytotoxizität der Substanzen ist zwar nicht auszuschließen, diese wäre jedoch für eine mögliche therapeutische Anwendung derartiger Substanzen zu gering. Höhere Konzentrationen wurden aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit einiger Verbindungen nicht untersucht.

Insgesamt besitzen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierten Benzimidazole keine oder nur sehr geringe zytostatische Aktivität. Lediglich einige Verbindungen, die in Position N<sup>9</sup> größere Substituenten aufweisen, sind in der Lage, das Wachstum der untersuchten Zelllinien zu hemmen. Neben den bereits erwähnten Benzyl-substituierten Verbindungen trifft dies insbesondere auch auf das im Daunorubicin-Akkumulationsassay schwach inhibi-



**Abbildung 7.4:** Untersuchung des Substratcharakters des Aktivators LM-8.1 (10  $\mu\text{mol/l}$ , blau) mittels Fluoreszenzmikroskopie in A2780 Adr (links) und A2780 Zellen (rechts). Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid angefärbt (rot).

torisch wirksame Pyrrolidinderivat LM-25.23 zu (siehe Abbildung 7.3, B). Diese Substanz besitzt des Weiteren eine etwas schwächere zytotoxische Wirkung gegenüber A2780 Adr Zellen als in der korrespondierenden sensitiven Zelllinie. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Verbindung ein Substrat von ABCB1 ist. Für das analoge Piperidinderivat LM-25.8 kann ein derartiger Effekt aufgrund dessen geringer Toxizität jedoch nicht beobachtet werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Inhibitoren von ABCB1 häufig auch Substrate dieses ABC-Transporters sind. Hierzu zählen beispielsweise die Inhibitoren der ersten Generation Verapamil und Ciclosporin. Des Weiteren werden auch viele der Substanzen, die in der Lage sind, den ABCB1 vermittelten Transport zu aktivieren, transportiert. So sind beispielsweise die in Kapitel 5.1 als aktivierend wirksam identifizierten Substanzen Colchicin, Hoechst 33342 und Progesteron ebenfalls Substrate des ABCB1 [28, 36]. Für die LM-Verbindungen kann ein derartiger Substratcharakter anhand der im MTT-Assay erhaltenen Daten nicht nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere auf deren geringe Toxizität gegenüber den verwendeten Zelllinien zurückzuführen, da eine mögliche geringere Zytotoxizität in ABCB1 exprimierenden Zellen, wie sie im Falle eines Substrates zu erwarten wäre, hier nicht erkennbar ist.

Aufgrund der dem Hoechst 33342 ähnelnden Fluoreszenzeigenschaften einiger Benzimidazole konnte dieser Sachverhalt zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. So kann die intrazellulär vorhandene Menge des Aktivators LM-8.1 unter Verwendung des DAPI-Filters ( $\lambda_{\text{ext.}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 425\text{-}475 \text{ nm}$ ) visualisiert werden. In Abbildung 7.4 sind entsprechende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt, wobei die Zellkerne mit Propidiumiodid (rot) angefärbt wurden. Es wird deutlich, dass in den Zelllinien A2780 Adr und A2780 eine nahezu identische Fluoreszenzintensität des LM-8.1 (blau) detektiert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass die Verbindung kein Substrat des ABCB1 darstellt. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Substanzen Colchicin, Hoechst 33342 und Progesteron ist

LM-8.1 somit in der Lage, den ABCB1 vermittelten Efflux verschiedener Substrate zu stimulieren, ohne selbst transportiert zu werden. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der sonstigen Aktivatoren zu LM-8.1 kann des Weiteren davon ausgegangen werden, dass dies auch auf die übrigen aktivierend wirksamen *9H*-Imidazobenzimidazole und *2-Aryl-1H*-benzimidazole zutrifft. Die Inhibitoren wurden diesbezüglich nicht näher charakterisiert.

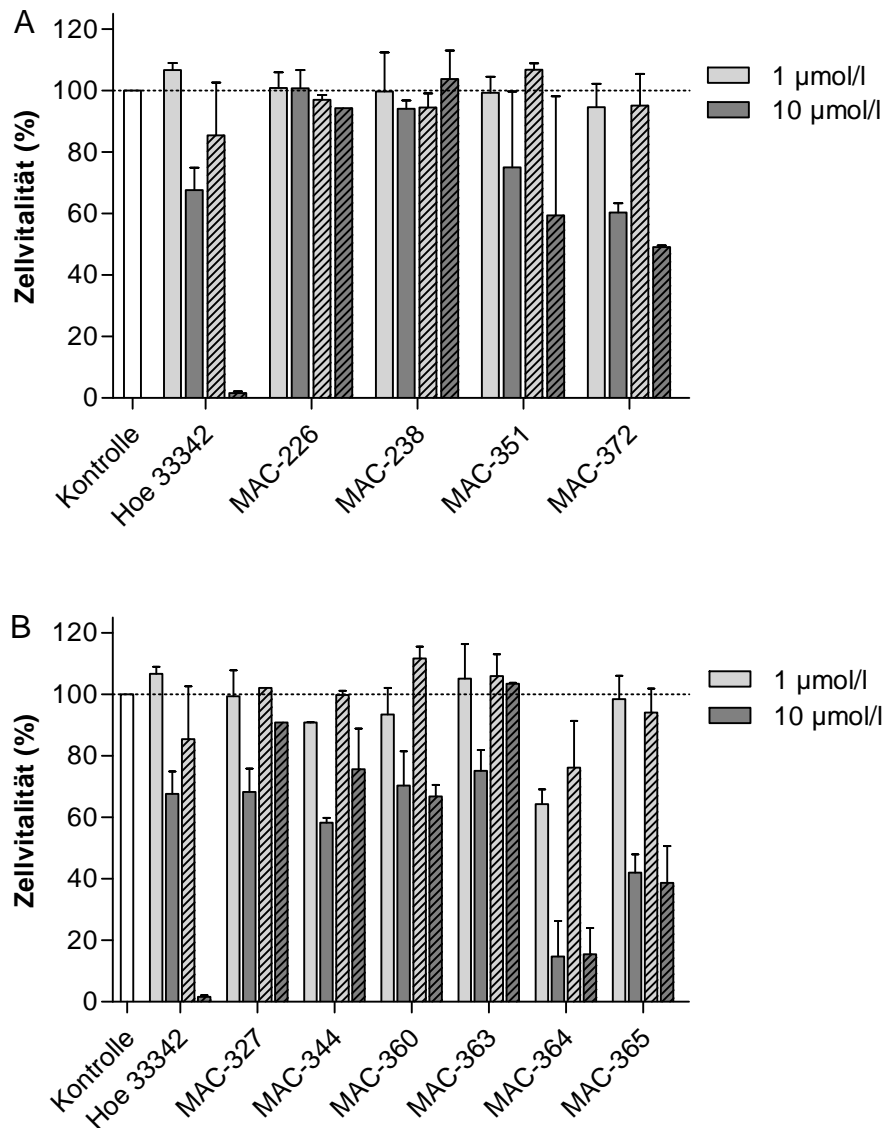
### **Aktivatoren vom Acridonsäureamid-Typ**

In analoger Art und Weise, wie zuvor für die LM-Verbindungen beschrieben, wurden auch die aktivierend wirksamen Acridonsäureamide hinsichtlich einer potentiellen zytotoxischen Wirkung untersucht. Auch in dieser Versuchsreihe wurde Hoechst 33342 als Standard eingesetzt.

Wie Abbildung 7.5 A zu entnehmen ist, weisen die beiden für die in Kapitel 7.1.2 beschriebenen Kombinationsexperimente verwendeten Substanzen MAC-226 und MAC-238 in Konzentrationen bis 10 µmol/l keinerlei Toxizität gegenüber A2780 und A2780 Adr Zellen auf.

Auch die übrigen Acridonsäureamide besitzen insgesamt nur eine geringe zytostatische Aktivität. Die in Abbildung 7.5 A exemplarisch aufgeführte Verbindung MAC-372 stellt die am stärksten wirksame Substanz dar, welche in einer Konzentration von 10 µmol/l das Wachstum beider Zelllinien um etwa 40-50 % reduziert. Damit ist MAC-372 ähnlich toxisch wie einige der von Mayur *et al.* publizierten Fluoracridone [261, 262]. Eine vergleichbare Zytotoxizität weist auch das zum 9-Amino-DACA (siehe Abbildung 7.2) analoge Acridon MAC-351 auf. Hier werden jedoch insbesondere bei einer Konzentration von 10 µmol/l vermutlich aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindung sehr stark schwankende Ergebnisse erhalten.

Eine signifikante Zytotoxizität weisen des Weiteren einige der MAC-Verbindungen mit modifizierter Acridonsäurepartialstruktur auf, wobei das Anthranilsäureamid MAC-364 sowie das Benzophenon MAC-365 die am stärksten toxischen Substanzen aus dieser Serie von Aktivatoren darstellen (siehe Abbildung 7.5, B). Insbesondere MAC-364 führt in einer Konzentration von 10 µmol/l zu einer fast vollständigen Hemmung der Zellproliferation. Die übrigen aufgeführten Verbindungen besitzen insgesamt eine geringere Toxizität; erstaunlicherweise scheinen jedoch die Substanzen MAC-327, MAC-344 und MAC-363 einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie A2780 Adr zu besitzen als auf jenes der sensitiven Zellen. Eine derartige Wirkung wurde in der Literatur bereits für eine Reihe strukturell äußerst diverser Substanzen beschrieben und stellt einen interessanten Ansatz für die Therapie von Tumoren, die eine auf der Expression von ABCB1 beruhende multiple Zytostatikaresistenz aufweisen, dar [264, 265]. Die mechanistische Grundlage der selektiven Toxizität gegenüber ABCB1 überexprimierenden Zellen konnte jedoch bislang nicht geklärt werden. Im Falle der im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierten Verbindungen,



**Abbildung 7.5:** Toxizitätsscreening der ABCB1 Aktivatoren vom Acridonsäureamid-Typ. Die Zytotoxizität der Verbindungen (1 und 10 µmol/l) wurde im MTT-Assay unter Verwendung der Zelllinien A2780 Adr (nicht schraffierte Balken) und A2780 (schraffierte Balken) ermittelt (n=2). Als Standard wurde Hoechst 33342 verwendet.

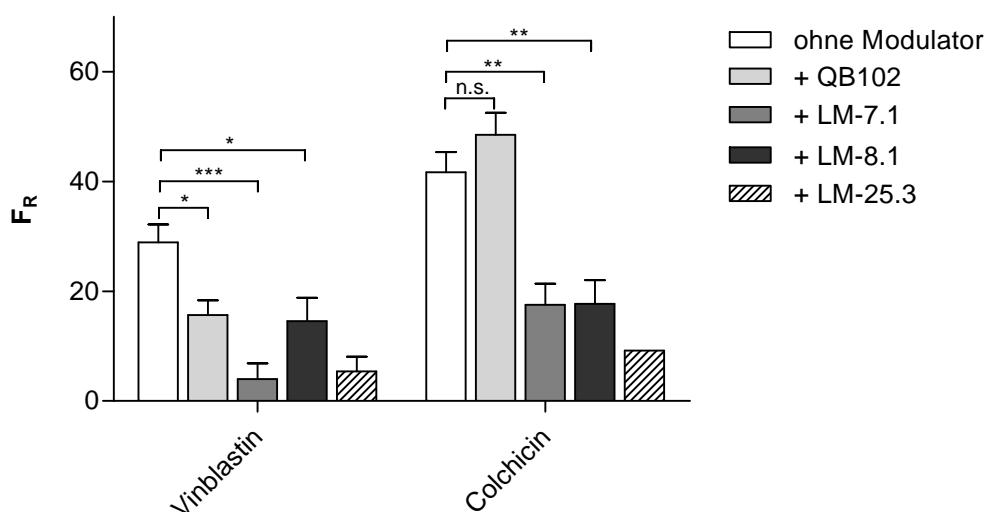
die ein derartiges Verhalten aufweisen, ist der beobachtete Unterschied zwischen den Zelllinien jedoch insgesamt eher gering. Des Weiteren ist auch die Toxizität der Aktivatoren nur schwach ausgeprägt. Um eine selektive Toxizität gegenüber ABCB1 exprimierenden Zellen sicher nachweisen zu können, müssten die genannten Substanzen z.B. durch die Aufnahme vollständiger Konzentrations-Effekt-Kurven näher charakterisiert werden. Da die Untersuchungen zur Zytotoxizität jedoch in dieser Arbeit nur einen Nebenaspekt darstellen, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl in der Gruppe der Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ als auch im Falle der Acridonsäureamide trotz der teils großen strukturellen Ähnlichkeit mit bekannten zytostatisch wirksamen Substanzen nur sehr wenige Verbindungen überhaupt eine signifikante Toxizität gegenüber den untersuchten Zelllinien aufweisen. Insbesondere die für Untersuchungen zur Substratabhängigkeit der ABCB1 Aktivierung vorgesehenen Verbindungen MAC-226, MAC-238, QB102, LM-7.1 und LM-8.1 sowie mit Einschränkungen auch der Inhibitor LM-25.3 besitzen keinen Einfluss auf das Wachstum von A2780 und A2780 Adr Zellen. Des Weiteren deuten die im MTT-Assay erhaltenen Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass die meisten untersuchten Substanzen keine Substrate des Transporters sind. Dies konnte am Beispiel des LM-8.1 zusätzlich durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden.

### 7.1.2 Einfluss auf den Transport zytostatisch wirksamer Arzneistoffe

Um den Einfluss der neuartigen Aktivatoren auf die Toxizität verschiedener Substrate in ABCB1 überexprimierenden A2780 Adr Zellen zu untersuchen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven der Zytostatika in An- und Abwesenheit einer definierten Konzentration ausgewählter Aktivatoren aufgenommen. Diese wurde basierend auf den Ergebnissen der vorausgehenden Kapitel so festgelegt, dass die Testsubstanz über eine möglichst maximale aktivierende Wirksamkeit im Daunorubicin-Akkumulationsassay verfügt, ohne jedoch eine signifikante Eigentoxizität aufzuweisen (siehe Kapitel 5.3.1, 6.3 und 7.1.1). Basierend auf den von Kondratov *et al.* publizierten Daten [123] wurden zunächst die Zytostatika Vinblastin und Colchicin aufgrund ihrer unterschiedlichen postulierten Interaktion mit QB102 für diese Experimente ausgewählt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung des QB102 sowie der mit diesem eng verwandten LM-Substanzen auf die Zytotoxizität von Vinblastin und Colchicin untersucht. Die Konzentration der Aktivatoren QB102, LM-7.1 und LM-8.1 sowie des als Kontrolle eingesetzten Inhibitors LM-25.3 betrug dabei in allen Fällen 10  $\mu\text{mol/l}$ . Die aus den  $\text{pGI}_{50}$ -Werten der erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven berechneten Resistenzfaktoren der A2780 Adr Zellen gegenüber den Zytostatika sind in Abbildung 7.6 grafisch dargestellt.



**Abbildung 7.6:** Resistenzfaktoren ( $F_R$ ) von A2780 Adr Zellen gegenüber unterschiedlichen Zytostatika in An- und Abwesenheit verschiedener Benzimidazole und Benzothiazole. Die Konzentration der Aktivatoren QB102, LM-7.1, LM-8.1 sowie des Inhibitors LM-25.3 betrug in allen Experimenten  $10 \mu\text{mol/l}$ . Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus einer Serie dreier unabhängiger Experimente. Zweiseitiger t-Test, n.s. nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Es wird deutlich, dass der Inhibitor LM-25.3 erwartungsgemäß in der Lage ist, die ABCB1 vermittelte Resistenz der Zelllinie A2780 Adr gegenüber beiden betrachteten Zytostatika fast vollständig aufzuheben. Da in der zugehörigen sensitiven Zelllinie keinerlei Effekt beobachtet werden kann (nicht dargestellt), ist davon auszugehen, dass diese Wirkung ausschließlich durch die Hemmung des ABCB1 hervorgerufen wird.

Die für QB102 erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Kondratov *et al.* [123]: Während der Transport von Colchicin durch QB102 nicht signifikant beeinflusst wird, führt die Koinkubation mit der Verbindung zu einer deutlichen Reduktion der Resistenz gegenüber Vinblastin, welche auf eine Inhibition von ABCB1 schließen lässt.

Geringfügig anders verhalten sich trotz der engen strukturellen Verwandtschaft zu QB102 die neuartigen Aktivatoren LM-7.1 und LM-8.1. Auch durch diese Substanzen wird in Analogie zu QB102 die Sensitivität der A2780 Adr Zellen gegenüber dem Mitosehemmstoff Vinblastin signifikant erhöht. Jedoch sind diese Verbindungen – anders als QB102 – zusätzlich in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport von Colchicin zu hemmen, was sich in einer deutlichen Reduktion der Resistenz gegenüber diesem Zytostatikum äußert. Die Abnahme der Resistenz ist dabei relativ betrachtet in den meisten Fällen sogar noch stärker ausgeprägt, als im Falle des Vinblastin.

Als Grundlage für die Erklärung dieser Beobachtungen kann das zuvor beschriebene Modell von Shapiro und Ling [44] dienen: Colchicin stellt ähnlich wie Hoechst 33342 ein Substrat

der Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1 dar, welches durch die Bindung der LM-Verbindung von dieser verdrängt wird. Dies führt zu einer Verringerung des Transports und damit zu einer Aufhebung der Resistenz gegenüber dem Zytostatikum. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass auch Colchicin in hohen Konzentrationen in der Lage ist, den ABCB1 vermittelten Transport von Daunorubicin und Rhodamin 123 zu stimulieren (siehe Kapitel 5.1). Der Transport von Vinblastin hingegen, welches Affinität zu beiden postulierten Bindungsstellen besitzen soll, wird durch die Bindung der Aktivatoren weniger beeinflusst.

Die LM-Derivate entfalten somit ihre aktivierende Wirkung vor allem dann, wenn sie mit möglichst spezifischen Substraten der Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 (Rhodamin 123, Tetramethylrosamin, Daunorubicin) interagieren. Dennoch sind in einigen Fällen deutliche Unterschiede insbesondere zwischen Rhodamin 123 und Daunorubicin erkennbar: Neben den für viele Aktivatoren ermittelten deutlich differierenden  $pEC_{50}$ -Werten gegenüber den beiden Substraten existieren zusätzlich Verbindungen, die in den verschiedenen Akkumulationsassays sogar vollständig verschiedene Effekte auf den Transport von Rhodamin 123 und Daunorubicin besitzen. Dies trifft insbesondere auf einige 2-Aryl-1*H*-benzimidazole zu, die den Efflux von Daunorubicin hemmen, während gegenüber Rhodamin 123 weiterhin eine aktivatorische Wirksamkeit festgestellt werden kann (siehe Kapitel 5.3.1).

Somit existieren trotz der gemeinsamen postulierten Bindungsstelle von Rhodamin- und Anthrazyklinderivaten gewisse Unterschiede zwischen den beiden Klassen von Substraten. Basierend auf den dargestellten Erkenntnissen kann davon ausgegangen werden, dass die Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 – auch aufgrund der mäßigen strukturellen Übereinstimmung der genannten Substrate – eher als eine bevorzugte Bindungsregion innerhalb der intrazellulären Kavität des Transporters angesehen werden kann [66, 235]. Unterstützt wird diese These durch die Untersuchungen von Lugo *et al.*, die nachweisen konnten, dass Rhodamin 123 und der Farbstoff LDS-751, der ebenfalls Affinität zur Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 besitzen soll [65], simultan an das Protein binden können [75].

Die Lokalisation dieser Region wurde unter Verwendung verschiedener Ansätze intensiv untersucht. So konnten beispielsweise Loo *et al.* mittels zielgerichteter Mutationsstudien zeigen, dass insbesondere Aminosäuren innerhalb der TMDs 6, 9 und 12 an der Bindung von Rhodaminderivaten beteiligt sind [67]. Weiterhin postulierten Lugo *et al.* basierend auf FRET-Untersuchungen mit dem Farbstoff LDS-751 eine Lokalisation innerhalb der zytoplasmatischen Hälfte der Zellmembran nahe den NBDs [68]. In analoger Art und Weise wurde auch die Anordnung der sogenannten Hoechst-Bindungsstelle im transmembranären Bereich des Proteins – jedoch in größerer Distanz zu den NBDs – vorgeschlagen [69]. Aufgrund der relativ großen strukturellen Diversität der postulierten Substrate dieser Bindungsstelle kann auch hier davon ausgegangen werden, dass es sich um eine bevorzugte Bindungsregion an-

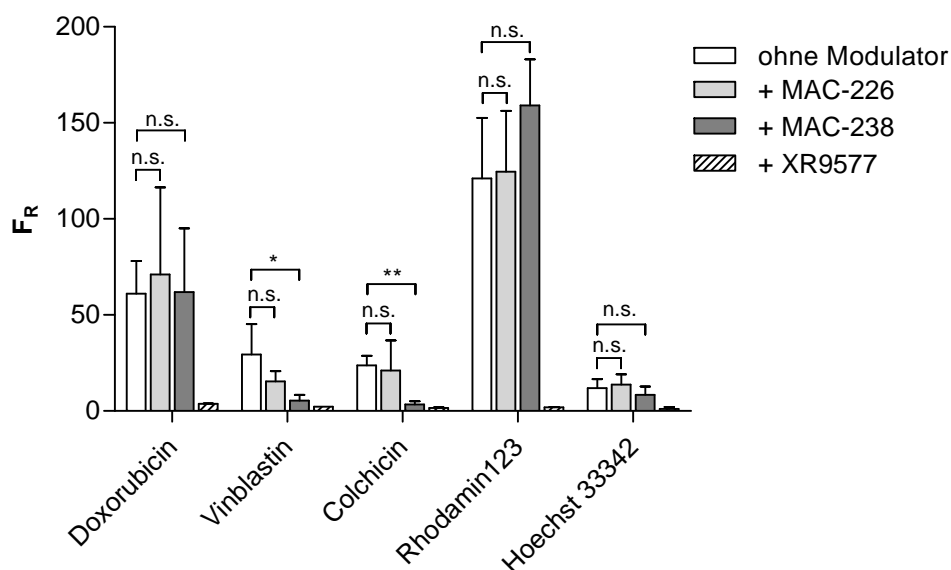


stelle eng definierter Aminosäuren, die eine definierte Bindungsstelle bilden, handelt. Darauf deutet auf funktioneller Ebene beispielsweise der unterschiedliche Einfluss von QB102 und anderen LM-Verbindungen auf den Transport von Colchicin hin.

Des Weiteren muss die von Shapiro und Ling postulierte gegenseitige Stimulation des Daunorubicin- und Hoechst 33342 Transports [44] vor dem Hintergrund der in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Löschung der Daunorubicin-Fluoreszenz durch Hoechst 33342 kritisch hinterfragt werden. In einer vorherigen Arbeit konnte außerdem eine Löschung der Fluoreszenz des Hoechst 33342 durch Rhodamin 123 beobachtet werden [168]. Somit kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die für Rhodamin 123 und Daunorubicin vorgeschlagene identische Interaktion mit Hoechst 33342 nicht auf ein experimentelles Artefakt zurückzuführen ist. Insgesamt deuten die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten dennoch auf eine insgesamt sehr ähnliche Interaktion dieser Substrate mit den Aktivatoren hin, weshalb eine auf dem Modell von Shapiro und Ling basierende grobe Klassifizierung der ABCB1-Substrate mit gewissen Einschränkungen möglich erscheint.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde auch der Einfluss zweier ausgewählter „kleiner“ Acridonsäureamide auf die Toxizität der oben genannten Zytostatika untersucht. Zusätzlich wurden analoge Kombinationsexperimente mit den ebenfalls zytotoxischen Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin 123 und Hoechst 33342 sowie dem Anthrazyklinderivat Doxorubicin durchgeführt. Ausgehend von den in Kapitel 6.3 vorgestellten Daten wurden hierfür die Verbindungen MAC-226 und MAC-238 (5  $\mu\text{mol/l}$ ) verwendet, welche sich insbesondere durch ihre unterschiedliche Wirksamkeit im Daunorubicin-Akkumulationsassay auszeichnen. Als Positivkontrolle diente der Standardinhibitor XR9577 (3  $\mu\text{mol/l}$ ), welcher – wie in Abbildung 7.7 zu erkennen ist – die ABCB1 vermittelte Resistenz gegenüber allen Substraten aufhebt, was für eine vollständige Inhibition des Transporters spricht.

Wie Abbildung 7.7 zu entnehmen ist, zeigt das Acridonsäureamid MAC-238 ein weitgehend identisches Verhalten, wie die zuvor beschriebenen LM-Verbindungen: Die Substanz hebt die Resistenz gegenüber Vinblastin und Colchicin vollständig auf. Es kann somit von einer Inhibition des ABCB1 vermittelten Transports dieser Substrate durch MAC-238 ausgegangen werden. Dagegen kann kein Einfluss der Verbindung auf die Resistenz gegenüber Doxorubicin und Rhodamin 123 festgestellt werden. Zwar ist teilweise eine leichte Erhöhung des Resistenzfaktors erkennbar, diese ist jedoch insbesondere bei Betrachtung der Einzelerperimente nicht signifikant. Die in Kapitel 6.3 nachgewiesene Stimulation des Transports von Anthrazyklinen und Rhodamin 123 ist damit auf Resistenzebene nicht eindeutig detektierbar. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die in den Akkumulationsassays festgestellte nur etwa zweifache Aktivierung des ABCB1 zu schwach ausgeprägt ist, um im MTT-Assay eine eindeutig feststellbare Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve des Zytostatikums zu

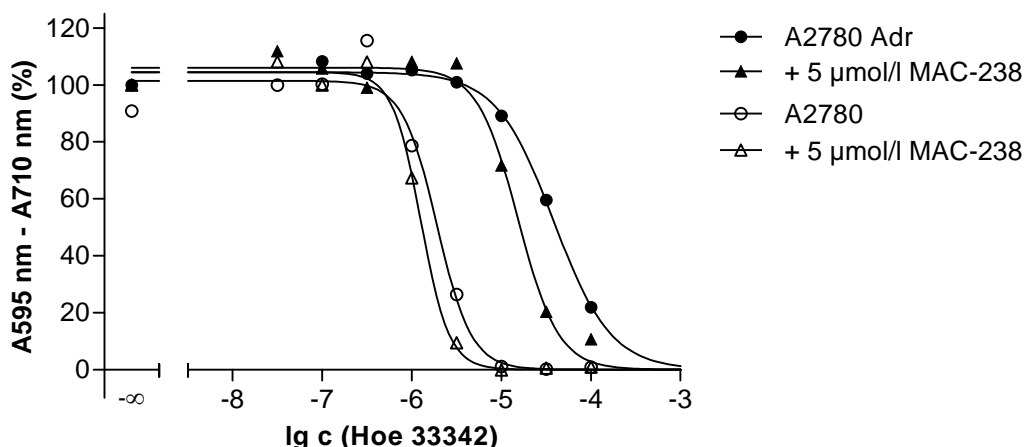


**Abbildung 7.7:** Einfluss kleiner Acridonsäureamide auf den Transport unterschiedlicher ABCB1 Substrate in A2780 Adr Zellen. Die angegebenen Resistenzfaktoren wurden mittels MTT-Assay ermittelt (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ ). Die Konzentration der Testsubstanzen MAC-226 und MAC-238 betrug  $5 \mu\text{mol/l}$ ; als Standard wurde XR9577 ( $3 \mu\text{mol/l}$ ) eingesetzt. Zweiseitiger t-Test, n.s. nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

verursachen.

Erstaunlicherweise scheint MAC-238 jedoch nicht in der Lage zu sein, die Resistenz gegenüber dem DNA interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 zu beeinflussen (siehe Abbildung 7.7). Gemäß dem zuvor beschriebenen Modell sollte der Transport dieses Substrates, welches an die Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1 bindet, eindeutig gehemmt werden. In einigen Experimenten konnte zwar eine geringe Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve des Hoechst 33342 beobachtet werden (siehe Abbildung 7.8), im Mittel ist dieser Unterschied aufgrund der relativ großen Schwankung der  $p\text{GI}_{50}$ -Werte jedoch nicht signifikant. MAC-238 besitzt somit nur einen sehr schwachen Effekt auf den Transport des Hoechst 33342.

Das Morpholinoethylderivat MAC-226 hingegen besitzt keinerlei Effekt auf die ABCB1 vermittelte Resistenz gegenüber allen untersuchten Substraten. So ist im Falle dieser Verbindung zusätzlich kein signifikanter Einfluss auf den Transport von Vinblastin und Colchicin zu beobachten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit der Acridonsäureamide MAC-226 und MAC-238 beide Substanzen auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Transporter interagieren. Unterstützt wird diese These durch die in Kapitel 6.3 erhaltenen Testungsergebnisse: Während MAC-238 den Efflux von Rhodamin 123 und Daunorubicin stimuliert, besitzt MAC-226 lediglich eine aktivierende Wirksamkeit gegenüber Rhodamin 123. Der Transport von Daunorubicin wird durch die Verbindung nicht beeinflusst. Da, wie in Kapitel 5.3.2 dargestellt, auch eine Stimulation des Transports von



**Abbildung 7.8:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven des Hoechst 33342 in An- und Abwesenheit von MAC-238 (5 µmol/l). Die Kurven wurden mittels des MTT-Assays unter Verwendung der Zelllinien A2780 und A2780 Adr generiert.  $pGI_{50}$  (A2780) = 5,72,  $pGI_{50}$  (A2780 Adr) = 4,42,  $pGI_{50}$  (A2780 Adr)<sub>MAC-238</sub> = 4,82,  $pGI_{50}$  (A2780)<sub>MAC-238</sub> = 5,90.

Tetramethylrosamin beobachtet werden kann, ist davon auszugehen, dass MAC-226 eine selektiv aktivierende Wirkung gegenüber Rhodaminderivaten besitzt.

Zusammenfassend zeigt sich unter Berücksichtigung der für verschiedene ausgewählte Modulatoren in unterschiedlichen Testsystemen erhaltenen Ergebnisse (Zusammenfassung siehe Tabelle 7.1), dass im Falle der Aktivatoren häufig große Unterschiede bezüglich der Interaktion mit verschiedenen Substraten vorliegen. Dies trifft nicht nur bei Betrachtung von Substraten grundsätzlich verschiedener postulierter Bindungsstellen zu. So zeigen sich teilweise bereits deutliche Differenzen zwischen den Substraten Rhodamin 123 und Daunorubicin, die sich durch ein sehr ähnliches Bindungsverhalten am Transporter auszeichnen sollen. Der Vergleich der Interaktion von substratabhängig aktivierend wirksamen Modulatoren mit unterschiedlichen Substraten stellt sich damit – vermutlich auch aufgrund der Komplexität der zugrunde liegenden Mechanismen – weitaus weniger einfach dar, als dies für viele Inhibitoren der Fall ist (siehe Kapitel 4.2.4). Für die Untersuchung der Aktivierung von ABCB1 ist somit immer die Betrachtung eines definierten Substrat-Modulator-Paares sinnvoll, da in allen Fällen eine spezifische Interaktion der beiden miteinander vorliegt.

Die hier erhobenen Daten unterstützen die Theorie der Existenz größerer bevorzugter Bindungsregionen insbesondere innerhalb der TMDs anstelle eng umgrenzter definierter Bindungsstellen. Hierauf deutet bereits die enorme Anzahl unterschiedlicher diesbezüglich publizierter Modelle hin (Übersicht siehe Einleitung; unter anderem [52, 62, 64, 66, 70, 71]). Diese Tatsache sowie die Möglichkeit der simultanen Bindung mehrerer Substrate an ABCB1 [235, 266] schließen auch das insbesondere von Loo *et al.* propagierte Vorliegen eines „Induced Fit“ Mechanismus nicht aus [39, 76].

**Tabelle 7.1:** Zusammenfassung der Wirkung ausgewählter Modulatoren auf den ABCB1 vermittelten Transport verschiedener Substrate. Die Angaben bezüglich der Rhodaminderivate und des Daunorubicin beziehen sich auf die in den entsprechenden Akkumulationsassays ermittelten Daten. Der Einfluss auf Colchicin (COL), Vinblastin (VBL) und Hoechst 33342 wurde im MTT-Assay bestimmt (Aktivierung (+), Inhibition (-), schwache inhibitorische Tendenz ((-)), kein Effekt (k.E.), nicht bestimmt (n.b.).

<b>Modulator</b>	<b>Rho 123/TMR</b>	<b>DNR</b>	<b>COL</b>	<b>VBL</b>	<b>Hoe 33342</b>
QB102	+	+	k.E.	-	n.b.
LM-7.1	+	+	-	-	n.b.
LM-8.1	+	+	-	-	n.b.
MAC-238	+	+	-	-	(-)
MAC-226	+	k.E.	k.E.	(-)	k.E.

## 7.2 Einfluss der Aktivatoren auf die ATPase-Aktivität des ABCB1

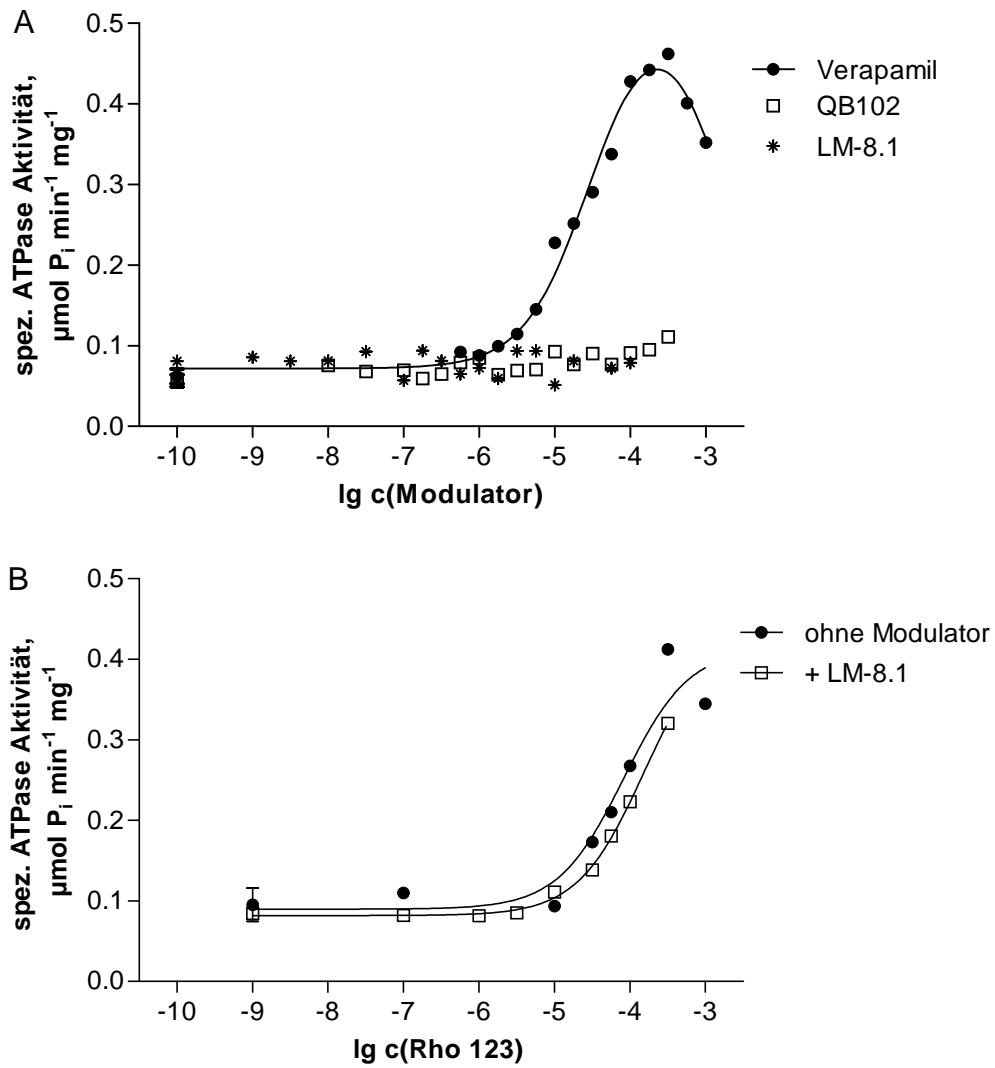
Die in den vorausgehenden Abschnitten (Kapitel 5.3.1 und 7.1) dargestellten Ergebnisse weisen sehr deutlich auf eine kooperative Interaktion verschiedener Bindungsstellen innerhalb der TMDs als mechanistische Grundlage für die Aktivierung von ABCB1 hin. Aufgrund der Kopplung des eigentlichen Transportvorgangs mit der Bindung bzw. Hydrolyse von Mg-ATP an den NBDs [55–57] sind jedoch auch weitere Mechanismen, die unter deren Beteiligung ablaufen, denkbar. Zum einen könnte der ABCB1 vermittelte Transport durch eine gesteigerte Umsetzung von Mg-ATP (Steigerung der ATPase-Aktivität) stimuliert werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit einer erhöhten Affinität von Mg-ATP gegenüber ABCB1 bzw. den NBDs. Die beiden möglichen Mechanismen wurden am Beispiel zweier ausgewählter LM-Derivate mittels ATPase-Assay an aufgereinigtem und in Liposomen rekonstituiertem ABCB1 untersucht.

Der erstgenannte Aspekt wurde von Dr. Anna Jacobs betrachtet und ist in deren Dissertation beschrieben [165, 213]. Die erhaltenen Ergebnisse sollen nachfolgend kurz vorgestellt werden, um eine umfassende Beurteilung dieser Fragestellung zu ermöglichen.

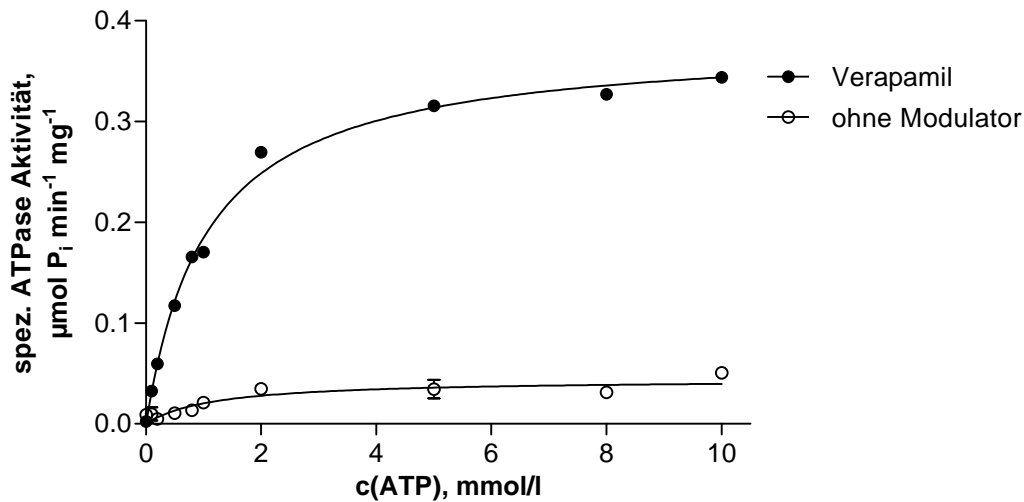
Es konnte gezeigt werden, dass QB102 und LM-8.1 im Gegensatz zu dem als Standard eingesetzten Verapamil keine Stimulation der basalen ATPase-Aktivität von ABCB1 bewirken (siehe Abbildung 7.9, A). Die Substanzen gleichen damit in ihrem Verhalten dem Substrat und Aktivator Hoechst 33342, dem ebenfalls kein oder nur ein sehr geringer Einfluss auf die basale ATPase-Aktivität des Transporters zugesprochen wird [267, 268]. Dieses Ergebnis deutet ähnlich wie die auf zellulärer Ebene beobachteten Effekte auf einen vergleichbaren Wirkmechanismus dieser Substanzen hin.

Des Weiteren wurde untersucht, ob neben der im Rhodamin 123-Akkumulationsassay vorhandenen Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports auch ein Einfluss auf die durch Rhodamin 123 induzierte Stimulation der basalen ATPase-Aktivität des Transporters detektiert werden kann (vgl. Abbildung 7.9, B). Auch hier konnte kein signifikanter Effekt der Aktivatoren festgestellt werden. Somit kann ein verstärkter Mg-ATP-Umsatz als alleiniger Wirkmechanismus für die Aktivierung des ABCB1 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich der zweitgenannte Aspekt – der Einfluss der Aktivatoren auf die Affinität von Mg-ATP gegenüber ABCB1 – untersucht. Da die Kinetik der Hydrolyse von Mg-ATP durch ABCB1 einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgt, geschah dies durch Messung der spezifischen ATPase-Aktivität des Proteins bei verschiedenen ATP-Konzentrationen. Aus der erhaltenen hyperbolen Konzentrations-Aktivitäts-Kurve (vgl. Abbildung 7.10) wurden nach nicht-linearer Regression mittels der



**Abbildung 7.9:** Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedener Substanzen im ATPase-Assay (modifiziert nach [213]). A: Stimulation der basalen ATPase-Aktivität durch Verapamil. Die Aktivatoren QB102 und LM-8.1 besitzen keinen Effekt. B: Einfluss von LM-8.1 auf die durch Rhodamin 123 stimulierte ATPase-Aktivität von ABCB1.  $pEC_{50}(\text{Rho 123}) = 4,09$ ,  $pEC_{50}(\text{Rho 123} + \text{LM-8.1}) = 3,83$ .



**Abbildung 7.10:** Exemplarische Michaelis-Menten-Kinetik der Hydrolyse von Mg-ATP durch ABCB1 in Ab- und Anwesenheit von 130 µmol/l Verapamil.  $K_m = 1,142$  mmol/l bzw. 1,060 mmol/l (mit Verapamil),  $v_{\max} = 0,063$  µmol/(min mg) bzw. 0,380 µmol/(min mg) (mit Verapamil).

Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3.19, S. 68)  $K_m$  und  $v_{\max}$  ermittelt. Die in An- und Abwesenheit der unterschiedlichen Modulatoren bestimmten Werte sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

In Abwesenheit einer Testsubstanz wird ein  $K_m$ -Wert von  $1,078 \pm 0,091$  mmol/l erhalten, der in der Größenordnung der in der Literatur publizierten Werte liegt (siehe dazu Übersicht in [269]). Des Weiteren führt die Standardsubstanz Verapamil (130 µmol/l) erwartungsgemäß zu einer deutlichen Steigerung der basalen ATPase-Aktivität von ABCB1 ( $v_{\max} = 0,391 \pm 0,015$  µmol/(min mg)), während die Affinität von Mg-ATP gegenüber dem Protein unbeeinflusst bleibt ( $K_m = 1,056 \pm 0,004$  mmol/l). Auch diese Beobachtung steht in Einklang mit der Literatur [166, 269, 270], wobei die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen publizierten und gemessenen Daten sich vermutlich auf den Einfluss des verwendeten Expressionssystems sowie der für die Aufreinigung und Rekonstitution von ABCB1 eingesetzten Detergenzien und Lipide zurückführen lassen [271, 272]. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die gute Übereinstimmung der gemessenen Werte mit den von Figler *et al.* publizierten Daten zu unterstreichen [166], da die in dieser Veröffentlichung eingesetzten Methoden bei der heterologen Expression und der Aufreinigung des Proteins weitestgehend vergleichbar mit den hier verwendeten sind.

Im Falle der Aktivatoren QB102 und LM-8.1 wurde dann der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen, die in den zuvor beschriebenen Akkumulationsassays (siehe Kapitel 5.3.1) einen eindeutigen aktivierenden Effekt besitzen, auf die genannten Parameter untersucht. In Analogie zu den in [165] dargestellten Ergebnissen kann auch hier kein signifikanter Einfluss der Aktivatoren auf die maximale ATPase-Aktivität ( $v_{\max}$ ) des ABCB1 festgestellt werden

**Tabelle 7.2:** Bestimmung von  $K_m$  und  $v_{\max}$  von Mg-ATP an humanem ABCB1 in An- und Abwesenheit verschiedener Modulatoren. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Substanz	$c$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$K_m$ [ $\text{mmol/l}$ ]	$v_{\max}$ [ $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$ ]
ohne Modulator		$1,078 \pm 0,091$	$0,052 \pm 0,016$
Verapamil	130	$1,056 \pm 0,004$	$0,391 \pm 0,015$
LM-8.1	0,100	$2,596 \pm 0,047$	$0,086 \pm 0,008$
	0,316	$1,921 \pm 0,007$	$0,069 \pm 0,001$
	3,16	$1,060 \pm 0,091$	$0,062 \pm 0,011$
QB102	1,00	$1,462 \pm 0,151$	$0,083 \pm 0,025$
	3,16	$1,000 \pm 0,365$	$0,050 \pm 0,012$

(siehe Tabelle 7.2).

Dagegen wird der  $K_m$ -Wert durch  $0,1 \mu\text{mol/l}$  LM-8.1 signifikant erhöht, was für eine Verringerung der Affinität des Mg-ATP gegenüber ABCB1 spricht. Bei einer Erhöhung der Aktivator-Konzentration sinkt der  $K_m$ -Wert wieder ab, bis er bei der höchsten verwendeten Konzentration wieder auf dem Niveau der basalen Aktivität liegt (Tabelle 7.2). Im Falle des QB102 wird ein analoger Effekt beobachtet, der jedoch etwas schwächer ausgeprägt ist. Der Einfluss auf die Affinität des Mg-ATP und auf die Transportfunktion des ABCB1 verhalten sich somit eher gegenläufig.

Somit ist die durch die LM-Verbindungen induzierte Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports trotz der engen Kopplung des Transportvorgangs an die Bindung bzw. Hydrolyse von Mg-ATP nicht auf eine alleinige Beeinflussung von dessen Spaltung (Umsetzungsgeschwindigkeit und Affinität) an den NBDs zurückzuführen.

Auch in der Literatur konnte in vielen Studien keine offensichtliche Korrelation von ATPase-Aktivität und Transportfunktion des ABCB1 beobachtet werden. So konnten Wang *et al.* im Falle ABCB1 aktivierend wirksamer Flavonoide keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Transportvorgang und der ATPase-Aktivität feststellen [117]. Eine Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports von Colchicin durch verschiedene hydrophobe Peptide konnte durch Sharom *et al.* an Membranvesikeln aus CHO-Zellen gezeigt werden [118]. Auch in dieser Studie wurde nur ein minimaler Einfluss der aktivierenden Substanzen auf die ATPase-Aktivität detektiert. So konnte im Falle der auf den Transportvorgang am stärksten wirksamen Verbindung nur eine Steigerung der basalen Aktivität um etwa 20-30% erreicht werden. Die durch Verapamil induzierte Stimulation der basalen ATPase-Aktivität wurde hier ebenfalls nicht beeinflusst.

Neben den wenigen Studien, die sich mit Aktivatoren von ABCB1 befassen, wurde auch



der Einfluss diverser Hemmstoffe und Substrate auf die ATPase-Aktivität intensiv untersucht. Auch hier konnte häufig kein eindeutiger Zusammenhang mit den Eigenschaften der Substanzen auf zellulärer Ebene detektiert werden [267].

Die im ATPase-Assay erhaltenen Ergebnisse unterstützen zusätzlich die These, dass die Aktivierung von ABCB1 durch Derivate des QB102 auf einer Interaktion verschiedener Bindungsregionen innerhalb der TMDs basiert. So kann weder ein Einfluss der Substanzen auf die basale noch auf die durch das Substrat Rhodamin 123 stimulierte ATPase-Aktivität beobachtet werden. Des Weiteren verhalten sich die auf zellulärer Ebene gemessene konzentrationsabhängige Aktivität von ABCB1 und der im ATPase-Assay bestimmte  $K_m$ -Wert von Mg-ATP gegenläufig. Somit können sowohl eine gesteigerte Mg-ATP-Umsetzung als auch eine Erhöhung von dessen Affinität gegenüber dem Transporter als Mechanismen der Aktivierung von ABCB1 ausgeschlossen werden.

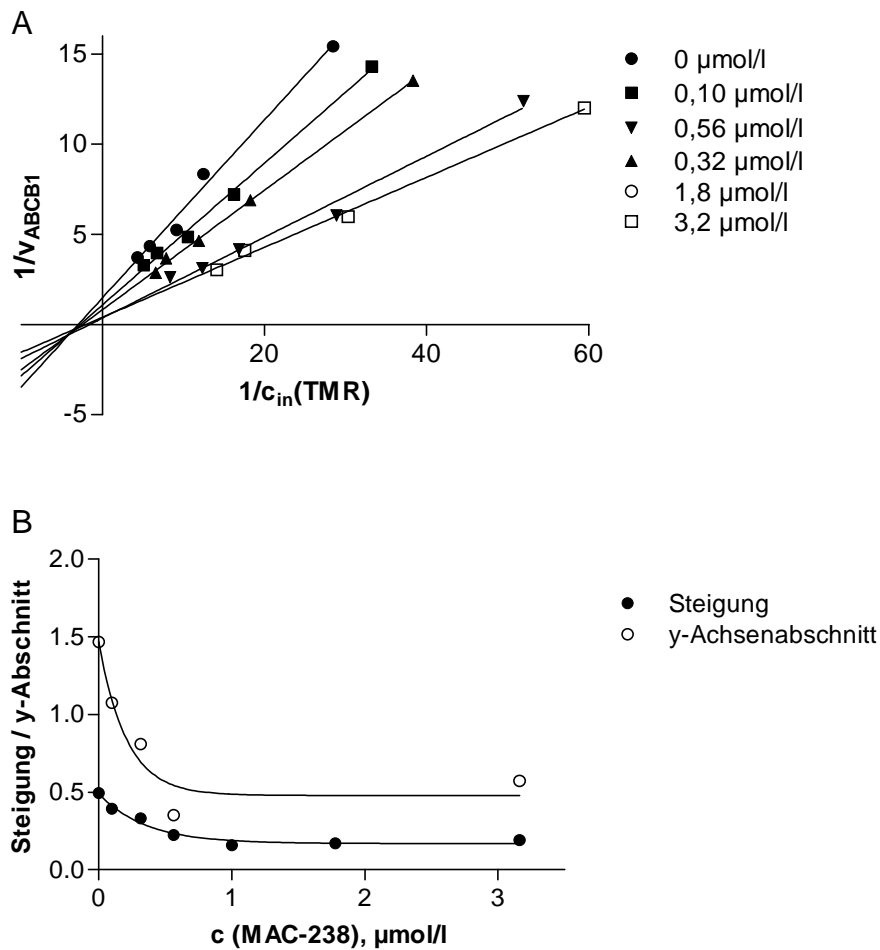
### 7.3 Enzymkinetische Betrachtung von Aktivatoren

Wie bereits gezeigt wurde, kann der ABCB1 vermittelte Transport durch Modelle der Enzymkinetik beschrieben werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Art der Interaktion von Inhibitoren mit bestimmten Substraten zu charakterisieren und so Rückschlüsse auf ihr Bindungsverhalten am Protein zu ziehen. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob auch die Interaktion eines Aktivators mit ABCB1 durch ein derartiges Modell beschrieben werden kann.

In Analogie zu den in Kapitel 6.1.3 beschriebenen Experimenten wurde hierzu die Aktivierung von ABCB1 in A2780 Adr Zellen unter Verwendung verschiedener Tetramethylrosaminkonzentrationen (0,1-0,5  $\mu\text{mol/l}$ ) charakterisiert. Als Aktivatoren wurden neben dem Benzothiazol QB102 auch die Acridonsäureamide MAC-226 und MAC-238 ausgewählt, sodass aus beiden im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Substanzklassen Verbindungen vertreten waren. Des Weiteren unterscheiden sich MAC-226 und MAC-238 hinsichtlich der Substratspezifität ihrer jeweiligen modulierenden Eigenschaften (siehe Kapitel 7.1). Beide Verbindungen wurden in dem beschriebenen enzymkinetischen Ansatz betrachtet, um zu untersuchen, ob sich auch bezüglich ihrer Interaktion mit Tetramethylrosamin Unterschiede feststellen lassen.

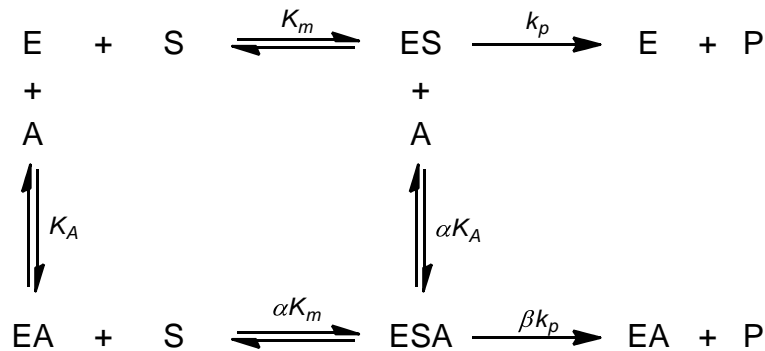
In Abbildung 7.11 A ist das doppelt reziproke Diagramm für die Aktivierung des Transports von Tetramethylrosamin durch MAC-238 dargestellt. Das erhaltene Geradenmuster ist charakteristisch für einen sogenannten nichtessentiellen Aktivator [170]: Es werden Geraden erhalten, die mit steigender Konzentration des Aktivators im Uhrzeigersinn um ihren gemeinsamen Schnittpunkt rotieren, wobei dieser links der Ordinate liegt. Mit steigender Aktivatorkonzentration nähern sich die Geraden dabei einem Grenzwert an, welcher der maximalen Aktivierung bei einer hypothetischen, unendlichen Aktivatorkonzentration entspricht. Dies spiegelt sich auch in den Auftragungen der aus dem doppelt reziproken Diagramm erhaltenen Steigungen und Ordinaten Schnittpunkte gegen die eingesetzte Aktivatorkonzentration wider. Wie in Abbildung 7.11, B erkennbar ist, werden hyperbol fallende Kurven erhalten, welche sich asymptotisch einem definierten Grenzwert annähern. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Stimulation des ABCB1 vermittelten Tetramethylrosamintransports durch MAC-238 anhand des Modells für nichtessentielle Aktivatoren beschrieben werden kann.

Das allgemeine Reaktionsschema für diese Art der Enzymaktivierung ist in Abbildung 7.12 grafisch dargestellt. Ein typischer Aspekt dieses Interaktionstyps ist die Tatsache, dass die enzymatische Reaktion bzw. der Transport von Tetramethylrosamin durch ABCB1 auch in Abwesenheit des Aktivators (A) ablaufen kann. Die Umsetzungsgeschwindigkeit wird jedoch durch diesen erhöht, wobei er sowohl an das freie Enzym (E) als auch an den katalytisch akti-



**Abbildung 7.11:** Bestimmung des Interaktionstyps von MAC-238 mit Tetramethylrosamin. A: Doppelt reziprokes Diagramm mit Schnittpunkt im dritten Quadranten. B: Sekundärdiagramm der Steigungen (gefüllte Kreise) und Ordinaten Schnittpunkte (offene Kreise) der Geraden aus A. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie dreier unabhängiger Versuche.

ven Enzym-Substrat-Komplex (ES) binden kann. Mechanistisch ähnelt die Interaktion eines nichtessentiellen Aktivators mit seiner Zielstruktur somit der nicht-kompetitiven Inhibition, bei welcher der Hemmstoff ebenfalls an das freie Enzym sowie den ES-Komplex binden kann (siehe Kapitel 3.6.4). Der nichtessentielle Aktivator beeinflusst dabei sowohl die Affinität des Substrates gegenüber dem Enzym ( $K_m$ ) als auch die Bildung des Produktes ( $k_p$ ) und kann formal analog einem Inhibitor vom nicht-kompetitiven Mischtyp behandelt werden [170].



**Abbildung 7.12:** Schematische Darstellung der Beeinflussung einer enzymatischen Reaktion durch einen nichtessentiellen Aktivator nach [170] (Erläuterungen siehe Text).

Die nichtessentielle Aktivierung wird durch die folgende Geschwindigkeitsgleichung beschrieben, wobei die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  den unterschiedlichen Einfluss des Aktivators auf die Substratbindung ( $K_m$ ) sowie die Bildung des Produktes ( $k_p$ ) berücksichtigen [170]:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m \cdot \left( \frac{1 + \frac{[A]}{K_A}}{1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}} \right) + [S] \cdot \left( \frac{1 + \frac{[A]}{K_A}}{1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}} \right)} \quad (7.1)$$

Der Aktivator beeinflusst dabei sowohl den apparenten  $K_m$ -Wert als auch die entsprechende Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$ , wobei gemäß den Gleichungen 7.2 und 7.3 die Affinitätskonstante des Aktivators ( $K_A$ ) sowie die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  eingehen. Mit steigender Aktivatorkonzentration nähert sich  $K_{m,\text{app}}$  dabei dem Wert  $\alpha K_m$  sowie  $v_{\max,\text{app}}$  dem Wert  $\beta v_{\max}$  an.

$$v_{\max,\text{app}} = \frac{v_{\max} \cdot \left( 1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A} \right)}{\left( 1 + \frac{[A]}{\alpha K_A} \right)} \quad (7.2)$$

$$K_{m,\text{app.}} = K_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \quad (7.3)$$

Die Tatsache, dass sowohl  $K_m$  als auch  $v_{\text{max}}$  durch den Aktivator beeinflusst werden, äußert sich im doppelt reziproken Diagramm in einem Geradenschnittpunkt, der auf keiner der beiden Achsen liegt. Seine Lage über oder unter der Abszisse wird hierbei gemäß den Gleichungen 7.4 und 7.5 durch die Größe der Konstanten  $\alpha$  und  $\beta$  bzw. deren Verhältnis zueinander bestimmt.

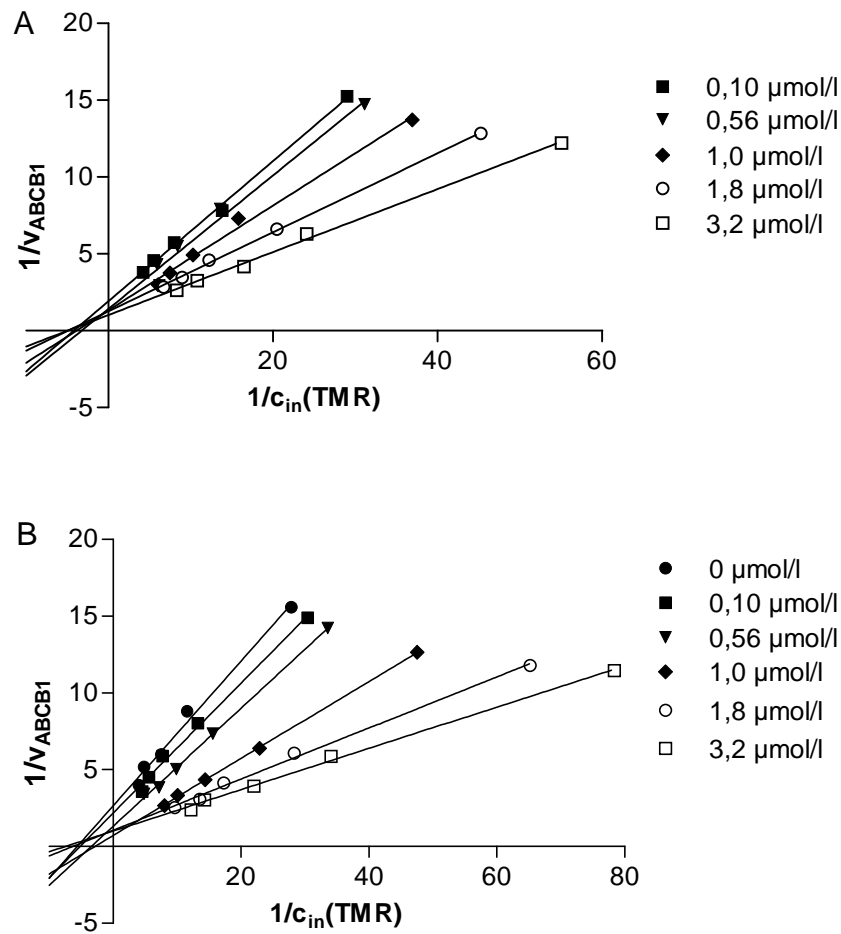
$$\frac{1}{[S]} - \text{Koordinate} : \frac{\beta - 1}{K_m(\alpha - \beta)} \quad (7.4)$$

$$\frac{1}{v} - \text{Koordinate} : \frac{\alpha - 1}{v_{\text{max}}(\alpha - \beta)} \quad (7.5)$$

Ein Schnittpunkt unterhalb der Abszisse, wie er im Falle des MAC-238 beobachtet wird, ist unter der Bedingung dass sowohl  $\alpha < 1$  als auch  $\beta < 1$  sind und gleichzeitig  $\alpha > \beta$  gilt, möglich. Demnach würde MAC-238 die Affinität von Tetramethylrosamin gegenüber ABCB1 erhöhen aber gleichzeitig den eigentlichen Transportvorgang, welcher der Bildung des Produktes entspricht, verlangsamen. Alternativ können  $\alpha$  und  $\beta > 1$  sowie  $\alpha < \beta$  sein. Unter diesen Umständen würde der Aktivator die Affinität des Substrates zwar verringern den Transport jedoch beschleunigen. Diese beiden Möglichkeiten können anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht differenziert werden.

In analoger Art und Weise wurden auch die Aktivatoren MAC-226 und QB102 hinsichtlich ihrer Interaktion mit Tetramethylrosamin untersucht. Die erhaltenen doppelt reziproken Diagramme sind in Abbildung 7.13 dargestellt. Auch für diese beiden Aktivatoren werden Geradenschnittpunkte erhalten, die links der Ordinate liegen, sodass auch deren Interaktion mit Tetramethylrosamin durch das zuvor vorgestellte Modell für nichtessentielle Aktivatoren beschrieben werden kann.

Im Gegensatz zu MAC-238 wird im Falle des MAC-226 jedoch ein Schnittpunkt erhalten, der leicht oberhalb der Abszisse liegt, (siehe Abbildung 7.13, A). Bezogen auf die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  bedeutet dies, dass  $\alpha < 1$  und  $\beta > 1$  gelten muss. MAC-226 würde somit die Affinität von Tetramethylrosamin gegenüber ABCB1 erhöhen, während der eigentliche Transportvorgang verlangsamt abläuft. Insgesamt liegen die Geradenschnittpunkte für die beiden untersuchten Aktivatoren jedoch sehr nahe an der Abszisse.



**Abbildung 7.13:** Doppelt reziproke Diagramme der Interaktionstypbestimmung von MAC-226 (A) und QB102 (B) mit Tetramethylrosamin. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus einer Serie dreier unabhängiger Versuche.

Aufgrund der bei zellbasierten Assays üblichen großen Schwankungen der Messergebnisse unterliegt die Ermittlung des Geradenschnittpunktes jedoch einer relativ großen Ungenauigkeit. Dies wird besonders am Beispiel des für QB102 erhaltenen doppelt reziproken Diagramms (Abbildung 7.13, B) deutlich: Zwar liegt dieser ebenfalls eindeutig links der Ordinate, die Position über bzw. unter der Abszisse kann aus den vorliegenden Daten jedoch nicht zweifelsfrei ermittelt werden.

Vor diesem Hintergrund ist des Weiteren davon auszugehen dass MAC-226 und MAC-238 keine signifikant differierende Wechselwirkung mit dem Transport von Tetramethylrosamin eingehen. Die detektierten Unterschiede spiegeln zwar gewisse Tendenzen wider, sind insgesamt aber nur gering, sodass diese unter Berücksichtigung der bei biologischen Experimenten üblichen Schwankungen nicht eindeutig auf eine unterschiedliche Interaktion beider Verbindungen mit dem Transporter zurückzuführen sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports von Tetramethylrosamin durch Gesetzmäßigkeiten der Enzymkinetik beschrieben werden kann. Ein geeignetes Modell stellt hierbei das des nichtessentiellen Aktivators dar. Die vermutlich variierende Interaktion verschiedener Aktivatoren mit dem Transporter, welche sich in der großen Substratspezifität der modulatorischen Eigenschaften der Verbindungen äußert, wirkt sich jedoch nicht auf den Interaktionstyp der Verbindungen mit Tetramethylrosamin aus. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Stimulation des Tetramethylrosamin-Efflux durch QB102, MAC-226 und MAC-238 mechanistisch ähnlich abläuft.





## 8 Untersuchung von Derivaten des Tetramethylrosamin

Der mit Rhodamin 123 eng verwandte Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrosamin kann, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits beschrieben wurde, für funktionelle Untersuchungen an ABCB1 eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um ein Substrat, welches sich durch eine verglichen mit anderen Rhodaminderivaten sehr hohe Affinität gegenüber dem Transporter auszeichnet [273].

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Michael Detty (University of Buffalo, Buffalo, NY, US) eine Vielzahl von Derivaten dieses Farbstoffes entwickelt, in denen definierte Strukturmerkmale systematisch variiert wurden. Diese Variationen betrafen insbesondere das Heteroatom und den basischen Substituenten des Xanthengrundgerüsts sowie den aromatischen Rest in Position C<sup>9</sup>. Auf diese Art und Weise konnten Substrate erhalten werden, die sich trotz relativ geringer struktureller Unterschiede durch deutlich differierende Eigenschaften hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber ABCB1 und der durch sie verursachten maximalen Stimulation der basalen ATPase-Aktivität auszeichnen. Des Weiteren konnte in einem MDCK-Monolayer basierten Testsystem gezeigt werden, dass die Verbindungen sich auch bezüglich ihrer passiven Diffusion durch die Zellmembran und ihres aktiven ABCB1 vermittelten Transports deutlich unterscheiden [274, 275].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte anhand einer Auswahl dieser Derivate, untersucht werden, wie sich die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften der Substanzen auf die Ergebnisse der biologischen Testung von Inhibitoren und Aktivatoren an ABCB1 auswirken. Zu diesem Zweck wurden die Substrate zunächst hinsichtlich ihrer Eignung für die durchflusszytometrische Untersuchung des Transporters charakterisiert. Anschließend wurden Konzentrations-Effekt-Kurven ausgewählter bekannter Inhibitoren und Aktivatoren von ABCB1 aufgenommen und die unter Verwendung verschiedener Farbstoffe erhaltenen Ergebnisse verglichen. Die verwendeten Tetramethylrosamin-derivate wurden freundlicherweise von Prof. M. Detty zur Verfügung gestellt.

## 8.1 Fluoreszenzeigenschaften und Substratcharakter

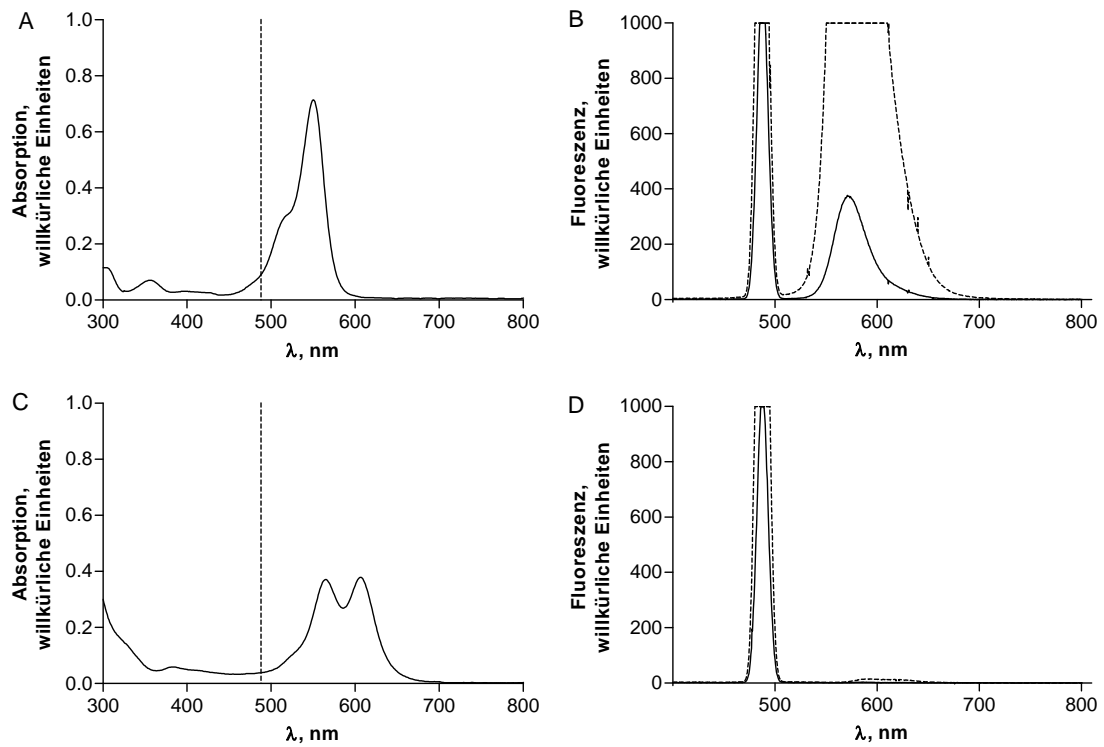
In einem ersten Schritt sollte die prinzipielle Eignung der Tetramethylrosaminderivate für die durchflusszytometrische Untersuchung von ABCB1 nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst die spektralen Eigenschaften sowie der Substratcharakter der Verbindungen charakterisiert. Aufgrund der für viele derartige Substanzen beschriebenen Photoreaktivität und der damit verbundenen Lichtempfindlichkeit wurden dabei sämtliche Arbeitsschritte soweit möglich unter Lichtschutz durchgeführt [276]. Die Strukturen aller zur Verfügung stehenden Farbstoffe sowie deren Absorptions- und Emissionsspektren sind in Anhang D aufgeführt.

In Abbildung 8.1 sind lediglich die exemplarischen Absorptions- und Emissionsspektren von Tetramethylrosamin (A und B) und MKG-149 (C und D) dargestellt. Es wird deutlich, dass das Absorptionsmaximum des Tetramethylrosamin und damit die optimale Exzitationswellenlänge bei etwa 585 nm liegt (A). Die Anregung bei 488 nm (Wellenlänge des Argonlasers) führt dennoch zu einer intensiven Fluoreszenz, die im FL<sub>2</sub> oder FL<sub>3</sub>-Kanal des Durchflusszytometers detektiert werden kann (B).

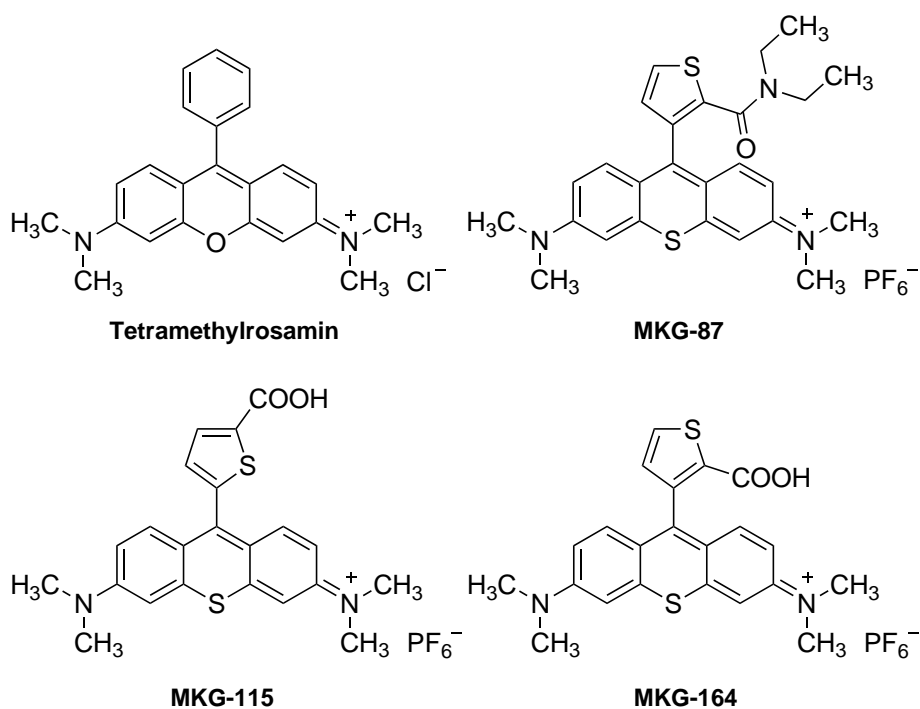
Das Absorptionsspektrum des MKG-149 (Abbildung 8.1, C) ist hingegen so weit bathochrom verschoben, dass die Anregung bei 488 nm hier zu keiner messbaren Fluoreszenz führt (D). Die Verbindung kann somit nicht mittels des zur Verfügung stehenden Durchflusszytometers detektiert werden. Dies trifft auch auf die Derivate MKG-147, MKG-158 und MKG-245 (Strukturen und Spektren siehe Anhang D) zu.

Die aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften für die Durchflusszytometrie geeigneten Verbindungen MKG-87, MKG-115 und MKG-164 (siehe Abbildung 8.2) wurden nachfolgend hinsichtlich ihres Substratcharakters untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, Aufnahmekinetiken der genannten Substanzen sowie des Tetramethylrosamin in ABCB1 überexprimierenden A2780 Adr Zellen sowie der sensitiven Zelllinie A2780 aufgenommen.

In Abbildung 8.3 sind exemplarische Aufnahmekinetiken von MKG-87 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass – ähnlich wie Tetramethylrosamin (siehe Kapitel 4.2, Abbildung 4.19) – auch die strukturell davon abgeleiteten Verbindungen sehr schnell in die Zelle aufgenommen werden. So wird bei MKG-87 bereits nach wenigen Minuten ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom des Farbstoffes erreicht, sodass die Kurve ein Plateau erreicht und kein weiterer Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wird. Die übrigen Verbindung weisen ein analoges Verhalten auf, weshalb die entsprechenden Ergebnisse hier nicht explizit aufgeführt werden.



**Abbildung 8.1:** A und C: Absorptionsspektren von 10  $\mu\text{mol/l}$  Tetramethylrosamin (A) und MKG-149 (C). Die gestrichelte Linie markiert die im Durchflusszytometer verfügbare Anregungswellenlänge von 488 nm. B und D: Emissionsspektren von 0,3 (durchgezogene Linie) und 3  $\mu\text{mol/l}$  (gestrichelte Linie) der Verbindungen nach Anregung bei 488 nm. Alle Substanzen wurden in KHP gelöst.

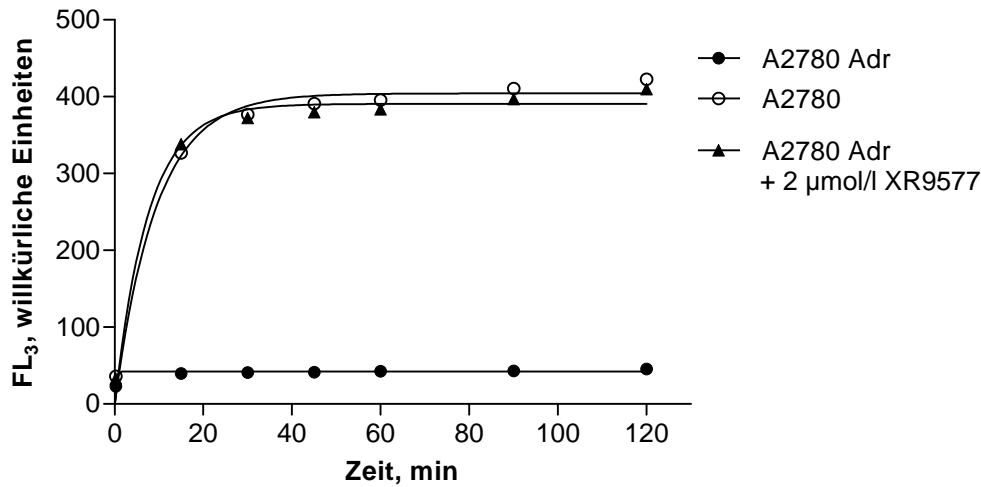


**Abbildung 8.2:** Strukturen der für die durchflusszytometrische Detektion geeigneten Farbstoffe Tetramethylrosamin, MKG-87, MKG-115 und MKG-164.

Erwartungsgemäß stellen die untersuchten Verbindungen Substrate des ABCB1 dar: In der resistenten Zelllinie A2780 Adr wird jeweils eine deutlich geringere intrazelluläre Fluoreszenz gemessen als in den entsprechenden sensitiven Zellen, wobei insbesondere MKG-87 sehr effizient aus der Zelle heraus transportiert wird. Dies äußert sich in einem sehr großen Messfenster, wobei in A2780 Zellen eine neunfach höhere Fluoreszenz als in der ABCB1 exprimierenden Zelllinie detektiert werden kann (siehe Abbildung 8.3). Des Weiteren kann der Efflux der Verbindung durch den Inhibitor XR9577 (2  $\mu\text{mol/l}$ ) vollständig gehemmt werden, sodass die intrazelluläre Fluoreszenz der A2780 Adr Zellen im Steady-State bis auf das Niveau der sensitiven Zelllinie ansteigt. Dies trifft auch auf die übrigen Farbstoffe zu.

Diese Beobachtungen stehen mit denen der Literatur in Einklang: So konnte sowohl für Tetramethylrosamin als auch das Selen-Analogon des MKG-115 in einem MDCK-Monolayer basierten Testsystem der Substratcharakter beider Verbindungen nachgewiesen werden [275]. Für MKG-87 liegen hingegen keine Literaturdaten vor. Ein Selen-analoges von MKG-115 abgeleitetes Diethylamid (26-Se) wurde von Gannon *et al.* jedoch ebenfalls als ein sehr effizient transportiertes Substrat von ABCB1 identifiziert. Vor dem Hintergrund des sehr ähnlichen Verhaltens von MKG-115 und MKG-164 ist auch im Falle der entsprechenden Carbonsäureamide von vergleichbaren Eigenschaften auszugehen.

Somit sind neben Tetramethylrosamin auch die davon abgeleiteten Derivate MKG-87, MKG-

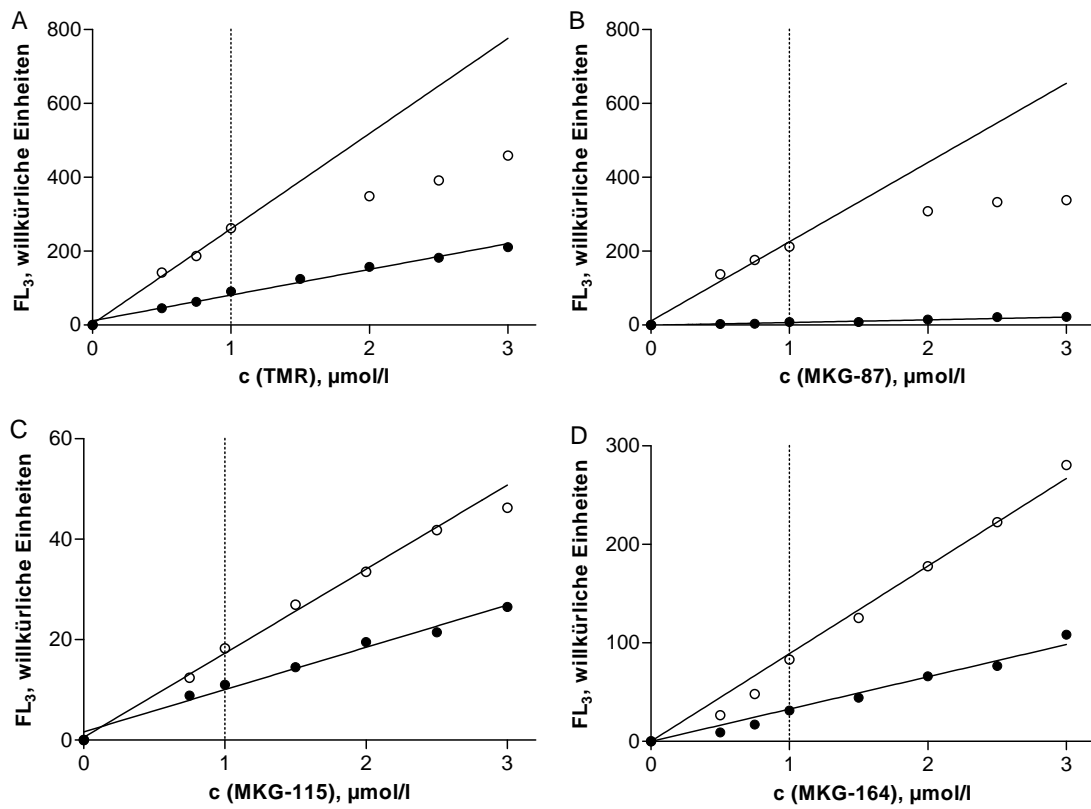


**Abbildung 8.3:** Exemplarische Aufnahmekinetiken von MKG-87 (3 µmol/l) in A2780 und A2780 Adr Zellen in An- und Abwesenheit von 2 µmol/l XR9577.

115 und MKG-164 aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften und ihres Substratcharakters grundsätzlich für durchflusszytometrische Untersuchungen an ABCB1 geeignet. Da anschließend die konzentrationsabhängige Wirkung unterschiedlicher Modulatoren von ABCB1 auf den Transport dieser Substrate charakterisiert werden sollte, wurde die Versuchsdurchführung in Analogie zu den in Kapitel 4.2 beschriebenen Validierungsschritten auf Mikrotiterplatten übertragen.

Um eine für die anschließende Untersuchung von ABCB1 Modulatoren geeignete Konzentration der einzelnen Tetramethylrosaminderivate zu ermitteln, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz der vier Farbstoffe charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde deren intrazelluläre Fluoreszenz in A2780 und A2780 Adr Zellen über einen Konzentrationsbereich von 0-3 µmol/l nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Inkubationsdauer von 60 min wurde basierend auf den zuvor dargestellten Erkenntnissen so gewählt, dass in den Aufnahmekinetiken aller Verbindungen (siehe Abbildung 8.3) zu diesem Zeitpunkt eindeutig ein Steady-State erreicht ist.

Wie Abbildung 8.4 zu entnehmen ist, ist im Falle der Carbonsäurederivate MKG-115 (C) und MKG-164 (D) die Proportionalität von Fluoreszenz und Substratkonzentration in beiden Zelllinien über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich gewährleistet. Da beide Verbindungen, insbesondere jedoch MKG-115, eine eher geringe Fluoreszenzintensität besitzen, wurde hier eine gegenüber den sonst verwendeten Standardbedingungen leicht erhöhte Fluoreszenzverstärkung gewählt. Für MKG-87 (B) hingegen ist ein linearer Verlauf der Konzentrations-Fluoreszenz-Beziehung nur bis zu einer Konzentration von 1 µmol/l gegeben. Im Falle des Tetramethylrosamin kann durch eine – verglichen mit den in Kapitel 4.2 vorgestellten Experimenten – Reduktion der Fluoreszenzverstärkung ebenfalls eine Linearität bis



**Abbildung 8.4:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz von Tetramethylrosamin (A), MKG-87 (B), MKG-115 (C) und MKG-164 (D) in A2780 Adr (gefüllte Kreise) und A2780-Zellen (offene Kreise). Die intrazelluläre Fluoreszenz ( $FL_3$ ) nach Anregung bei 488 nm wurde nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

**Tabelle 8.1:** Versuchsbedingungen für die durchflusszytometrische Charakterisierung von Modulatoren des ABCB1 unter Verwendung verschiedener Tetramethylrosaminderivate.

Farbstoff	$c_{\text{end}}$	t	Kanal	Verstärkung
Tetramethylrosamin	1,0 $\mu\text{mol/l}$	60 min	FL <sub>3</sub>	450 V
MKG-87	1,0 $\mu\text{mol/l}$	60 min	FL <sub>3</sub>	550 V
MKG-115	1,0 $\mu\text{mol/l}$	60 min	FL <sub>3</sub>	650 V
MKG-164	1,0 $\mu\text{mol/l}$	60 min	FL <sub>3</sub>	650 V

zu 1  $\mu\text{mol/l}$  des Substrates erreicht werden.

Somit wurde für die nachfolgend beschriebenen Experimente eine identische Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  aller vier Farbstoffe eingesetzt. Die ausgewählte Substratkonzentration stellt dabei einen Kompromiss zwischen der nur in niedrigeren Konzentrationen gewährleisteten Linearität der Konzentrations-Fluoreszenz-Beziehung von Tetramethylrosamin und MKG-87 und der eher geringen Fluoreszenzintensität von MKG-115 und MKG-164 dar. Die so für die einzelnen Substrate festgelegten Versuchsparameter sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst.

Aus Abbildung 8.4 geht des Weiteren hervor, dass die untersuchten Substrate trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit ein unterschiedliches Verhalten in dem gewählten funktionellen Testsystem aufweisen. Dabei unterscheiden sich die Substanzen insbesondere hinsichtlich der Effektivität, mit der sie durch ABCB1 aus der Zelle heraus transportiert werden. Als Maß hierfür dient die relative Pumpaktivität ( $k'_{\text{ABCB1}}$ ) welche gemäß Gleichung 3.16 berechnet werden kann (siehe Kapitel 3.6.3). Um die Eigenschaften der verschiedenen Tetramethylrosaminderivate miteinander vergleichen zu können, wurde diese für das in Abbildung 8.4 dargestellten Experiment exemplarisch für eine Substratkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  ermittelt.

Das Carbonsäureamid MKG-87 stellt hier mit einer relativen Pumpgeschwindigkeit von 24,2 das am besten transportierte Substrat dar, wohingegen die korrespondierende Carbonsäure MKG-164 ( $k'_{\text{ABCB1}} = 1,65$ ) deutlich weniger effektiv transportiert wird. MKG-115, welches sich strukturell nur sehr geringfügig von MKG-164 unterscheidet, stellt mit einer relativen Pumpgeschwindigkeit von 0,66 das am schlechtesten transportierte Substrat dar, während Tetramethylrosamin ( $k'_{\text{ABCB1}} = 1,88$ ) ein ähnliches Verhalten wie MKG-164 aufweist.

Die hier im funktionellen Testsystem detektierten Unterschiede hinsichtlich des Transports der verschiedenen Derivate spiegeln die von Gannon *et al.* beschriebene differierende Affinität der Farbstoffe gegenüber ABCB1 wider [275]: So wurde für MKG-115 ( $K_m = 140 \mu\text{mol/l}$ ) im ATPase-Assay eine verglichen mit MKG-164 ( $K_m = 111 \mu\text{mol/l}$ ) leicht reduzierte Affinität gegenüber dem Transporter festgestellt, die sich auch in einer geringeren relativen Pumpgeschwindigkeit äußert. Direkte Rückschlüsse von funktionellen Testsystemen, wie sie in der

vorliegenden Arbeit angewendet werden, auf die Affinität gegenüber einem ABC-Transporter sind allerdings insgesamt nur bedingt möglich, da auch weitere Faktoren wie z.B. die passive Diffusion eines Substrates in bzw. durch die Zellmembran sowie dessen intrazelluläre Verteilung einen Einfluss auf das Ausmaß des aktiven Auswärtstransports besitzen [179, 180]. Im Falle von MKG-115 und MKG-164 ist jedoch aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Verbindungen von einer vergleichbaren Membraninteraktion auszugehen, sodass der direkte Vergleich hier möglich ist.

Des Weiteren lassen sich derartige Tendenzen – mit den genannten Einschränkungen - auch für die weiteren untersuchten Substrate erkennen. Für Tetramethylrosamin ( $K_m = 77 \mu\text{mol/l}$ ) wurde in der Literatur eine verglichen mit MKG-164 höhere Affinität gegenüber ABCB1 festgestellt und auch die relative Pumpgeschwindigkeit ist mit einem Wert von 1,88 gegenüber der Carbonsäure leicht erhöht. Für die Verbindung MKG-87 existieren hingegen keine diesbezüglichen Angaben in der Literatur. Für das Selen-Analogon des aus MKG-115 gewonnen Diethylamids (26-Se) konnte jedoch mit einem  $K_m$ -Wert von  $0,68 \mu\text{mol/l}$  eine sehr hohe Affinität gegenüber dem Transporter nachgewiesen werden. Aufgrund der relativ ähnlichen Eigenschaften von sowohl MKG-115 und MKG-164 als auch der Schwefel- und Selenderivate aus [275] kann postuliert werden, dass auch MKG-87 ein hochaffines Substrat von ABCB1 darstellt, was sich auf funktioneller Ebene im sehr effizienten Auswärtstransport äußert ( $k'_{\text{ABCB1}} = 24,2$ ).

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass einige der in der Literatur beschriebenen Tetramethylrosaminderivate auch für die Untersuchung von ABCB1 mittels Durchflusszytometrie geeignet sind, und ein entsprechendes funktionelles Testsystem etabliert werden. Die Substrate unterscheiden sich dabei insbesondere hinsichtlich der Effizienz des aktiven, ABCB1 vermittelten Transports. Diese kann durch Berechnung der relativen Pumpgeschwindigkeit, welche das Verhältnis von aktivem Efflux und passiver Diffusion durch die Zellmembran repräsentiert, quantifiziert werden.



## 8.2 Untersuchung von Modulatoren des ABCB1

In einem zweiten Schritt sollte der Einfluss der zuvor beschriebenen Eigenschaften der Tetramethylrosaminderivate auf die Ergebnisse der funktionellen Testung von Modulatoren des ABCB1 charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Verbindungen, unter denen sich sowohl Inhibitoren als auch Aktivatoren des ABCB1 vermittelten Transports befanden, unter Verwendung der verschiedenen Substrate untersucht.

### Inhibitoren

Zunächst wurden Konzentrations-Effekt-Kurven der inhibitorisch wirksamen Anthranilsäureamide XR9577 und WK-X-81 aufgenommen. Dies geschah in der üblichen Art und Weise durch Auftragung der in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Hemmstoffes ermittelten Fluoreszenzwerte gegen die zugehörige Inhibitorkonzentration. Nach Regression mit der 4-Parameter-logistischen Gleichung wurden aus diesen die jeweiligen halbmaximalen Hemmkonzentrationen berechnet.

In Tabelle 8.2 sind die aus den jeweiligen Konzentrations-Fluoreszenz-Diagrammen ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte ( $pIC_{50} (FL_3)$ ) zusammengefasst: Es fällt auf, dass sich diese bei Verwendung der verschiedenen Tetramethylrosaminderivate signifikant unterscheiden. So ist XR9577 gegenüber Tetramethylrosamin mit einem  $pIC_{50}$ -Wert von 6,31 ( $IC_{50} = 0,49 \mu\text{mol/l}$ ) zweifach wirksamer als gegenüber MKG-87 ( $pIC_{50} = 5,99$ ,  $IC_{50} = 1,0 \mu\text{mol/l}$ ); der unter Verwendung von MKG-164 bestimmte Aktivitätswert des Hemmstoffes liegt zwischen den beiden erstgenannten. Mit MKG-115 hingegen kann aufgrund des sehr kleinen Messfensters kein aussagekräftiger  $pIC_{50}$ -Wert ermittelt werden. Ein analoges Verhalten wird im Falle des WK-X-81 beobachtet. Auch hier unterschieden sich die entsprechenden Aktivitätsdaten deutlich, wobei unter Verwendung von MKG-87 die geringste, bei Tetramethylrosamin hingegen die stärkste Wirksamkeit des Inhibitors erhalten wird (siehe Tabelle 8.2). Die nachfolgenden Ausführungen beziehen sich exemplarisch auf XR9577, können jedoch prinzipiell auch auf WK-X-81 übertragen werden.

Im vorausgehenden Abschnitt wurde bereits darauf eingegangen, dass sich die Tetramethylrosaminderivate bezüglich der Effizienz, mit der sie durch ABCB1 aus der Zelle heraus transportiert werden, unterscheiden. Diese wird in Tabelle 8.2 in Form der relativen Pumpgeschwindigkeit ( $k'_{ABCB1}$ ), welche das Verhältnis von passiver Einwärts-Diffusion und aktivem Efflux eines Substrates beschreibt, quantifiziert. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen weist auch hier MKG-87 die größte relative Pumpgeschwindigkeit auf, während für MKG-164 und Tetramethylrosamin geringere Werte erhalten werden. MKG-115 wird am schlechtesten transportiert. Hierbei unterscheiden sich die bei der Untersuchung der beiden

**Tabelle 8.2:** ABCB1 inhibitorische Wirksamkeit von XR9577 und WK-X-81 gegenüber verschiedenen Tetramethylrosaminderivaten in A2780 Adr Zellen. Die angegebenen  $\text{pIC}_{50}$ -Werte wurden sowohl direkt aus den gemessenen Fluoreszenzwerten ( $\text{FL}_3$ ) als auch nach Berechnung der relativen Pumpgeschwindigkeit ( $k'_{\text{ABCB1}}$ ) ermittelt. Im Falle des MKG-115 konnten keine aussagekräftigen  $\text{pIC}_{50}$ -Werte erhalten werden (n.b.), wobei die Pumpgeschwindigkeit unter Verwendung der in A2780 gemessenen Fluoreszenzwerte berechnet wurde. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

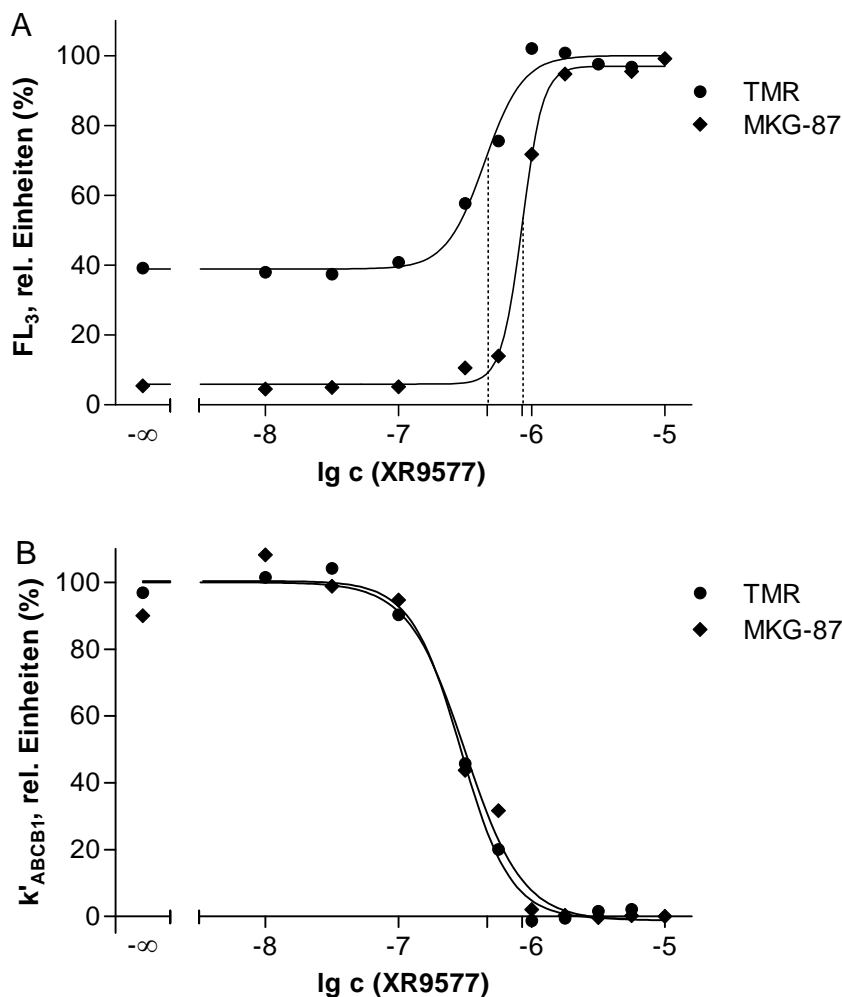
	Farbstoff	$k'_{\text{ABCB1}}$	$\text{pIC}_{50} (\text{FL}_3)$	$\text{pIC}_{50} (k'_{\text{ABCB1}})$
<b>XR9577</b>	TMR	$1,51 \pm 0,08$	$6,31 \pm 0,06$	$6,50 \pm 0,06$
	MKG-87	$15,9 \pm 0,76$	$5,99 \pm 0,07$	$6,48 \pm 0,10$
	MKG-115	$0,75 \pm 0,30$	n.b.	n.b.
	MKG-164	$1,77 \pm 0,12$	$6,14 \pm 0,02$	$6,37 \pm 0,11$
<b>WK-X-81</b>	TMR	$1,76 \pm 0,14$	$6,57 \pm 0,09$	$6,81 \pm 0,09$
	MKG-87	$18,2 \pm 1,43$	$5,91 \pm 0,07$	$6,50 \pm 0,08$
	MKG-115	$1,02 \pm 0,08$	n.b.	n.b.
	MKG-164	$1,40 \pm 0,14$	$6,49 \pm 0,10$	$6,68 \pm 0,07$

Inhibitoren ermittelten  $k'_{\text{ABCB1}}$ -Werte aufgrund der zwischen den Versuchsreihen differierenden Expression des Transporters leicht.

Die genannten Unterschiede werden auch anhand der in Abbildung 8.5 A exemplarisch dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven des XR9577 deutlich: Das Messfenster der unter Verwendung von MKG-87 generierten Kurve ist weitaus größer, als jenes im Falle des Tetramethylrosamin und auch die Differenz der erhaltenen  $\text{pIC}_{50}$ -Werte ist hier gut erkennbar. Der effizientere Transport des MKG-87 hat somit eine Verringerung der apparenten inhibitorischen Wirksamkeit von XR9577 zur Folge. Basierend auf dieser Abhängigkeit kann postuliert werden, dass der anhand der Konzentrations-Fluoreszenz-Kurve ermittelte  $\text{pIC}_{50}$ -Wert in der Regel nicht der tatsächlichen halbmaximalen Hemmkonzentration des Inhibitors gegenüber dem Transporter entspricht.

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurden die Fluoreszenzwerte, anhand derer die bislang diskutierte Konzentrations-Effekt-Kurven generiert wurden, unter Verwendung von Gleichung 3.16 (Seite 67) in relative Pumpgeschwindigkeiten umgerechnet. Deren Auftragung gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration ergibt erneut eine typische – jedoch fallende – sigmoide Kurve, wie sie in Abbildung 8.5 B dargestellt ist.

In diesem repräsentativen Beispiel kann beobachtet werden, dass die aus der relativen Pumpgeschwindigkeit erstellten Konzentrations-Effekt-Kurven des XR9577 nahezu identisch verlaufen und damit auch identische  $\text{pIC}_{50}$ -Werte erhalten werden. Dies trifft auch auf die übrigen durchgeführten Experimente zu, sodass sich die unter Verwendung der verschiedenen Substrate ermittelten Aktivitätswerte bei dieser Art der Auswertung insgesamt nicht



**Abbildung 8.5:** Konzentrations-Effekt-Kurven von XR9577, die unter Verwendung der Substrate Tetramethylrosamin und MKG-87 generiert wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Versuchen. A: Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten erstellte Kurven. Die  $pIC_{50}$ -Werte (gestrichelte Linien) betragen 6,36 (Tetramethylrosamin) und 6,07 (MKG-87). B: Konzentrations-Effekt-Kurven nach Transformation der Fluoreszenzwerte in die relative Pumpgeschwindigkeit von ABCB1. Die Fluoreszenz- und  $k'_{ABCB1}$ -Werte wurden jeweils auf 100 % normiert. Die  $pIC_{50}$ -Werte betragen 6,53 (Tetramethylrosamin) bzw. 6,50 (MKG-87).

signifikant unterscheiden (siehe Tabelle 8.2,  $\text{pIC}_{50}(k'_{\text{ABCB1}})$ ). Da diese  $\text{pIC}_{50}$ -Werte direkt aus der relativen Pumpgeschwindigkeit des ABCB1 berechnet wurden, kann des Weiteren davon ausgegangen werden, dass diese die tatsächlichen halbmaximalen Hemmkonzentrationen gegenüber dem Transporter repräsentieren. Vergleicht man die mit den unterschiedlichen Auswertungsverfahren bestimmten  $\text{pIC}_{50}$ -Werte, so wird deutlich, dass die „wahren“ Aktivitätsdaten etwa in der Größenordnung der auf Basis der Fluoreszenz ermittelten Daten für Tetramethylrosamin liegen. Somit scheint insbesondere das sehr große Messfenster des MKG-87 zu einer deutlichen Unterschätzung der inhibitorischen Wirksamkeit des XR9577 zu führen.

Diese Beobachtungen lassen sich auf Basis der in Kapitel 3.6.3 vorgestellten Betrachtungen zur Pumpgeschwindigkeit von ABC-Transportern erklären. Im Steady-State herrscht ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom des Substrats (Gleichung 8.1a). Der Einstrom ( $v_{\text{in}}$ ) in die Zelle erfolgt dabei ausschließlich durch passive Diffusion. Der Ausstrom ( $v_{\text{out}}$ ) kann hingegen durch passive Diffusion und den aktiven Transport durch ABCB1 erfolgen (Gleichung 8.1b). Die Parameter  $c_{\text{in}}$  und  $c_{\text{out}}$  bezeichnen dabei die intra- bzw. extrazelluläre Konzentration des Substrats,  $k_{\text{diff}}$  und  $k_{\text{ABCB1}}$  die Geschwindigkeitskonstanten der Diffusion und des ABCB1 vermittelten Transports.

$$v_{\text{in}} = v_{\text{out}} \quad (8.1a)$$

$$c_{\text{out}} \cdot k_{\text{diff}} = c_{\text{in}} \cdot (k_{\text{diff}} + k_{\text{ABCB1}}) \quad (8.1b)$$

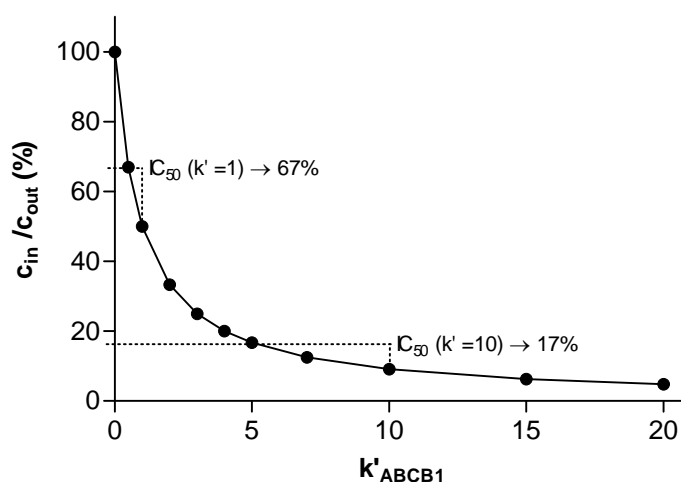
Durch Umformung wird Gleichung 8.2 erhalten:

$$\frac{k_{\text{diff}}}{k_{\text{diff}} + k_{\text{ABCB1}}} = \frac{c_{\text{in}}}{c_{\text{out}}} \quad (8.2)$$

Gemäß Gleichung 3.16 (Seite 67) ist die relative Pumpgeschwindigkeit des ABCB1 ( $k'_{\text{ABCB1}}$ ) definiert als der Quotient von aktivem, ABCB1 vermitteltem Transport und passiver Diffusion. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhanges gilt für das Verhältnis von extra- und intrazellulärer Substratkonzentration:

$$\frac{c_{\text{in}}}{c_{\text{out}}} = \frac{1}{1 + k'_{\text{ABCB1}}} \quad (8.3)$$

Da unter den gewählten Versuchsbedingungen die Proportionalität von Substratkonzentration und zellulärer Fluoreszenz gewährleistet ist, kann  $c_{\text{in}}$  mit der gemessenen Fluoreszenz in



**Abbildung 8.6:** Grafische Darstellung der durch Gleichung 8.3 beschriebenen hyperbolen Kurve. Beispielhaft angegeben sind die bei 50 %iger Hemmung von ABCB1 erhaltenen relativen Fluoreszenzwerte für  $k'_{ABCB1} = 1$  und  $k'_{ABCB1} = 10$ .

Abwesenheit eines Modulators (Bottomwert) gleichgesetzt werden. Die zelluläre Fluoreszenz bei vollständig gehemmtem ABCB1 entspricht somit  $c_{out}$  (Topwert).

Gleichung 8.3 beschreibt eine hyperbole Kurve (siehe Abbildung 8.6), anhand derer die festgestellten Differenzen zwischen dem aus dem Konzentrations-Fluoreszenz-Diagramm ermittelten und dem „wahren“  $pIC_{50}$ -Wert eines Inhibitors deutlich werden: Für den Fall, dass  $k'_{ABCB1} = 1$  gilt, wird ein  $c_{in}/c_{out}$  Verhältnis von 50 % erhalten; dies entspricht einem Messfenster von einem Faktor 2. Bei einer 50 %igen Hemmung des Transporters ( $k'_{ABCB1} = 0,5$ ) beträgt dieses Verhältnis 67 %, das heißt, die bei halbmaximaler Inhibition gemessene zelluläre Fluoreszenz beträgt 67 % des bei vollständiger Hemmung ermittelten Topwertes. Die bei einer 50 %igen Fluoreszenzabnahme, welche bei einem  $c_{in}/c_{out}$  Verhältnis von 75 % liegt, aus der Konzentrations-Fluoreszenz-Kurve abgelesene InhibitorKonzentration entspricht demnach nicht dem „wahren“  $IC_{50}$ -Wert des Hemmstoffs; es kommt zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Wirksamkeit der Substanz.

Noch stärker fällt dies bei einer sehr hohen Aktivität des Transporters ins Gewicht. In Abbildung 8.6 ist dies exemplarisch für  $k'_{ABCB1} = 10$  dargestellt: Aufgrund der hohen relativen Pumpgeschwindigkeit des ABCB1 wird hier ein sehr großes Messfenster (Faktor 11) beobachtet. Bei einer 50 %igen Hemmung des Transporters ( $k'_{ABCB1} = 5$ ) beträgt die zelluläre Fluoreszenz nur etwa 17 % des Topwertes. Der am Wendepunkt der auf den gemessenen Fluoreszenzwerten basierenden sigmoiden Konzentrations-Effekt-Kurve abgelesene  $IC_{50}$ -Wert stimmt somit auch in diesem Fall nicht mit dem wahren Wert überein, wobei die Differenz zwischen den beiden Werten noch größer ist, als bei niedriger Pumpgeschwindigkeit.

Die beschriebenen Effekte spiegeln sich in den unter Verwendung der unterschiedlichen Tetra-

methylosaminderivate erhaltenen Aktivitätsdaten des XR9577 wider: Für alle drei Substrate werden aus den Konzentrations-Fluoreszenz-Kurven  $pIC_{50}$ -Werte erhalten, die unter dem aus der relativen Pumpgeschwindigkeit berechneten „wahren“ Wert liegen. Dabei werden insbesondere für MKG-87, welches mit einer durchschnittlichen relativen Pumpgeschwindigkeit von etwa 15-20 ein extrem großes Messfenster aufweist, deutlich schlechtere Aktivitätswerte erhalten. Unter Verwendung von Tetramethylrosamin und MKG-164, welche in dem gewählten Testsystem ein Messfenster von etwa einem Faktor 2-3 besitzen, werden hingegen Werte erhalten, die den aus der relativen Pumpgeschwindigkeit berechneten „wahren“ Werten sehr nahe kommen. Dies kann in analoger Art und Weise auch im Falle des WK-X-81 beobachtet werden.

### Aktivatoren

In Analogie zu den zuvor beschriebenen Inhibitoren wurden auch einige gegenüber ABCB1 aktivierend wirksame Verbindungen untersucht. Hierzu wurden neben QB102 auch die beiden Benzimidazole LM-8.1 und LM-8.4 eingesetzt. Die unter Verwendung der unterschiedlichen Substrate erhaltenen Aktivitätsdaten sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst.

Erwartungsgemäß sind alle drei Aktivatoren in der Lage, den ABCB1 vermittelten Transport der Tetramethylrosaminderivate zu stimulieren. Eine diesbezügliche Ausnahme unter den Substraten stellt MKG-87 dar, dessen Efflux durch keinen der Aktivatoren gefördert wird. Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Verbindung durch ABCB1 bereits sehr effizient transportiert wird, weshalb intrazellulär nur eine geringe Menge des Farbstoffs vorhanden ist. Eine zusätzliche Stimulation des Transports durch den Aktivator führt dabei zu keiner weiteren signifikanten Abnahme der intrazellulären Substratkonzentration. Des Weiteren kann hier auch ein verstärkter Efflux des relativ schlecht transportierten MKG-115 durch die Aktivatoren beobachtet werden. Für die Inhibitoren konnte unter Verwendung dieses Substrats aufgrund des kleinen Messfensters kein aussagekräftiger  $pIC_{50}$ -Wert erhalten werden.

Betrachtet man die für die Aktivatoren unter Verwendung der verschiedenen Substrate erhaltenen  $pEC_{50}$ -Werte der Konzentrations-Fluoreszenz-Kurven, so fällt auf, dass diese im Gegensatz zu den Inhibitoren weniger deutlich differieren. Lediglich der mit MKG-115 bestimmte Wert weicht bei allen drei Aktivatoren leicht von den übrigen Werten ab. Diese Unterschiede sind jedoch in den meisten Fällen nicht signifikant.

Wie zuvor für Inhibitoren beschrieben, wurden auch hier die gemessenen Fluoreszenzwerte in relative Pumpgeschwindigkeiten ( $k'_{ABCB1}$ ) umgerechnet und daraus Konzentrations-Effekt-Kurven generiert. Die aus diesen bestimmten  $pEC_{50}$ -Werte sind ebenfalls in Tabelle 8.3

**Tabelle 8.3:** ABCB1 aktivierende Wirkung von QB102, LM-8.1 und LM-8.4 gegenüber verschiedenen Tetramethylrosaminderivaten in A2780 Adr Zellen. Die angegebenen  $\text{pEC}_{50}$ -Werte wurden sowohl direkt aus den gemessenen Fluoreszenzwerten ( $\text{FL}_3$ ) als auch nach Berechnung der relativen Pumpgeschwindigkeit ( $k'_{\text{ABCB1}}$ ) ermittelt. Im Falle des MKG-87 kann keine Aktivierung beobachtet werden (n.b.). Die Pumpgeschwindigkeit wurde unter Verwendung der bei vollständiger Hemmung ( $5 \mu\text{mol/l}$  XR9577) gemessenen Fluoreszenzwerte berechnet. Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

	Farbstoff	$k'_{\text{ABCB1}}$	$\text{pEC}_{50}$ ( $\text{FL}_3$ )	$\text{pEC}_{50}$ ( $k'_{\text{ABCB1}}$ )
<b>QB102</b>	TMR	$1,52 \pm 0,27$	$6,18 \pm 0,04$	$6,06 \pm 0,07$
	MKG-87	$22,9 \pm 1,69$	n.b.	n.b.
	MKG-115	$0,66 \pm 0,15$	$6,03 \pm 0,02$	$5,95 \pm 0,04$
	MKG-164	$1,80 \pm 0,23$	$6,18 \pm 0,03$	$6,09 \pm 0,02$
<b>LM-8.1</b>	TMR	$1,52 \pm 0,27$	$6,32 \pm 0,20$	$6,06 \pm 0,14$
	MKG-87	$22,9 \pm 1,69$	n.b.	n.b.
	MKG-115	$0,66 \pm 0,15$	$6,17 \pm 0,12$	$6,12 \pm 0,22$
	MKG-164	$1,80 \pm 0,23$	$6,31 \pm 0,30$	$6,14 \pm 0,28$
<b>LM-8.4</b>	TMR	$1,52 \pm 0,27$	$6,08 \pm 0,18$	$5,90 \pm 0,16$
	MKG-87	$22,9 \pm 1,69$	n.b.	n.b.
	MKG-115	$0,66 \pm 0,15$	$6,14 \pm 0,10$	$6,01 \pm 0,20$
	MKG-164	$1,80 \pm 0,23$	$6,09 \pm 0,25$	$5,92 \pm 0,19$

aufgeführt. Auch hier unterscheiden sich die unter Verwendung der verschiedenen Substrate ermittelten „wahren“  $\text{pEC}_{50}$ -Werte nicht. Verglichen mit den aus den Konzentrations-Fluoreszenz-Kurven ermittelten Werten sind diese zwar insgesamt etwas niedriger, die Differenzen sind jedoch kleiner als im Falle der Inhibitoren.

Unter Berücksichtigung des durch Gleichung 8.3 beschriebenen Zusammenhangs lässt sich auch diese Beobachtung erklären, wobei sich die nachfolgenden Betrachtungen auf eine maximal zweifache Stimulation des Transports beziehen. Für eine Ausgangsgeschwindigkeit von  $k'_{\text{ABCB1}} = 3$  beträgt das  $c_{\text{in}}/c_{\text{out}}$  Verhältnis bei halbmaximaler Aktivierung ( $k'_{\text{ABCB1}} = 4,5$ ) 18,2%. Der anhand der Konzentrations-Fluoreszenz-Kurve ermittelte Wert läge hingegen bei etwa 18,75%, sodass es hier zu einer leichten Überschätzung der tatsächlichen Wirksamkeit des Aktivators kommt. Die Abweichung des direkt aus den gemessenen Fluoreszenzwerten bestimmten vom wahren  $\text{pEC}_{50}$ -Wert ist jedoch nur gering.

Dies wird auch im Falle der unterschiedlichen Tetramethylrosaminderivate beobachtet: Die aus dem Konzentrations-Fluoreszenz-Diagramm bestimmten  $\text{pEC}_{50}$ -Werte liegen leicht über den „wahren“ Werten, wobei die Differenz zwischen beiden häufig nicht signifikant ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die in einem funktionellen Testsystem aus der Konzentrations-Fluoreszenz-Kurve ermittelten Aktivitätsdaten von Modulatoren des ABCB1

stark vom eingesetzten Substrat abhängig sind. Diese Unterschiede zwischen den unter Verwendung verschiedener Substrate erhaltenen Werten sind jedoch nicht in allen Fällen auf eine mögliche Substratspezifität der Wirkung zurückzuführen. Der  $pEC_{50}$ -Wert ist dabei insbesondere von der Effizienz, mit der das Substrat transportiert wird, und somit vom jeweiligen Messfenster abhängig. Des Weiteren entspricht der aus der Konzentrations-Fluoreszenz-Kurve bestimmte Aktivitätswert in der Regel nicht dem tatsächlichen  $pEC_{50}$ -Wert. Dieser kann nach Umrechnung der Fluoreszenzwerte in die relative Pumpgeschwindigkeit ermittelt werden.

Die beschriebenen Effekte wirken sich vor allem bei der Untersuchung von inhibitorisch wirksamen Verbindungen aus, wobei insbesondere bei einem sehr großen Messfenster große Abweichungen beobachtet werden. Im Falle von Aktivatoren sind diese eher von theoretischer Bedeutung.

Für den direkten Vergleich von absoluten Aktivitätswerten, die unter Verwendung verschiedener Substrate mit stark unterschiedlichen Messfenstern ermittelt wurden, sollten somit bevorzugt solche Aktivitätsdaten eingesetzt werden, die direkt aus der relativen Pumpgeschwindigkeit berechnet wurden. Analoge Effekte sind des Weiteren bei einer stark variierenden Expression des Transporters in der eingesetzten Zelllinie zu erwarten. Eine möglichst stabile Proteinexpression ist somit eine Grundvoraussetzung für den Erhalt reproduzierbarer Aktivitätsdaten.



## 9 Zusammenfassung

Die humanen ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 besitzen aufgrund ihrer ubiquitären Expression und ihrer Polyspezifität eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Dabei beeinflusst vor allem das in Geweben mit einer Barrierefunktion vorhandene ABCB1, auf welchem der hauptsächliche Fokus der vorliegenden Arbeit lag, die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination (ADME) einer Vielzahl von Arzneistoffen. Daneben ist der Transporter an der Entwicklung der sogenannten klassischen MDR von Tumoren gegenüber strukturell und mechanistisch differierenden Zytostatika beteiligt. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnte in der Vergangenheit eine Vielzahl von Fragestellungen, insbesondere hinsichtlich der Polyspezifität sowie möglicher Bindungsstellen des ABCB1 noch nicht abschließend geklärt werden.

Eine mögliche Vorgehensweise zur Charakterisierung der Bindungsstellen des Transporters ist die funktionelle Untersuchung der Interaktion von Modulatoren mit verschiedenen Substraten. Einen interessanten Ansatzpunkt für derartige Studien stellen dabei die Substanzen QB11 und QB102 dar, welche den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 und Anthrazyklinen stimulieren, während der Efflux anderer Substrate gehemmt wird. Insbesondere die aktivierenden Eigenschaften dieser Substanzen wurden jedoch bislang nicht näher charakterisiert. Die Untersuchung der Aktivierung von ABCB1, insbesondere durch Derivate der genannten Verbindungen, stellte daher ein zentrales Motiv der vorliegenden Arbeit dar.

Um die Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports von Rhodamin 123 messen zu können, wurde mit dem Rhodamin 123-Akkumulationsassay zunächst ein durchflusszytometrisches funktionelles Testsystem etabliert. Dessen Eignung für die Untersuchung der Aktivierung von ABCB1 wurde dann anhand einer Reihe von Verbindungen, für die in der Literatur eine entsprechende Wirkung beschrieben ist, nachgewiesen. Neben dem Rhodamin 123-Akkumulationsassay wurde außerdem ein analoges Testsystem für das ebenfalls an die sogenannte Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 bindende Tetramethylrosamin entwickelt.

Unter Verwendung der neu etablierten funktionellen Methoden sowie des bereits bestehenden Daunorubicin-Akkumulationsassays wurde nachfolgend eine im Arbeitskreis synthetisierte

Serie von *9H*-Imidazobenzimidazolen und 2-Aryl-*1H*-benzimidazolen, welche sich strukturell von QB11 ableiten, hinsichtlich ihrer ABCB1 aktivierenden Eigenschaften untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der Derivate in der Lage ist, den ABCB1 vermittelten Transport von Rhodamin 123 und Daunorubicin zu stimulieren. Gewisse strukturelle Modifikationen, darunter insbesondere die Anwesenheit voluminöser Substituenten in Position N<sup>9</sup> der *9H*-Imidazobenzimidazole führen jedoch zum Verlust der aktivierenden Wirkung; diese Verbindungen besitzen häufig eine schwache inhibitorische Aktivität. Einen interessanten Aspekt dieser Beobachtungen stellte dabei die Tatsache dar, dass trotz der in der Literatur postulierten gemeinsamen Bindungsstelle der Substrate einige der Verbindungen zwar keine aktivierende Wirksamkeit gegenüber Daunorubicin besitzen, den Transport von Rhodamin 123 jedoch weiterhin stimulierten. Dies verdeutlicht, dass die Aktivatoren mit beiden Substraten nicht in exakt der gleichen Art und Weise interagieren. Basierend auf den erhaltenen Testungsdaten wurde anschließend ein Pharmakophormodell erstellt. So konnten insbesondere eine vollständig planare Grundstruktur sowie die Anwesenheit eines definierten Wasserstoffbrückenakzeptors als essentielle Strukturmerkmale für die Aktivierung von ABCB1 identifiziert werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Acridonsäureamiden, die sich strukturell vom hochpotenten ABCB1 und ABCG2 Inhibitor GF120918 (Elacridar) ableiten. Diese Verbindungen wurden zunächst unter Verwendung des Rhodamin 123- und des Hoechst 33342-Akkumulationsassays hinsichtlich ihrer Wirksamkeit an ABCB1 untersucht. Hier zeigte sich eine starke Substratabhängigkeit der inhibitorischen Wirksamkeit der Substanzen: Während durch vergleichsweise kleine strukturelle Modifikationen bei einigen Verbindungen ein drastischer Aktivitätsverlust gegenüber Rhodamin 123 erzielt wird, besitzen praktisch alle Derivate eine gute Wirksamkeit gegenüber Hoechst 33342. Die Hemmung des ABCB1 vermittelten Transports durch die Substanzen wird dabei stark durch das Muster der Wasserstoffbrückenakzeptorfunktionen der Strukturen beeinflusst. Die in den fluoreszenzbasierten Testsystemen festgestellte Substratspezifität der ABCB1 inhibitorischen Wirksamkeit wurde dann zusätzlich unter Verwendung weiterer Substrate untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Toxizität unterschiedlicher Zytostatika in ABCB1 überexprimierenden Zellen in An- und Abwesenheit der Inhibitoren mittels MTT-Assay untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die exemplarisch ausgewählte Verbindung MAC-192 den Transport von Colchicin und Vinblastin hemmt, während der Efflux von Doxorubicin nicht beeinflusst wird. Die Ausgangssubstanz GF120918 hingegen ist in der Lage, den Transport aller untersuchten Substrate zu inhibieren. MAC-192 hemmt somit nur den Transport solcher Substrate, die eine Affinität zur Hoechst-Bindungsstelle des ABCB1 besitzen. Diese Substratabhängigkeit kann jedoch nicht auf eine Präferenz der Acridonsäureamide zu einer der beiden postulierten Bindungsstellen zurückgeführt werden: In einem enzymkinetischen

---

Ansatz wurde nachgewiesen, dass Derivate des GF120918 weder Affinität zur Hoechst- noch zur Rhodamin-Bindungsstelle besitzen sondern an einer dritten Bindungsstelle des Proteins angreifen.

Da GF120918 auch inhibitorische Wirksamkeit gegenüber ABCG2 besitzt, wurden die zuvor beschriebenen Substanzen zusätzlich hinsichtlich ihrer Aktivität an diesem Transporter untersucht. Dies geschah unter Verwendung der Substrate Pheophorbid A und Hoechst 33342. Im Gegensatz zu den an ABCB1 erhaltenen Daten weisen hier alle Verbindungen eine ähnliche Wirksamkeit auf. Des Weiteren können keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden untersuchten Substraten festgestellt werden. Dies trifft auch auf eine Serie weiterer Acridonsäureamide zu, die im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Derivaten nicht mehr über die Tetrahydroisochinolinpartialstruktur des GF120918 verfügen. Diese sogenannten „kleinen“ Acridonsäureamide weisen ebenfalls gegenüber beiden Substraten eine vergleichbare Wirksamkeit wie GF120918 auf. Durch die Untersuchung des Bindungsverhaltens des GF120918 und des „kleinen“ Acridonsäureamids MAC-238 konnte weiterhin gezeigt werden, dass beide Verbindungen den Transport von Pheophorbid A kompetitiv hemmen. Da sich die verschiedenen Modulatoren somit weder hinsichtlich ihrer Wirksamkeit noch bezüglich ihrer Bindungsstelle am Protein unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass die Tetrahydroisochinolinpartialstruktur nicht unmittelbar an der Bindung der Inhibitoren an ABCG2 beteiligt ist.

Im Gegensatz dazu erwies sich der Tetrahydroisochinolinrest als essentiell für die inhibitorische Wirksamkeit gegenüber ABCB1: Die „kleinen“ Acridonsäureamide zeigen gegenüber ABCB1 eine bislang noch nicht beschriebene aktivierende Wirksamkeit im Rhodamin 123- und Daunorubicin-Akkumulationsassay, was auf eine von den direkten Abkömmlingen des GF120918 verschiedene Interaktion mit dem Protein hindeutet. Die „kleinen“ Acridonsäureamide konnten somit aber als neuartige Klasse von Aktivatoren des ABCB1 identifiziert werden.

Neben der biologischen Testung verschiedener neuartiger Modulatoren von ABC-Transportern stellte auch die mechanistische Betrachtung der ABCB1 aktivierenden Wirkung bestimmter Substanzen einen wesentlichen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar. Diese wurde unter Verwendung ausgewählter Benzimidazole und Acridonsäureamide untersucht. Mittels ATPase-Assay konnte so z.B. nachgewiesen werden, dass die Stimulation des ABCB1 vermittelten Transports weder auf eine gesteigerte ATP-Hydrolyse noch auf eine Erhöhung der Affinität des Nukleotids gegenüber dem Transporter zurückzuführen ist. Auch eine Steigerung der Expression von ABCB1, die zu einem verstärkten Efflux von Substraten führen würde, konnte als mechanistische Grundlage der Aktivierung ausgeschlossen werden. Hierbei wurden sowohl kurzfristige (bis 72 h) als auch Langzeiteffekte (bis 28 d) untersucht. Somit kann

die Stimulations des ABCB1 vermittelten Transports mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Interaktion verschiedener Bindungsstellen innerhalb der TMDs zurückgeführt werden.

Die Aktivierung des ABCB1 vermittelten Transports ist stark vom betrachteten Substrat abhängig. Dies konnte durch die Messung der Toxizität verschiedener Zytostatika, die Substrate des ABCB1 darstellen, gegenüber ABCB1 überexprimierenden Zellen gezeigt werden. So waren ausgewählte Aktivatoren, welche im funktionellen Assay den Transport von Rhodamin 123 und Daunorubicin stimulierten, in der Lage, die Resistenz gegenüber Colchicin, Hoechst 33342 und Vinblastin zu reduzieren, was auf eine Hemmung des Transports dieser Substanzen schließen lässt. Die aktivierende Wirkung der Benzimidazole und Acridonsäureamide tritt somit nur dann in den Vordergrund, wenn sie mit möglichst spezifischen Substraten der Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 interagieren. Der Transport von Substraten der Hoechst-Bindungsstelle hingegen wird gehemmt. Allerdings besitzen einige der Modulatoren keinen Effekt auf den Efflux einzelner Zytostatika, sodass diese Unterteilung der Substrate keine allgemeingültigen Voraussagen erlaubt und nur grundsätzliche Tendenzen wiedergibt.

Basierend auf den dargestellten Daten kann postuliert werden, dass es sich bei der Rhodamin- und Hoechst-Bindungsstelle nicht um eng umgrenzte Bindungsstellen sondern um bevorzugte Bindungsregionen handelt, die eine grobe Klassifizierung von Substraten und Modulatoren erlauben. Insbesondere die aktivierend wirksamen Substanzen zeigen jedoch, dass die Interaktion der Bindungsstellen untereinander nicht allgemein vorhergesagt werden kann, da in jedem Fall eine hochspezifische Wechselwirkung zwischen einem Substrat und einem Modulator vorliegt. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass die für Aktivatoren gegenüber Rhodamin 123, Tetramethylrosamin und Daunorubicin gemessenen Aktivitätsdaten keinerlei Korrelation aufweisen, obwohl theoretisch alle diese Substrate an die Rhodamin-Bindungsstelle des ABCB1 binden sollen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind auch für die Entwicklung neuer Arzneistoffe relevant. So wird deutlich, dass insbesondere im Falle des ABCB1 trotz der häufig großen Übereinstimmung der unter Verwendung verschiedener Substrate erhaltenen Testungsergebnisse auch eine Vielzahl von Substanzen existiert, deren Wirkung eine ausgeprägte Substratspezifität aufweist. Für den sicheren Ausschluss einer möglichen Interaktion neuer Arzneistoffkandidaten mit ABCB1 im Rahmen der frühen Entwicklungsphase ist daher z.B. eine Messung unter Verwendung mehrerer Substrate sinnvoll. Ein mögliches Kriterium für die Auswahl geeigneter Modellsubstrate kann dabei deren postulierte Bindungsstelle am Protein darstellen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Seeger, M. A.; van Veen, H. W. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 725–737.
- [2] Linton, K. J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **2007**, *22*, 122–130.
- [3] Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156–66.
- [4] Dassa, E. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, 2003; Chapter Phylogenetic and Functional Classification of ABC (ATP-binding Cassette) Systems, pp 3–35.
- [5] Saier, M. H.; Paulsen, I. T. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 205–213.
- [6] Nikaido, H.; Hall, J. A. Overview of bacterial ABC transporters. *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 3–20.
- [7] Chang, G. Retraction of SStructure of MsbA from Vibrio cholera: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation"[J. Mol. Biol. (2003) 330 419-430]. *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 596.
- [8] Ward, A.; Reyes, C. L.; Yu, J.; Roth, C. B.; Chang, G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 19005–19010.
- [9] Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2005**, *6*, 123–142.
- [10] Oram, J. F.; Lawn, R. M. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1173–1179.
- [11] Sun, H.; Molday, R. S.; Nathans, J. Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8269–8281.

- [12] Smit, J. J.; Schinkel, A. H.; Elferink, R. P. O.; Groen, A. K.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C. A.; Ottenhoff, R.; van der Lugt, N. M.; van Roon, M. A. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **1993**, *75*, 451–462.
- [13] Rommens, J. M.; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M.; Rozmahel, R.; Cole, J. L.; Kennedy, D.; Hidaka, N. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **1989**, *245*, 1059–1065.
- [14] Aguilar-Bryan, L.; Nichols, C. G.; Wechsler, S. W.; Clement, J. P.; Boyd, A. E.; González, G.; Herrera-Sosa, H.; Nguy, K.; Bryan, J.; Nelson, D. A. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **1995**, *268*, 423–426.
- [15] Pauli-Magnus, C.; Lang, T.; Meier, Y.; Zodan-Marin, T.; Jung, D.; Breyman, C.; Zimmermann, R.; Kenngott, S.; Beuers, U.; Reichel, C.; Kerb, R.; Penger, A.; Meier, P. J.; Kullak-Ublick, G. A. Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics* **2004**, *14*, 91–102.
- [16] Matsuo, M.; Ueda, K.; Ryder, T.; Ashcroft, F. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, 2003; Chapter The Sulfonylurea Receptor: An ABCC Transporter that Acts as an Ion Channel Regulator, pp 551–575.
- [17] Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 3–29.
- [18] Schinkel, A. H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **1997**, *8*, 161–70.
- [19] Huls, M.; Russel, F. G. M.; Masereeuw, R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 3–9.
- [20] Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216–237.
- [21] Staud, F.; Ceckova, M.; Micuda, S.; Pavek, P. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*; Zhou, J., Ed., 1st ed.; Humana Press: New York, 2012; Vol. 596, Chapter Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics, pp 199–222.

- [22] Kwan, P.; Brodie, M. J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* **2005**, *46*, 224–235.
- [23] Szakács, G.; Váradi, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 379–393.
- [24] Chan, L. M. S.; Lowes, S.; Hirst, B. H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 25–51.
- [25] Perloff, M. D.; von Moltke, L. L.; Störmer, E.; Shader, R. I.; Greenblatt, D. J. Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 1601–1608.
- [26] Marathe, P. H.; Rodrigues, A. D. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*; Zhou, J., Ed., 1st ed.; Humana Press: New York, 2012; Vol. 596, Chapter Examination of CYP3A4 and P-Glycoprotein-mediated Drug-Drug Interactions Using Animal Models, pp 385–403.
- [27] Mellor, H. R.; Callaghan, R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* **2008**, *81*, 275–300.
- [28] Eckford, P. D. W.; Sharom, F. J. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2989–3011.
- [29] Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162.
- [30] Ueda, K.; Cardarelli, C.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 3004–3008.
- [31] Lockhart, A. C.; Tirona, R. G.; Kim, R. B. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 685–698.
- [32] Gillet, J.-P.; Efferth, T.; Remacle, J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1775*, 237–262.
- [33] Bates, S. E. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, 2003; Chapter Solving the Problem of Multidrug Resistance: ABC Transporters in Clinical Oncology, pp 359–391.

- [34] Ross, D. D.; Nakanishi, T. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*; Zhou, J., Ed., 1st ed.; Humana Press: New York, 2010; Vol. 596, Chapter Impact of Breast Cancer Resistance Protein on Cancer Treatment Outcomes, pp 251–290.
- [35] Gillet, J.-P.; Gottesman, M. M. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*; Zhou, J., Ed., 1st ed.; Humana Press: New York, 2010; Vol. 596, Chapter Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer, pp 47–76.
- [36] Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Phys. Rev.* **2006**, *86*, 1179–1236.
- [37] Srinivas, E.; Murthy, J. N.; Rao, A. R. R.; Sastry, G. N. Recent advances in molecular modeling and medicinal chemistry aspects of phospho-glycoprotein. *Curr. Drug Metab.* **2006**, *7*, 205–17.
- [38] Gribar, J. J.; Ramachandra, M.; Hrycyna, C. A.; Dey, S.; Ambudkar, S. V. Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J. Membr. Biol.* **2000**, *173*, 203–214.
- [39] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membr. Biol.* **2005**, *206*, 173–85.
- [40] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket. *Biochem. J.* **2006**, *399*, 351–9.
- [41] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. *Biochem. J.* **2006**, *396*, 537–45.
- [42] Pleban, K.; Kopp, S.; Csaszar, E.; Peer, M.; Hrebicek, T.; Rizzi, A.; Ecker, G. F.; Chiba, P. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 365–374.
- [43] Ecker, G. F.; Csaszar, E.; Kopp, S.; Plagens, B.; Holzer, W.; Ernst, W.; Chiba, P. Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 637–648.
- [44] Shapiro, A. B.; Corder, A. B.; Ling, V. P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 115–21.



- [45] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 419–422.
- [46] Omote, H.; Al-Shawi, M. K. Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4046–59.
- [47] Rosenberg, M. F.; Kamis, A. B.; Callaghan, R.; Higgins, C. F.; Ford, R. C. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8294–9.
- [48] Rosenberg, M. F.; Velarde, G.; Ford, R. C.; Martin, C.; Berridge, G.; Kerr, I. D.; Callaghan, R.; Schmidlin, A.; Wooding, C.; Linton, K. J.; Higgins, C. F. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5615–25.
- [49] Sharom, F. J. Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84*, 979–92.
- [50] Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323*, 1718–22.
- [51] Pajeva, I. K.; Globisch, C.; Wiese, M. Comparison of the inward- and outward-open homology models and ligand binding of human P-glycoprotein. *FEBS J.* **2009**, *276*, 7016–7026.
- [52] Globisch, C.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 280–295.
- [53] McDevitt, C. A.; Crowley, E.; Hobbs, G.; Starr, K. J.; Kerr, I. D.; Callaghan, R. Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2? *FEBS J.* **2008**, *275*, 4354–4362.
- [54] Deeley, R. G.; Westlake, C.; Cole, S. P. C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Phys. Rev.* **2006**, *86*, 849–899.
- [55] Senior, A. E.; al Shawi, M. K.; Urbatsch, I. L. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 285–9.

- [56] Higgins, C. F.; Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918–26.
- [57] Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 13–23.
- [58] Sauna, Z. E.; Kim, I.-W.; Nandigama, K.; Kopp, S.; Chiba, P.; Ambudkar, S. V. Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S reaction intermediate with ATP-gamma-S, a nonhydrolyzable analogue of ATP. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13787–13799.
- [59] Siarheyeva, A.; Liu, R.; Sharom, F. J. Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7575–7586.
- [60] Callaghan, R.; Ford, R. C.; Kerr, I. D. The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1056–63.
- [61] Al-Shawi, M. K.; Polar, M. K.; Omote, H.; Figler, R. A. Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52629–52640.
- [62] Crowley, E.; Callaghan, R. Multidrug efflux pumps: drug binding—gates or cavity? *FEBS J.* **2010**, *277*, 530–539.
- [63] van Veen, H. W.; Callaghan, R. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, 2003; Chapter Substrate Binding Sites in ABC Transporters, pp 81–105.
- [64] Shapiro, A. B.; Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–7.
- [65] Shapiro, A. B.; Ling, V. Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 181–8.
- [66] Shapiro, A. B.; Fox, K.; Lam, P.; Ling, V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 841–50.
- [67] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44332–44338.

- [68] Lugo, M. R.; Sharom, F. J. Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site. *Biochemistry* **2005**, *44*, 643–55.
- [69] Qu, Q.; Sharom, F. J. Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4744–52.
- [70] Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 624–32.
- [71] Safa, A. R. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 1–17.
- [72] Dey, S.; Hafkemeyer, P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. A single amino acid residue contributes to distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter by stereoisomers of the dopamine receptor antagonist flupentixol. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6630–9.
- [73] Garrigues, A.; Loiseau, N.; Delaforge, M.; Ferté, J.; Garrigos, M.; André, F.; Orłowski, S. Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1288–98.
- [74] Gruol, D. J.; King, M. N.; Kuehne, M. E. Evidence for the locations of distinct steroid and Vinca alkaloid interaction domains within the murine *mdr1b* P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1238–1248.
- [75] Lugo, M. R.; Sharom, F. J. Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14020–9.
- [76] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13603–6.
- [77] Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 15665–15670.
- [78] Allikmets, R.; Schriml, L. M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; Dean, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5337–5339.

- [79] Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 8–13.
- [80] Wang, H.; Lee, E.-W.; Cai, X.; Ni, Z.; Zhou, L.; Mao, Q. Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13778–13787.
- [81] Robey, R. W.; To, K. K. K.; Polgar, O.; Dohse, M.; Fetsch, P.; Dean, M.; Bates, S. E. ABCG2: a perspective. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 3–13.
- [82] Diop, N. K.; Hrycyna, C. A. N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5420–5429.
- [83] Kage, K.; Tsukahara, S.; Sugiyama, T.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 626–630.
- [84] Dezi, M.; Fribourg, P.-F.; Cicco, A. D.; Arnaud, O.; Marco, S.; Falson, P.; Pietro, A. D.; Lévy, D. The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2094–2101.
- [85] McDevitt, C. A.; Collins, R. F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Kerr, I. D.; Ford, R. C.; Callaghan, R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **2006**, *14*, 1623–1632.
- [86] Xu, J.; Liu, Y.; Yang, Y.; Bates, S.; Zhang, J.-T. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19781–19789.
- [87] Vlaming, M. L. H.; Lagas, J. S.; Schinkel, A. H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 14–25.
- [88] Ross, D. D.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Dalton, W. S.; Schneider, E.; Lage, H.; Dietel, M.; Greenberger, L.; Cole, S. P.; Doyle, L. A. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 429–433.

- [89] van Herwaarden, A. E.; Schinkel, A. H. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 10–16.
- [90] van Herwaarden, A. E.; Wagenaar, E.; Merino, G.; Jonker, J. W.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 1247–1253.
- [91] Deeley, R. G. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, 2003; Chapter Multidrug Resistance Protein1 (ABCC1), pp 393–422.
- [92] Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Pérez, W. Y.; Robey, R. W.; van de Laar, A.; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S. E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6635–6639.
- [93] Volk, E. L.; Schneider, E. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5538–5543.
- [94] Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**, *258*, 1650–1654.
- [95] Bakos, E.; Hegedüs, T.; Holló, Z.; Welker, E.; Tusnády, G. E.; Zaman, G. J.; Flens, M. J.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12322–12326.
- [96] Bakos, E.; Evers, R.; Szakács, G.; Tusnády, G. E.; Welker, E.; Szabó, K.; de Haas, M.; van Deemter, L.; Borst, P.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32167–75.
- [97] Lee, C. H. Reversing agents for ATP-binding cassette (ABC) transporters: application in modulating multidrug resistance (MDR). *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 43–52.
- [98] Shukla, S.; Wu, C.-P.; Ambudkar, S. V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 205–23.

- [99] Baumert, C.; Hilgeroth, A. Recent advances in the development of P-gp inhibitors. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 415–436.
- [100] Varma, M. V. S.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 347–359.
- [101] Hyafil, F.; Vergely, C.; Du Vignaud, P.; Grand-Perret, T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4595–602.
- [102] Dodic, N.; Dumaitre, B.; Daugan, A.; Pianetti, P. Synthesis and activity against multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells of new acridone-4-carboxamides. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2418–26.
- [103] Zhou, D. C.; Simonin, G.; Faussat, A. M.; Zittoun, R.; Marie, J. P. Effect of the multidrug inhibitor GG918 on drug sensitivity of human leukemic cells. *Leukemia* **1997**, *11*, 1516–22.
- [104] Traunecker, H. C.; Stevens, M. C.; Kerr, D. J.; Ferry, D. R. The acridonecarboxamide GF120918 potently reverses P-glycoprotein-mediated resistance in human sarcoma MES-Dx5 cells. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 942–51.
- [105] Wallstab, A.; Koester, M.; Böhme, M.; Keppler, D. Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918. *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1053–60.
- [106] de Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; Bates, S. E. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* **1999**, *146*, 117–26.
- [107] Mayur, Y. C.; Peters, G. J.; Prasad, V. V. S. R.; Lemo, C.; Sathish, N. K. Design of new drug molecules to be used in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Curr. Cancer Drug Targets* **2009**, *9*, 298–306.
- [108] Gopinath, V. S.; Thimmaiah, P.; Thimmaiah, K. N. Acridones circumvent P-glycoprotein-associated multidrug resistance (MDR) in cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 474–87.
- [109] Singh, P.; Kaur, J.; Kaur, P.; Kaur, S. Search for MDR modulators: design, syntheses and evaluations of N-substituted acridones for interactions with p-glycoprotein and Mg<sup>2+</sup>. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2423–7.

- [110] Boumendjel, A.; Macalou, S.; Ahmed-Belkacem, A.; Blanc, M.; Di Pietro, A. Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2892–7.
- [111] Arnaud, O.; Boumendjel, A.; Gèze, A.; Honorat, M.; Matera, E. L.; Guitton, J.; Stein, W. D.; Bates, S. E.; Falson, P.; Dumontet, C.; Pietro, A. D.; Payen, L. The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 640–648.
- [112] Coley, H. M. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*; Zhou, J., Ed., 1st ed.; Humana Press: New York, 2010; Vol. 596, Chapter Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Clinical Studies of P-Glycoprotein Inhibitors, pp 341–358.
- [113] List, A. F.; Kopecky, K. J.; Willman, C. L.; Head, D. R.; Persons, D. L.; Slovak, M. L.; Dorr, R.; Karanes, C.; Hynes, H. E.; Doroshow, J. H.; Shurafa, M.; Appelbaum, F. R. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* **2001**, *98*, 3212–20.
- [114] Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 219–34.
- [115] Colabufo, N. A.; Berardi, F.; Cantore, M.; Contino, M.; Inglese, C.; Niso, M.; Perrone, R. Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1883–1897.
- [116] Critchfield, J. W.; Welsh, C. J.; Phang, J. M.; Yeh, G. C. Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1437–45.
- [117] Wang, E.-j.; Barecki-Roach, M.; Johnson, W. W. Elevation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 412–8.
- [118] Sharom, F. J.; Yu, X.; DiDiodato, G.; Chu, J. W. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem. J.* **1996**, *320* (Pt 2), 421–8.
- [119] Noguchi, K.; Kawahara, H.; Kaji, A.; Katayama, K.; Mitsushashi, J.; Sugimoto, Y. Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1701–7.

- [120] Palmeira, A.; Vasconcelos, M. H.; Paiva, A.; Fernandes, M. X.; Pinto, M.; Sousa, E. Dual inhibitors of P-glycoprotein and tumor cell growth: (re)discovering thioxanthenes. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 57–68.
- [121] Komarov, P. G.; Komarova, E. A.; Kondratov, R. V.; Christov-Tselkov, K.; Coon, J. S.; Chernov, M. V.; Gudkov, A. V. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **1999**, *285*, 1733–7.
- [122] Pietrancosta, N.; Moumen, A.; Dono, R.; Lingor, P.; Planchamp, V.; Lamballe, F.; Bähr, M.; Kraus, J.-L.; Maina, F. Imino-tetrahydro-benzothiazole derivatives as p53 inhibitors: discovery of a highly potent in vivo inhibitor and its action mechanism. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3645–52.
- [123] Kondratov, R. V.; Komarov, P. G.; Becker, Y.; Ewenson, A.; Gudkov, A. V. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 14078–83.
- [124] Saengkhae, C.; Loetchutinat, C.; Garnier-Suillerot, A. Kinetic analysis of rhodamines efflux mediated by the multidrug resistance protein (MRP1). *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2006–2014.
- [125] Hamilton, T. C.; Young, R. C.; Ozols, R. F. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Sem. Oncol.* **1984**, *11*, 285–98.
- [126] Meyer, J. U. Untersuchung der Protein / Substrat Interaktion an rekombinantem P-Glykoprotein. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2008.
- [127] Kao, F. T.; Puck, T. T. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *60*, 1275–1281.
- [128] Palermo, D. P.; DeGraaf, M. E.; Marotti, K. R.; Rehberg, E.; Post, L. E. Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J. Biotechnol.* **1991**, *19*, 35–47.
- [129] Mickley, L. A.; Bates, S. E.; Richert, N. D.; Currier, S.; Tanaka, S.; Foss, F.; Rosen, N.; Fojo, A. T. Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18031–18040.
- [130] Hooijberg, J. H.; Broxterman, H. J.; Kool, M.; Assaraf, Y. G.; Peters, G. J.; Noordhuis, P.; Scheper, R. J.; Borst, P.; Pinedo, H. M.; Jansen, G. Antifolate resistance



- mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2532–2535.
- [131] Kool, M.; van der Linden, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; de Vree, J. M.; Smith, A. J.; Jansen, G.; Peters, G. J.; Ponne, N.; Scheper, R. J.; Elferink, R. P.; Baas, F.; Borst, P. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6914–6919.
- [132] Louvard, D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 4132–4136.
- [133] Hansson, G. C.; Simons, K.; van Meer, G. Two strains of the Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line have distinct glycosphingolipid compositions. *EMBO J.* **1986**, *5*, 483–489.
- [134] Pavek, P.; Merino, G.; Wagenaar, E.; Bolscher, E.; Novotna, M.; Jonker, J. W.; Schinkel, A. H. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 144–152.
- [135] Nakagawa, M.; Schneider, E.; Dixon, K. H.; Horton, J.; Kelley, K.; Morrow, C.; Cowan, K. H. Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6175–6181.
- [136] Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur*, 5th ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg-Berlin, 2002.
- [137] Kuteykin-Teplyakov, K.; Luna-Tortós, C.; Ambroziak, K.; Löscher, W. Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1453–1463.
- [138] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–75.
- [139] Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **1979**, *100*, 201–20.
- [140] Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **1977**, *83*, 346–56.
- [141] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.

- [142] Georges, E.; Bradley, G.; Garipey, J.; Ling, V. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 152–156.
- [143] van Den Elsen, J. M.; Kuntz, D. A.; Hoedemaeker, F. J.; Rose, D. R. Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 13679–84.
- [144] Naito, M.; Tsuruo, T. Monoclonal antibodies to P-glycoprotein: preparation and applications to basic and clinical research. *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 258–65.
- [145] Shi, T.; Wrin, J.; Reeder, J.; Liu, D.; Ring, D. B. High-affinity monoclonal antibodies against P-glycoprotein. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1995**, *76*, 44–51.
- [146] Crosland-Taylor, P. J. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* **1953**, *171*, 37–38.
- [147] Macey, M. G. *Flow Cytometry - Principles and Applications*, 1st ed.; Humana Press: Totowa, New Jersey, 2007.
- [148] Darzynkiewicz, Z.; Traganos, F.; Staiano-Coico, L.; Kapuscinski, J.; Melamed, M. R. Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 799–806.
- [149] Johnson, L. V.; Walsh, M. L.; Chen, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 990–4.
- [150] Smith, J. C. Potential-sensitive molecular probes in membranes of bioenergetic relevance. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1016*, 1–28.
- [151] Jonker, J. W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; Valk, M. A. V. D.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Elferink, R. P. J. O.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15649–15654.
- [152] Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S. E. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1242–1246.
- [153] Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8224–8236.
- [154] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

- [155] Müller, H.; Kassack, M. U.; Wiese, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 506–15.
- [156] Essodaigui, M.; Broxterman, H. J.; Garnier-Suillerot, A. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2243–50.
- [157] Eneroth, A.; Aström, E.; Hoogstraate, J.; Schrenk, D.; Conrad, S.; Kauffmann, H. M.; Gjellan, K. Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interaction. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *12*, 205–214.
- [158] Adhikary, A.; Buschmann, V.; Müller, C.; Sauer, M. Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2178–2186.
- [159] Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarkanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; Tandon, V. Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties. *Biochemistry* **2003**, *42*, 13339–13346.
- [160] Shapiro, A. B.; Ling, V. Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16167–16175.
- [161] Müller, H.; Klinkhammer, W.; Globisch, C.; Kassack, M. U.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7470–9.
- [162] Jander, G.; Blasius, E. *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 14th ed.; S. Hirzel Verlag: Stuttgart, 1995.
- [163] Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 266–270.
- [164] van Veldhoven, P. P.; Mannaerts, G. P. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 45–48.
- [165] Jacobs, A. Expression, Aufreinigung und funktionelle Untersuchungen der ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn., 2010.

- [166] Figler, R. A.; Omote, H.; Nakamoto, R. K.; Al-Shawi, M. K. Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 34–46.
- [167] Motulsky, H. *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A practical Guide to curve fitting*, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, 2003.
- [168] Müller, H. Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- [169] Stein, W. D. Kinetics of the P-glycoprotein, the multidrug transporter. *Exp. Physiol.* **1998**, *83*, 221–32.
- [170] Segel, I. H. *Enzyme Kinetics*, 1st ed.; John Wiley and Sons: New York, 1975.
- [171] Bisswanger, H. *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*, 3rd ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2000.
- [172] Eisenthal, R.; Cornish-Bowden, A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.* **1974**, *139*, 715–720.
- [173] Cornish-Bowden, A.; Eisenthal, R. Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem. J.* **1974**, *139*, 721–730.
- [174] van Hattum, A. H.; Schlüper, H. M. M.; Hausheer, F. H.; Pinedo, H. M.; Boven, E. Novel camptothecin derivative BNP1350 in experimental human ovarian cancer: determination of efficacy and possible mechanisms of resistance. *Int. J. Cancer* **2002**, *100*, 22–29.
- [175] Chambers, S. H.; Bleehen, N. M.; Watson, J. V. Effect of cell density on intracellular adriamycin concentration and cytotoxicity in exponential and plateau phase EMT6 cells. *Br. J. Cancer* **1984**, *49*, 301–306.
- [176] Shimoyama, Y.; Kubota, T.; Watanabe, M.; Ishibiki, K.; Abe, O. Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J. Surg. Oncol.* **1989**, *41*, 12–8.
- [177] Baguley, B. C. Multidrug resistance in cancer. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *596*, 1–14.
- [178] Gillet, J.-P.; Gottesman, M. M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *596*, 47–76.

- [179] Seelig, A.; Landwojtowicz, E. Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *12*, 31–40.
- [180] Garnier-Suillerot, A.; Marbeuf-Gueye, C.; Salerno, M.; Loetchutinat, C.; Fokt, I.; Krawczyk, M.; Kowalczyk, T.; Priebe, W. Analysis of drug transport kinetics in multidrug-resistant cells: implications for drug action. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 51–64.
- [181] Calcagno, A. M.; Ambudkar, S. V. Molecular mechanisms of drug resistance in single-step and multi-step drug-selected cancer cells. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *596*, 77–93.
- [182] Bertino, J. R. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. *J. Clin. Oncol.* **1993**, *11*, 5–14.
- [183] Gupta, R. S.; Dudani, A. K. Species-specific differences in the toxicity of rhodamine 123 towards cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* **1987**, *130*, 321–327.
- [184] Gupta, R. S. Intrinsic multidrug resistance phenotype of Chinese hamster (rodent) cells in comparison to human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 598–605.
- [185] Bakos, E.; Evers, R.; Sinkó, E.; Váradi, A.; Borst, P.; Sarkadi, B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 760–768.
- [186] Chabner, B. A.; Allegra, C. J.; Curt, G. A.; Clendeninn, N. J.; Baram, J.; Koizumi, S.; Drake, J. C.; Jolivet, J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 907–912.
- [187] Zeng, H.; Chen, Z. S.; Belinsky, M. G.; Rea, P. A.; Kruh, G. D. Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7225–7232.
- [188] Wielinga, P.; Hooijberg, J. H.; Gunnarsdottir, S.; Kathmann, I.; Reid, G.; Zelcer, N.; van der Born, K.; de Haas, M.; van der Heijden, I.; Kaspers, G.; Wijnholds, J.; Jansen, G.; Peters, G.; Borst, P. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4425–4430.
- [189] Loe, D. W.; Almquist, K. C.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9675–9682.

- [190] Cole, S. P.; Sparks, K. E.; Fraser, K.; Loe, D. W.; Grant, C. E.; Wilson, G. M.; Deeley, R. G. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5902–5910.
- [191] Stride, B. D.; Grant, C. E.; Loe, D. W.; Hipfner, D. R.; Cole, S. P.; Deeley, R. G. Pharmacological characterization of the murine and human orthologs of multidrug-resistance protein in transfected human embryonic kidney cells. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 344–353.
- [192] Volk, E. L.; Rohde, K.; Rhee, M.; McGuire, J. J.; Doyle, L. A.; Ross, D. D.; Schneider, E. Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3514–3521.
- [193] Chen, Z.-S.; Robey, R. W.; Belinsky, M. G.; Shchaveleva, I.; Ren, X.-Q.; Sugimoto, Y.; Ross, D. D.; Bates, S. E.; Kruh, G. D. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4048–4054.
- [194] Volk, E. L.; Farley, K. M.; Wu, Y.; Li, F.; Robey, R. W.; Schneider, E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5035–5040.
- [195] Kool, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; van Eijk, M. J.; Juijn, J. A.; Baas, F.; Borst, P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3537–3547.
- [196] Schinkel, A. H.; Roelofs, E. M.; Borst, P. Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2628–2635.
- [197] Kimura, Y.; ya Morita, S.; Matsuo, M.; Ueda, K. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 1303–1310.
- [198] Gottesman, M. M.; Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385–427.
- [199] Ng, W. F.; Sarangi, F.; Zastawny, R. L.; Veinot-Drebot, L.; Ling, V. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 1224–1232.

- [200] Endicott, J. A.; Juranka, P. F.; Sarangi, F.; Gerlach, J. H.; Deuchars, K. L.; Ling, V. Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug-sensitive Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7*, 4075–4081.
- [201] Lee, J. S.; Paull, K.; Alvarez, M.; Hose, C.; Monks, A.; Grever, M.; Fojo, A. T.; Bates, S. E. Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46*, 627–38.
- [202] Jekerle, V.; Klinkhammer, W.; Scollard, D. A.; Breitbach, K.; Reilly, R. M.; Piquette-Miller, M.; Wiese, M. In vitro and in vivo evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques. *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 414–22.
- [203] Sterz, K. Charakterisierung neuer MDR-Modulatoren und Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von P-Glykoprotein. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006.
- [204] Loetchutinat, C.; Saengkhae, C.; Marbeuf-Gueye, C.; Garnier-Suillerot, A. New insights into the P-glycoprotein-mediated effluxes of rhodamines. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 476–85.
- [205] Luo, S.; Pal, D.; Shah, S. J.; Kwatra, D.; Paturi, K. D.; Mitra, A. K. Effect of HEPES buffer on the uptake and transport of P-glycoprotein substrates and large neutral amino acids. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 412–420.
- [206] Draper, M. P.; Martell, R. L.; Levy, S. B. Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 810–815.
- [207] Tsuruo, T.; Iida, H.; Yamashiro, M.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Enhancement of vincristine- and adriamycin-induced cytotoxicity by verapamil in P388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 3138–3140.
- [208] Tamai, I.; Safa, A. R. Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16509–16513.
- [209] Roe, M.; Folkes, A.; Ashworth, P.; Brumwell, J.; Chima, L.; Hunjan, S.; Pretswell, I.; Dangerfield, W.; Ryder, H.; Charlton, P. Reversal of P-glycoprotein mediated multi-drug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 595–600.

- [210] Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 403–11.
- [211] Klinkhammer, W. Design, Synthese und 3D-QSAR neuartiger P-gp-Modulatoren. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn., 2006.
- [212] Globisch, C.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1588–98.
- [213] Sterz, K.; Möllmann, L.; Jacobs, A.; Baumert, D.; Wiese, M. Activators of P-glycoprotein: Structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1897–911.
- [214] de la Haye, A. Charakterisierung von P-Glykoprotein Aktivatoren mittels funktioneller FACS-basierter Assays. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn., 2007.
- [215] Lu, P.; Liu, R.; Sharom, F. J. Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1687–97.
- [216] Zelcer, N.; Huisman, M. T.; Reid, G.; Wielinga, P.; Breedveld, P.; Kuil, A.; Knipscheer, P.; Schellens, J. H. M.; Schinkel, A. H.; Borst, P. Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 23538–23544.
- [217] Gerk, P. M.; Li, W.; Megaraj, V.; Vore, M. Human multidrug resistance protein 2 transports the therapeutic bile salt tauroursodeoxycholate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 893–899.
- [218] Scambia, G.; Ranelletti, F. O.; Panici, P. B.; Vincenzo, R. D.; Bonanno, G.; Ferrandina, G.; Piantelli, M.; Bussa, S.; Rumi, C.; Cianfriglia, M. Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *34*, 459–464.
- [219] Limtrakul, P.; Khantamat, O.; Pintha, K. Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *J. Chemother.* **2005**, *17*, 86–95.
- [220] Sharom, F. J.; Lu, P.; Liu, R.; Yu, X. Linear and cyclic peptides as substrates and modulators of P-glycoprotein: peptide binding and effects on drug transport and accumulation. *Biochem. J.* **1998**, *333* ( Pt 3), 621–30.



- [221] Herzog, C. E.; Tsokos, M.; Bates, S. E.; Fojo, A. T. Increased mdr-1/P-glycoprotein expression after treatment of human colon carcinoma cells with P-glycoprotein antagonists. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2946–2952.
- [222] Scotto, K. W.; Biedler, J. L.; Melera, P. W. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science* **1986**, *232*, 751–755.
- [223] Lohner, K.; Schnäbele, K.; Daniel, H.; Oesterle, D.; Rechkemmer, G.; Göttlicher, M.; Wenzel, U. Flavonoids alter P-gp expression in intestinal epithelial cells in vitro and in vivo. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 293–300.
- [224] Dunne, G.; Breen, L.; Collins, D. M.; Roche, S.; Clynes, M.; O'Connor, R. Modulation of P-gp expression by lapatinib. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 1284–1293.
- [225] Kohno, K.; Sato, S.; Takano, H.; Matsuo, K.; Kuwano, M. The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 1415–1421.
- [226] Kruh, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *42*, 65–82.
- [227] Callaghan, R.; Crowley, E.; Potter, S.; Kerr, I. D. P-glycoprotein: so many ways to turn it on. *J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *48*, 365–378.
- [228] Stein, U.; Walther, W.; Lemm, M.; Naundorf, H.; Fichtner, I. Development and characterisation of novel human multidrug resistant mammary carcinoma lines in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **1997**, *72*, 885–91.
- [229] Borska, S.; Sopel, M.; Chmielewska, M.; Zabel, M.; Dziegiel, P. Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. *Molecules* **2010**, *15*, 857–870.
- [230] Chieli, E.; Romiti, N.; Rodeiro, I.; Garrido, G. In vitro modulation of ABCB1/P-glycoprotein expression by polyphenols from *Mangifera indica*. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *186*, 287–294.
- [231] Duthie, S. J.; Johnson, W.; Dobson, V. L. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat. Res.* **1997**, *390*, 141–151.
- [232] Boumendjel, A.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Barron, D. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 512–29.

- [233] Möllmann, L. Synthese und Variationen von P-Glykoprotein-Modulatoren. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006.
- [234] Möllmann, L. Benzimidazol-Analoga als Modulatoren von ABC-Transportern. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- [235] Higgins, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **2007**, *446*, 749–57.
- [236] Tang, F.; Ouyang, H.; Yang, J. Z.; Borchardt, R. T. Bidirectional transport of rhodamine 123 and Hoechst 33342, fluorescence probes of the binding sites on P-glycoprotein, across MDCK-MDR1 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1185–94.
- [237] Pajeva, I. K.; Globisch, C.; Wiese, M. Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2523–33.
- [238] Leyers, S. Funktionelle Untersuchungen der Multidrug-Resistance-Associated Proteins (MRP) 1 und 2. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 2009.
- [239] Häcker, H.-G.; de la Haye, A.; Sterz, K.; Schnakenburg, G.; Wiese, M.; Gütschow, M. Analogs of a 4-aminothieno[2,3-d]pyrimidine lead (QB13) as modulators of P-glycoprotein substrate specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6102–5.
- [240] Tang-Wai, D. F.; Kajiji, S.; DiCapua, F.; de Graaf, D.; Roninson, I. B.; Gros, P. Human (MDR1) and mouse (mdr1, mdr3) P-glycoproteins can be distinguished by their respective drug resistance profiles and sensitivity to modulators. *Biochemistry* **1995**, *34*, 32–39.
- [241] *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*, 1st ed.; Langer, T., Hoffmann, R. D., Eds.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2006.
- [242] Höltje, H. D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*, 3rd ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2008.
- [243] *MOE, Molecular Operating Environment 2009.10.*; Chemical Computing Group Inc.: Montreal, Kanada.
- [244] Labute, P.; Williams, C.; Feher, M.; Sourial, E.; Schmidt, J. M. Flexible alignment of small molecules. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1483–1490.
- [245] Christlieb, M. Dissertation in Bearbeitung, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

- [246] Zolnerciks, J. K.; Booth-Genthe, C. L.; Gupta, A.; Harris, J.; Unadkat, J. D. Substrate- and species-dependent inhibition of P-glycoprotein-mediated transport: implications for predicting in vivo drug interactions. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 3055–3061.
- [247] Chiba, P.; Hitzler, M.; Richter, E.; Huber, M.; Tmej, C.; Giovagnoni, E.; Ecker, G. Studies on Propafenone-type Modulators of Multidrug Resistance III: Variations on the Nitrogen. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1997**, *16*, 361–366.
- [248] Ecker, G. F.; Stockner, T.; Chiba, P. Computational models for prediction of interactions with ABC-transporters. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 311–317.
- [249] Ecker, G.; Huber, M.; Schmid, D.; Chiba, P. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 791–796.
- [250] Seelig, A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 252–261.
- [251] Wang, E. J.; Casciano, C. N.; Clement, R. P.; Johnson, W. W. Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 580–5.
- [252] Giacomini, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 215–236.
- [253] Cramer, J.; Kopp, S.; Bates, S. E.; Chiba, P.; Ecker, G. F. Multispecificity of drug transporters: probing inhibitor selectivity for the human drug efflux transporters ABCB1 and ABCG2. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1783–8.
- [254] Pick, A.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Specific inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP). *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1498–1505.
- [255] Pick, A. Funktionelle Untersuchungen des ABC Transporters Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- [256] Steggemann, K. Design und Synthese neuartiger Inhibitoren für den ABC-Transporter Breast Cancer Resistance Protein. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- [257] Laryea, D.; Gullbo, J.; Isaksson, A.; Larsson, R.; Nygren, P. Characterization of the cytotoxic properties of the benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, in human tumour cell lines and primary cultures of patient tumour cells. *Anticancer Drugs* **2010**, *21*, 33–42.

- [258] Chang, W.-L.; Chang, C.-S.; Chiang, P.-C.; Ho, Y.-F.; Liu, J.-F.; Chang, K.-W.; Guh, J.-H. 2-Phenyl-5-(pyrrolidin-1-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1H-benzimidazole, a benzimidazole derivative, inhibits growth of human prostate cancer cells by affecting tubulin and c-Jun N-terminal kinase. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1677–1689.
- [259] Coban, G.; Zencir, S.; Zupkó, I.; Réthy, B.; Gunes, H. S.; Topcu, Z. Synthesis and biological activity evaluation of 1H-benzimidazoles via mammalian DNA topoisomerase I and cytostaticity assays. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2280–2285.
- [260] Racané, L.; Kralj, M.; Suman, L.; Stojkovic, R.; Tralic-Kulenovic, V.; Karminski-Zamola, G. Novel amidino substituted 2-phenylbenzothiazoles: synthesis, antitumor evaluation in vitro and acute toxicity testing in vivo. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1038–1044.
- [261] Mayur, Y. C.; Zaheeruddin; Peters, G. J.; Lemos, C.; Kathmann, I.; Prasad, V. V. S. R. Synthesis of 2-fluoro N(10)-substituted acridones and their cytotoxicity studies in sensitive and resistant cancer cell lines and their DNA intercalation studies. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2009**, *342*, 640–650.
- [262] Prasad, V. V. S. R.; Peters, G. J.; Lemos, C.; Kathmann, I.; Mayur, Y. C. Cytotoxicity studies of some novel fluoro acridone derivatives against sensitive and resistant cancer cell lines and their mechanistic studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *43*, 217–224.
- [263] Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; Tiano, M. Acridine and acridone derivatives, anti-cancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 139–169.
- [264] Ludwig, J. A.; Szakács, G.; Martin, S. E.; Chu, B. F.; Cardarelli, C.; Sauna, Z. E.; Caplen, N. J.; Fales, H. M.; Ambudkar, S. V.; Weinstein, J. N.; Gottesman, M. M. Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4808–15.
- [265] Türk, D.; Hall, M. D.; Chu, B. F.; Ludwig, J. A.; Fales, H. M.; Gottesman, M. M.; Szakács, G. Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8293–8301.
- [266] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39706–10.
- [267] Polli, J. W.; Wring, S. A.; Humphreys, J. E.; Huang, L.; Morgan, J. B.; Webster, L. O.; Serabjit-Singh, C. S. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 620–8.

- [268] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1575–8.
- [269] Shapiro, A. B.; Ling, V. ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3745–54.
- [270] al Shawi, M. K.; Senior, A. E. Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4197–206.
- [271] Urbatsch, I. L.; al Shawi, M. K.; Senior, A. E. Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7069–76.
- [272] Doige, C. A.; Yu, X.; Sharom, F. J. The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1146*, 65–72.
- [273] Eytan, G. D.; Regev, R.; Oren, G.; Hurwitz, C. D.; Assaraf, Y. G. Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, 104–12.
- [274] Tomblin, G.; Donnelly, D. J.; Holt, J. J.; You, Y.; Ye, M.; Gannon, M. K.; Nygren, C. L.; Detty, M. R. Stimulation of P-glycoprotein ATPase by analogues of tetramethylrosamine: coupling of drug binding at the "R<sub>site</sub> to the ATP hydrolysis transition state. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8034–47.
- [275] Gannon, M. K.; Holt, J. J.; Bennett, S. M.; Wetzel, B. R.; Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M.; Sawada, G. A.; Higgins, J. W.; Tomblin, G.; Raub, T. J.; Detty, M. R. Rhodamine inhibitors of P-glycoprotein: an amide/thioamide switch for ATPase activity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3328–3341.
- [276] Gibson, S. L.; Holt, J. J.; Ye, M.; Donnelly, D. J.; Ohulchanskyy, T. Y.; You, Y.; Detty, M. R. Structure-activity studies of uptake and phototoxicity with heavy-chalcogen analogues of tetramethylrosamine in vitro in chemosensitive and multidrug-resistant cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6394–6403.
- [277] McKnight, R. E.; Onogul, B.; Polasani, S. R.; Gannon, M. K.; Detty, M. R. Substituent control of DNA binding modes in a series of chalcogenoxanthylum photosensitizers as determined by isothermal titration calorimetry and topoisomerase I DNA unwinding assay. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10221–10227.

- [278] Schnabel, C.; Sterz, K.; Müller, H.; Rehbein, J.; Wiese, M.; Hiersemann, M. Total synthesis of natural and non-natural delta(5,6)delta(12,13)-jatrophone diterpenes and their evaluation as MDR modulators. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 512–522.
- [279] Hohmann, J.; Molnár, J.; Rédei, D.; Evanics, F.; Forgo, P.; Kálmán, A.; Argay, G.; Szabó, P. Discovery and biological evaluation of a new family of potent modulators of multidrug resistance: reversal of multidrug resistance of mouse lymphoma cells by new natural jatrophone diterpenoids isolated from Euphorbia species. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2425–2431.
- [280] Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballo, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Pietro, A. D. Jatrophone diterpenes as P-glycoprotein inhibitors. First insights of structure-activity relationships and discovery of a new, powerful lead. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3395–3402.

# A Chemikalienverzeichnis

Substanz	Bezugsquelle
2-(4-Amidinophenyl)-6-indolcarbamidin-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma Aldrich, D9542
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)2,5-diphenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumbromid (MTT)	Applichem, A2231
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Applichem, A1069
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Natriumsalz (HEPES-Na)	Applichem, A1070
2-Phenylindol	Alfa Aesar, B23674
Acrylamid-Lösung 30 %	Applichem, A3626
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich, A2383
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Sigma Aldrich, A1343
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, 3678
Antikörper C219	Signet Laboratories, 870-01
Antikörper FITC-17F9	Becton Dickinson, 557002
Antikörper HRP conjugated anti-mouse IgG	Calbiochem, 401215
Benzimidazol	Acros Organics, 18642050
Bromphenolblau	Applichem, A2331
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem, A0850
Calcein-AM	Sigma Aldrich, 17783
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, 1.02382
CASY <sup>®</sup> ton-Lösung	innovatis AG, 43001
Ciclosporin	Fluka, 30024
Colchicin	Acros Organics, 227125000
Complete <sup>®</sup> mini Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche, 11836153001
Daunorubicin Hydrochlorid	Merck, 1.04074
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, 472301
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, 1.06559
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Applichem, A4732
Di-Natriumtartrat Dihydrat	Fluka, 71995

Fortsetzung – Chemikalienverzeichnis

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Doxorubicin	Merck, 24786
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem, A2948
Dulbeccos Modified Eagles Medium (D-MEM)	Sigma Aldrich, D5671
Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Appllichem, A0878
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, E6758
FACS Clean	Becton Dickinson, 340345
FACS Flow	Becton Dickinson, 342003
FACS Rinse	Becton Dickinson, 340346
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich, F7524
Fluoromount <sup>®</sup> aqueous Mounting Medium	Sigma Aldrich, F4680
Folin Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, 1.09001
Geneticin Sulfat (G418)	GIBCO, 11811-064
D-Glucose Monohydrat	Merck, 1.04074
L-Glutamin-Lösung 200 mmol/l	Sigma Aldrich, G7513
Glycerol	Appllichem, A1123
Glycin	Grüssing, 11016
Hoechst 33258	Acros Organics, 229895000
Hoechst 33342 Trihydrochlorid	Sigma Aldrich, B2261
Immobilon Western Chemoluminescent HRP Substrate	Millipore, WNKLS0050
Indometacin	Sigma Aldrich, I7378
Kaliumchlorid	Merck, 1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, 1.04873
Kaliumhydrogencarbonat	Grüssing, 12028
Kupfersulfat Pentahydrat	Appllichem, A1034
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck, 1.05886
Malachitgrün	Sigma Aldrich, M9636
Methanol	Baker, 8402
Methansulfonsäure 70 %	Alfa Aesar, A17803
Methotrexat	Fluka, 06563
Milchpulver	Roth, T145.1
Mitoxantron	Sigma Aldrich, M6545
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appllichem, A2572
Natriumedetat-Lösung 0,1 mol/l	Grüssing, 20271
Natriumazid	Janssen Chimica, 19.038.26
Natriumbutyrat	Acros Organics, 26319
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich, S7795
Natriumchlorid	Merck, 1.06404
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, D6750



---

Fortsetzung – Chemikalienverzeichnis

---

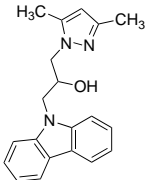
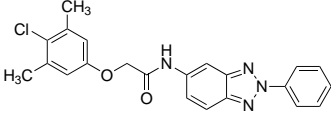
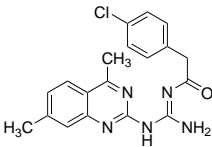
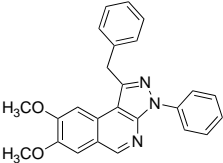
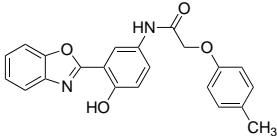
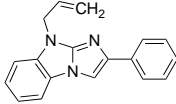
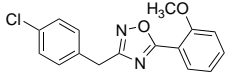
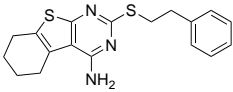
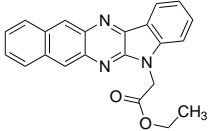
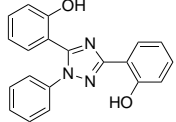
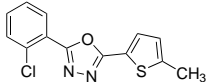
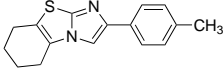
<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Natriumhydrogencarbonat	Merck, 1.06329
Natriumhydroxid	Acros Organics, 134070010
Natriumhydroxid-Lösung 1 mol/l	Riedel de Haën, 35256
Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma Aldrich, N4888
Paclitaxel	Taxomedac® 6 mg/ml, PZN 1083933
Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (10 mg/ml)- Lösung	Pan Biotech GmbH
Pheophorbid A	Frontier Scientific, Pha-592
Polyvinylalkohol	Sigma Aldrich, 348406
Prazosin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, P7791
Progesteron	Sigma Aldrich, P8783
Propidiumiodid-Lösung 1 mg/ml	Molecular Probes, P3566
Protein Marker II (5,6-200 kDa, stained)	Applichem, A5418
Protein Standard 200 mg/ml BSA	Sigma Aldrich, P5369
Quercetin Dihydrat	Sigma Aldrich, Q0125
Rhodamin 123	Acros Organics, 419091000
Ribonuclease A	Sigma Aldrich, R6513
RPMI 1640 Medium	Pan Biotech GmbH, P04-16500
RPMI 1640 Medium, ohne Phenolrot	Sigma Aldrich, R7509
Schwefelsäure 95-97 %	Grüssing, 13071
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Applichem, A1148
Tetramethylrosaminchlorid	Molecular Probes, T639
Trichloressigsäure	T8657
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Applichem, A2264
Triton-X-100	Roth, 3051.3
Trypsin (0,05 %) / EDTA (0,02 %)-Lösung	Pan Biotech GmbH, P10-0231SP
Tween 20	Applichem, A4974
Verapamil	Sigma Aldrich, V4629
Vinblastin Sulfat	Fluka, 94897

---



## B Strukturen der QB-Derivate und Gü-Verbindungen

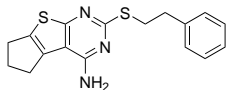
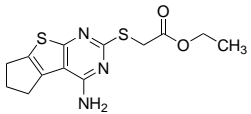
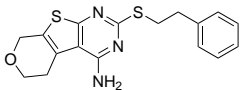
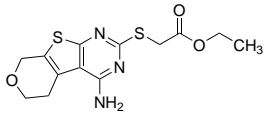
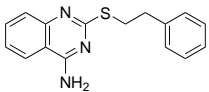
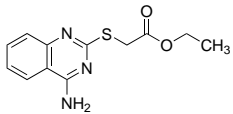
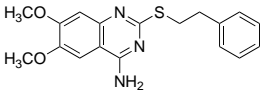
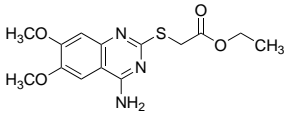
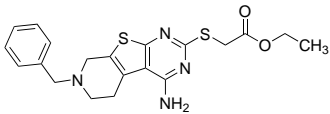
Tabelle B.1: Strukturen der bei Kondratov *et al.* beschriebenen QB-Verbindungen [123].

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
QB2		QB7	
QB8		QB9	
QB10		QB11	
QB12		QB13	
QB14		QB15	
QB16		QB102	

**Tabelle B.2:** Strukturen der aktivierend wirksamen Gü-Verbindungen mit variiertem Thioether-Partialstruktur [214, 239].

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
Gü 233		Gü 139	
Gü 1458		Gü 203	
Gü 1460		QB13	
Gü 234		Gü 1461	
Gü 1462		Gü 140	
		Gü 141	

**Tabelle B.3:** Strukturen der aktivierend wirksamen Gü-Verbindungen mit mit modifiziertem Grundgerüst [214, 239].

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
Gü 1481		Gü 1482	
Gü 1490		Gü 1489	
Gü 1492		Gü 1491	
Gü 1494		Gü 1493	
		Gü 1480	



## C Pharmakophor-Erstellung

Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte bei der Erstellung von Pharmakophormodellen erfolgten unter Verwendung des MMFF94x Kraftfeldes in MOE 2009.10 (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Kanada).

### C.1 Konformationssuche

Sämtliche LM-Verbindungen (siehe Kapitel 5.3.1) wurden zunächst in MOE 2009.10 gezeichnet und in einer Datenbank gespeichert, die anschließend für die Konformationssuche eingesetzt wurde (n=3).

Die stochastische Konformationssuche erfolgte unter Standardbedingungen (Rejection Limit = 100, Iteration Limit = 10 000, RMS-Gradient = 0,005, MM-Iteration Limit = 500, Allow amide bond rotation), wobei Wasserstoffatome in die Berechnung des RMSD einbezogen wurden (RMSD Limit = 0,25, Strain cutoff = 7, Conformation Limit = 10 000). Die erhaltenen Konformationen wurden in einer neuen Datenbank gespeichert.

Unter den gleichen Bedingungen wurde auch eine stochastische Konformationssuche aller in [214] bzw. [239] aufgeführten 4-Aminothienopyrimidine (Gü-Verbindungen) durchgeführt.

### C.2 Alignments

Die Erstellung der als Basis für die Pharmakophormodelle dienenden Alignments A1-A3 erfolgte durch Flexible Alignment (Iteration Limit = 200, Failure Limit = 20, Energy Cutoff = 15, Standardeinstellungen) oder manuelle Überlagerung der Strukturen. Die für jede Substanz generierte Konformation wurde zunächst separat gespeichert und abschließend alle für ein Alignment benötigten Strukturen zusammengefügt. Es wurde wie folgt vorgegangen:

### C.2.1 Aktivatoren vom Benzimidazol-Typ (A1)

**Substanzen:** QB102, QB11, LM-7.1, LM-7.3, LM-8.0 bis LM-8.13, LM-14.1, LM-14.2, LM-14.3, LM-14.6, LM-25.1, LM-25.5, LM-25.6, LM-25.9, LM-25.10, LM-H-1, LM-H-10

**Template:** LM-14.2 (energieärmste Konformation aus stochastischer Konformationssuche)

**Alignment:**

- Manuelle Überlagerung von LM-14.1, LM-14.3 und LM-14.6 mit dem Template LM-14.2 (Potential Fix) durch Austausch des Methylrestes am Phenylring und Energieminimierung des eingefügten Substituenten (Grundgerüst fixiert).
- Flexible Alignment von LM-8.0 mit dem Template LM-14.2 (Potential Fix). Manuelle Überlagerung der übrigen methylierten Benzimidazole (LM-8.x) durch Einbringen und Energieminimierung der fehlenden Substituenten (fixiertes Grundgerüst) ausgehend von der Konformation des LM-8.0.
- Flexible Alignment von QB11, LM-25.1, LM-25.5, LM-25.6, LM-25.9 und LM-25.10 mit LM-14.2 (Potential Fix).
- Flexible Alignment von QB102 mit LM-14.2 (Potential Fix) und manuelle Überlagerung von LM-7.1 und LM-7.3 durch Austausch der Methylgruppe am Phenylrest und Energieminimierung der neuen Substituenten bei fixiertem Grundgerüst.
- Flexible Alignment von LM-H-1 mit LM-14.2 (Potential Fix) und manuelle Überlagerung von LM-H-10 durch Löschen der Methoxygruppen.

### C.2.2 Inhibitoren vom Benzimidazol-Typ (A2)

**Substanzen:** LM-25.2, LM-25.3, LM-25.8, LM-25.12, LM-25.21, LM-25.22, LM-25.23, LM-25.24

**Template:** LM-25.8 (energieärmste Konformation aus stochastischer Konformationssuche)

**Alignment:**

- Flexible Alignment von LM-25.8 (Rigid Body) mit der Templatestruktur des LM-14.2 aus A1; Löschen von LM-14.2 und speichern des LM-25.8 als Template für weitere Überlagerungen.
- Flexible Alignment aller verbleibenden Substanzen mit dem Template LM-25.8 (Potential Fix).



### C.2.3 Aktivatoren vom 4-Aminothienopyrimidin-Typ (A3)

**Substanzen:** QB13, Gü 139, Gü 140, Gü 141, Gü 203, Gü 233, Gü 234, Gü 1458, Gü 1460, Gü 1461, Gü 1462, Gü 1469, Gü 1480, Gü 1481, Gü 1482, Gü 1489, Gü 1490, Gü 1491, Gü 1492, Gü 1493, Gü 1494

**Template:** Gü 139 (energieärmste Konformation aus stochastischer Konformationssuche)

#### Alignment:

- Flexible Alignment von Gü 139 (Rigid Body) mit QB102-Struktur aus A1; Löschen von QB102 und speichern des Gü 139 als Template für die weiteren Überlagerungen.
- Flexible Alignment von QB13, Gü 233 und Gü 1469 mit dem Template Gü 139 (Potential Fix).
- Flexible Alignment von Gü 140, Gü 203, Gü 1460, Gü 1461 und Gü 1469 mit QB13 (Potential Fix). Manuelle Überlagerung des Gü 141 durch Einfügen der Hydroxylgruppe in Gü 203 mit anschließender Energieminimierung des Substituenten (fixiertes Grundgerüst).
- Flexible Alignment von Gü 234 mit Gü 1461 (Potential Fix); Flexible Alignment von Gü 1458 mit Gü 203 (Potential Fix); Flexible Alignment von Gü 1462 mit Gü 140 (Potential Fix).
- Flexible Alignment von Gü 1480, Gü 1482 und Gü 1489 mit Gü 140 (Potential Fix) sowie von Gü 1481 und Gü 1490 mit QB13 (Potential Fix).
- Flexible Alignment von Gü 1491 mit Gü 1462 (Potential Fix). Löschen des Gü 1462 und Flexible Alignment von Gü 1493 mit Gü 1491 (Potential Fix).
- Flexible Alignment von Gü 1492 mit Gü 1460 (Potential Fix). Löschen des Gü 1460 und Flexible Alignment von Gü 1494 mit Gü 1492 (Potential Fix).

## C.3 Pharmakophor-Erstellung mit Consensus

Basierend auf den erstellten Alignments wurden mittels des in MOE implementierten Moduls „Consensus“ mehrere Pharmakophormodelle entwickelt, wobei die gefundenen Features und deren Radien so optimiert wurden, dass die aktiven Verbindungen innerhalb des zur Erstellung verwendeten Datensatzes durch eine Pharmakophorsuche korrekt vorhergesagt werden konnten. Die für die verschiedenen Substanzklassen gefundenen Features sowie die

**Tabelle C.1:** Pharmakophormodell für Aktivatoren von ABCB1 basierend auf dem Alignment der aktivierend wirksamen Benzimidazole (A1). Die Erstellung des Modells erfolgte mittels Consensus (Standardeinstellungen, Tolerance 0,8 Å, Threshold 80 %). Alle Projektionen für Aromatische Systeme (PiN) wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt. Acc = Wasserstoffbrückenakzeptor, Acc2 = Projektion des Akzeptors, Don = Wasserstoffbrückendonor, Aro = Aromat, Hyd = Hydrophobes Zentrum.

Feature	Score	Radius	Typ	Funktion
G1	100 %	0,60 Å	Acc	F1
G2	100 %	0,60 Å	PiN	gelöscht
G3	100 %	0,60 Å	PiN	gelöscht
G4	100 %	0,62 Å	Aro	F3
G5	100 %	0,63 Å	Hyd Don	gelöscht
G6	100 %	0,63 Å	PiN	gelöscht
G7	100 %	0,65 Å	PiN	gelöscht
G8	100 %	1,01 Å	Aro Hyd	F4
G9	96 %	0,65 Å	Acc2	F2
G10	93 %	0,83 Å	Aro Hyd	F6
G11	89 %	0,81 Å	Aro	F5
G12	89 %	0,81 Å	PiN	gelöscht
G13	89 %	0,81 Å	PiN	gelöscht
G14	82 %	0,55 Å	PiN	gelöscht
G15	82 %	0,68 Å	PiN	gelöscht
<b>Pharmakophor</b>				
F1		0,60 Å	Acc	essentiell
F2		0,65 Å	Acc2	essentiell
F3		0,62 Å	Aro	essentiell
F4		1,01 Å	Aro	essentiell
F5		0,80 Å	Aro Hyd	essentiell
F6		0,83 Å	Aro HydA	

daraus extrahierten aktivitätsbestimmenden Strukturmerkmale sind in den Tabellen C.1-C.3 aufgeführt.

**Tabelle C.2:** Pharmakophormodell für Inhibitoren basierend auf dem Alignment der inhibitorisch wirksamen Benzimidazole (A2). Die Erstellung des Modells erfolgte mittels Consensus (Standardeinstellungen, Tolerance 0,6 Å, Threshold 80 %). Alle Projektionen für Aromatische Systeme (PiN) wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt. Acc = Wasserstoffbrückenakzeptor, Acc2 = Projektion des Akzeptors, Don = Wasserstoffbrückendonator, Aro = Aromat, Hyd = Hydrophobes Zentrum.

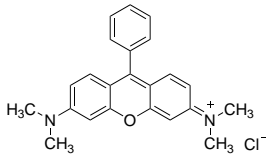
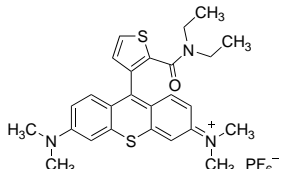
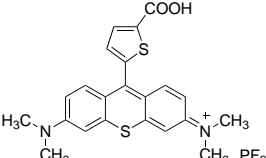
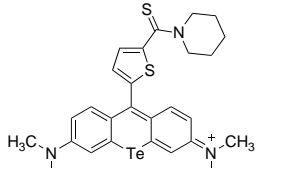
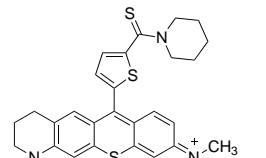
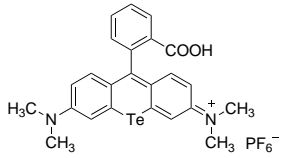
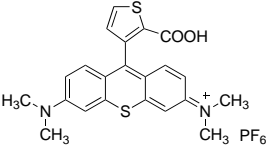
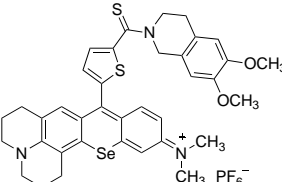
Feature	Score	Radius	Typ	Funktion
G1	100 %	0,52 Å	Acc	gelöscht
G2	100 %	0,53 Å	Acc2	gelöscht
G3	100 %	0,53 Å	PiN	gelöscht
G4	100 %	0,54 Å	Aro Hyd	F4
G5	100 %	0,54 Å	PiN	gelöscht
G6	100 %	0,54 Å	PiN	gelöscht
G7	100 %	0,57 Å	PiN	gelöscht
G8	100 %	0,58 Å	PiN	gelöscht
G9	100 %	0,59 Å	Acc	F1
G10	100 %	0,59 Å	Aro	F3
G11	100 %	0,61 Å	Hyd	gelöscht
G12	100 %	0,61 Å	Aro	F5
G13	100 %	0,64 Å	Acc2	F2
G14	100 %	0,71 Å	PiN	gelöscht
G15	100 %	0,75 Å	PiN	gelöscht
G16	100 %	0,79 Å	PiN	gelöscht
G17	100 %	0,82 Å	Aro Hyd	F6
G18	88 %	0,75 Å	Hyd	F7
<b>Pharmakophor</b>				
F1		0,60 Å	Acc	essentiell
F2		0,65 Å	Acc2	essentiell
F3		0,62 Å	Aro	essentiell
F4		1,01 Å	Aro	essentiell
F5		0,80 Å	Aro	essentiell
F6		0,83 Å	Aro Hyd	
F7		1,01 Å	Aro Hyd	essentiell

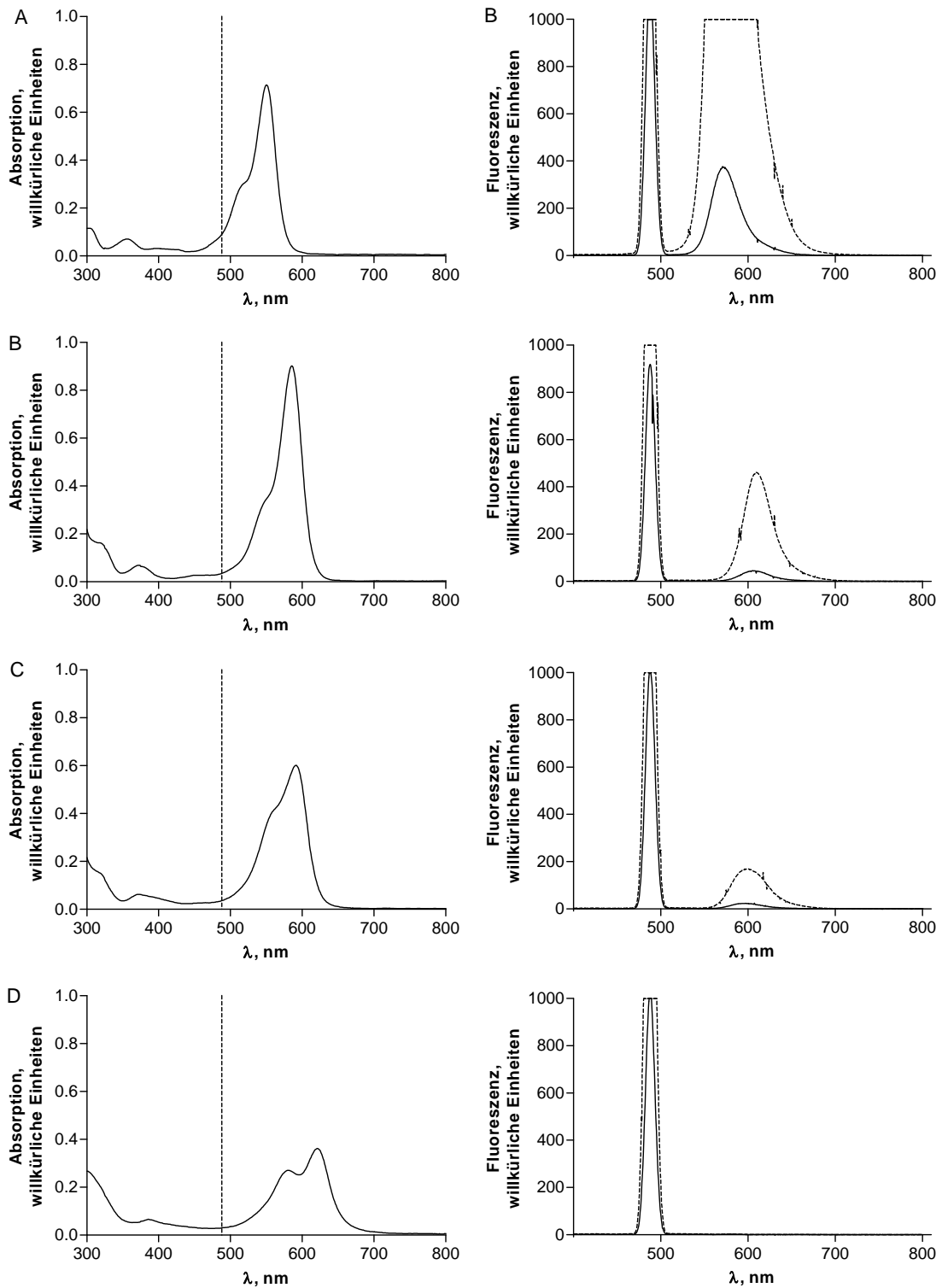
**Tabelle C.3:** Pharmakophormodell für Aktivatoren von ABCB1 basierend auf dem Alignment der aktivierend wirksamen Thienopyrimidine (A3). Die Erstellung des Modells erfolgte mittels Consensus (Standardeinstellungen, Tolerance 0,8 Å, Threshold 80 %). Alle Projektionen für Aromatische Systeme (PiN) wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt. Acc = Wasserstoffbrückenakzeptor, Acc2 = Projektion des Akzeptors, Don = Wasserstoffbrückendonor, Don2 = Projektion des Donors, Aro = Aromat, Hyd = Hydrophobes Zentrum.

Feature	Score	Radius	Typ	Funktion
G1	100 %	0,56 Å	Don	F6
G2	100 %	0,59 Å	Acc	gelöscht
G3	100 %	0,61 Å	Don2	F7
G4	100 %	0,63 Å	Aro	F3
G5	100 %	0,66 Å	PiN	gelöscht
G6	100 %	0,67 Å	PiN	gelöscht
G7	100 %	0,69 Å	Acc	F1
G8	100 %	0,77 Å	Acc2	F2
G9	100 %	0,82 Å	PiN	gelöscht
G10	100 %	0,85 Å	PiN	gelöscht
G11	100 %	0,93 Å	Hyd	F4
G12	100 %	1,06 Å	Aro Hyd	F5
Pharmakophor				
F1		0,60 Å	Acc	essentiell
F2		0,65 Å	Acc2	essentiell
F3		0,63 Å	Aro	essentiell
F4		0,93 Å	Hyd	essentiell
F5		0,80 Å	Aro Hyd	essentiell
F6		0,56 Å	Don	
F7		0,61 Å	Don2	

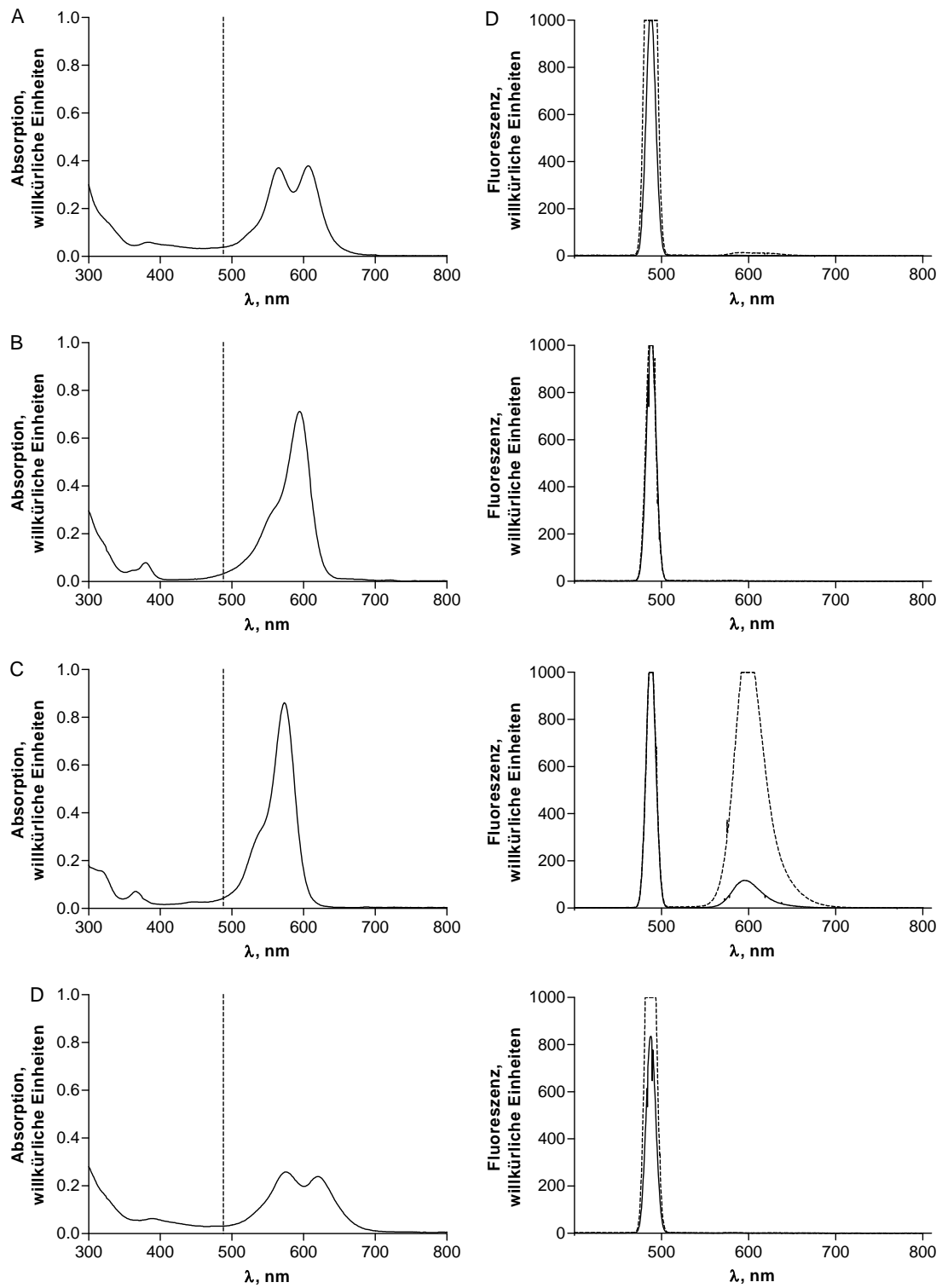
## D Strukturen und Spektren von Derivaten des Tetramethylrosamin

Tabelle D.1: Strukturen der untersuchten Tetramethylrosaminderivate [275, 277].

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
TMR		MKG-87	
MKG-115		MKG-147	
MKG-149		MKG-158	
MKG-164		MKG-245	



**Abbildung D.1:** Links: Absorptionsspektren von 10  $\mu\text{mol/l}$  Tetramethylrosamin (A), MKG-87 (B), MKG-115 (C) und MKG-147 (D). Die gestrichelte Linie markiert die im Durchflusszytometer verfügbare Anregungswellenlänge von 488 nm. Rechts: Emissionsspektren von 0,3 (durchgezogene Linie) und 3  $\mu\text{mol/l}$  (gestrichelte Linie) der Substanzen nach Anregung bei 488 nm. Alle Substanzen wurden in KHP gelöst.



**Abbildung D.2:** Links: Absorptionsspektren von 10  $\mu\text{mol/l}$  MKG-149 (A), MKG-158 (B), MKG-164 (C) und MKG-245 (D). Die gestrichelte Linie markiert die im Durchflusszytometer verfügbare Anregungswellenlänge von 488 nm. Rechts: Emissionsspektren von 0,3 (durchgezogene Linie) und 3  $\mu\text{mol/l}$  (gestrichelte Linie) der Substanzen nach Anregung bei 488 nm. Als Lösungsmittel diente KHP.

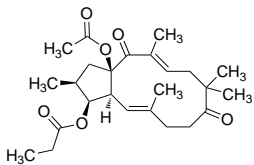
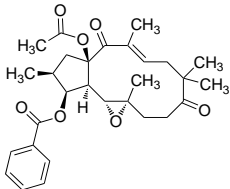
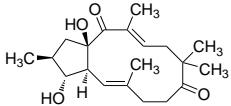
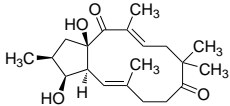
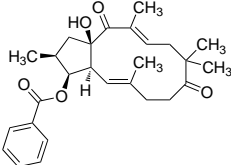
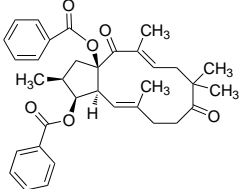




## E Untersuchung von Jatrophan-Diterpenen

Ein Nebenprojekt der vorliegenden Arbeit stellte die Charakterisierung einer Reihe von Jatrophan-Diterpenen hinsichtlich ihrer MDR modulierenden Eigenschaften dar. Die Verbindungen, deren Strukturen in Tabelle E.1 dargestellt sind, wurden im Arbeitskreis von Prof. Hiersemann (Technische Universität Dortmund) synthetisiert und leiten sich strukturell vom Characiol und dessen Stereoisomer 3-*epi*-Characiol ab [278]. Einige der Substanzen wurden bereits zuvor von Dr. Henrik Müller charakterisiert, die weitere Testung erfolgte mit Unterstützung der technischen Mitarbeiterinnen Iris Jusen und Martina Lebbing-Neuber im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Die erhaltenen Ergebnisse sollen an dieser Stelle kurz zusammengefasst werden.

**Tabelle E.1:** Strukturen der untersuchten Jatrophan-Diterpene.

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
1a		1b	
2		29	
30		31	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
32		33	
34		35	
36		S6	
S7		S8	
S9		S10	
S11		S12	

Die ABCB1 inhibitorische Aktivität verschiedener aus *Euphorbia*-Arten isolierter Diterpene wurde bereits in einer Reihe von Publikationen beschrieben [279, 280], weshalb der Fokus der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen auf deren Interaktion mit diesem Protein

---

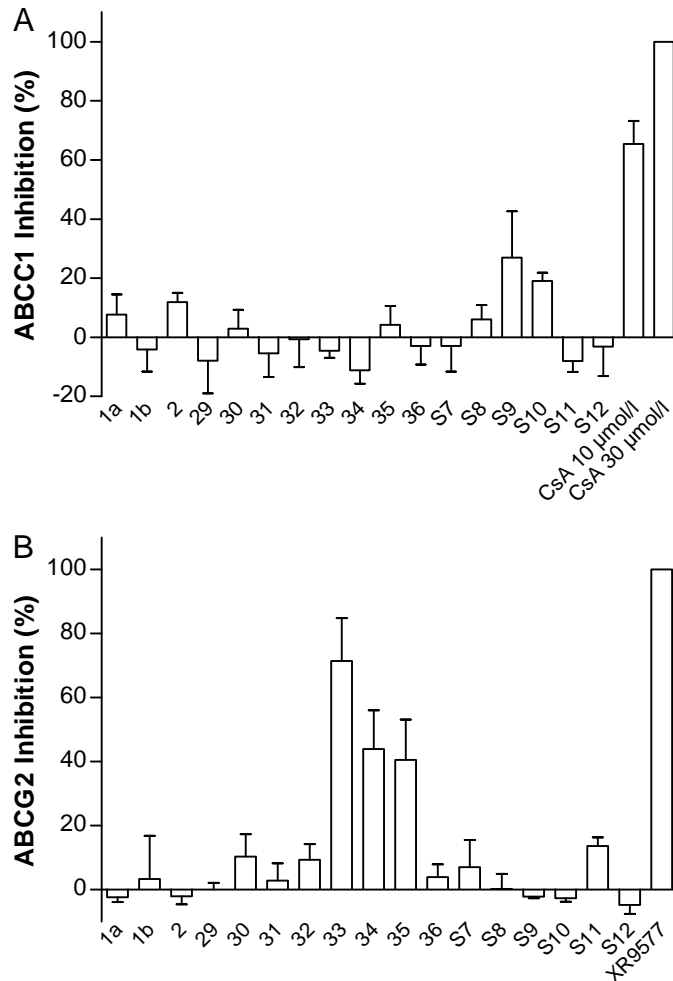
lag. Zusätzlich wurde jedoch auch die Wirksamkeit der Substanzen gegenüber ABCC1 und ABCG2 charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden jeweils Screenings unter Verwendung des Calcein-AM- (ABCB1 und ABCC1) und des Hoechst 33342-Akkumulationsassays (ABCG2) durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration der Testsubstanzen betrug dabei in allen Fällen 10 µmol/l.

Wie Abbildung E.1 A zu entnehmen ist, ist – im Gegensatz zu dem als Positivkontrolle verwendeten Ciclosporin – keines der getesteten Diterpene in der Lage, den ABCC1 vermittelten Transport von Calcein-AM in 2008 MRP1 Zellen zu inhibieren. Lediglich **S9** führt zu einem leichten Anstieg der zellulären Fluoreszenz, die auf eine Inhibition von ABCC1 hindeuten könnte, die für diese Substanz erhaltenen Messwerte unterliegen jedoch starken Schwankungen.

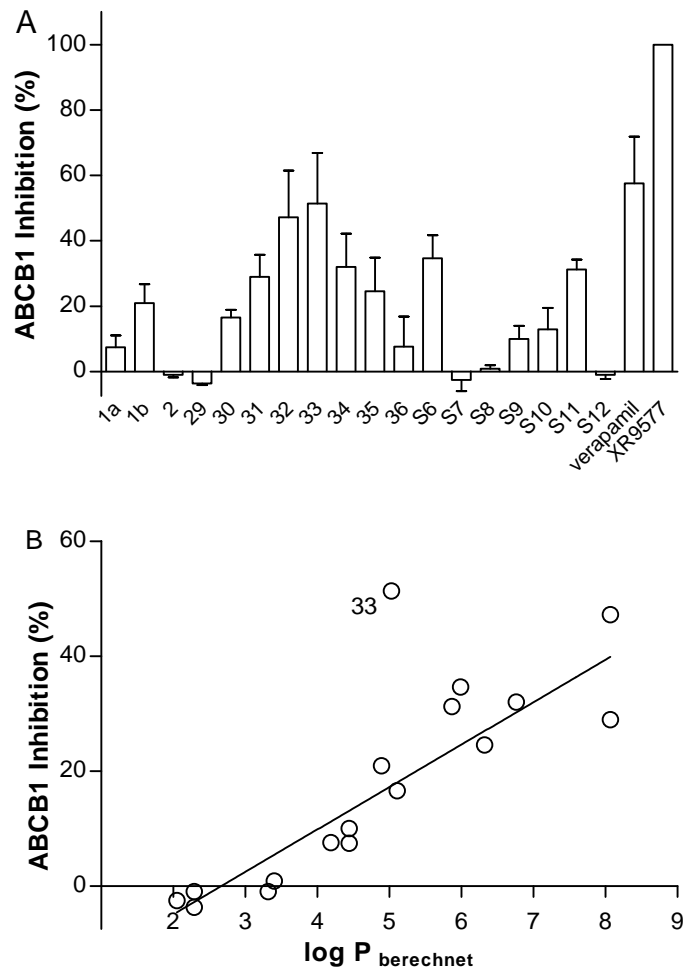
Auch gegenüber ABCG2 besitzen die meisten Verbindungen keine signifikante Wirksamkeit. Eine Ausnahme stellen hier **33**, **34** und **35** dar, die in einer Konzentration von 10 µmol/l in der Lage sind, den ABCG2 vermittelten Transport von Hoechst 33342 zu ca. 50-70 % zu hemmen (siehe Abbildung E.1, B). Die aktivste Substanz **33** ist damit nur wenig schwächer wirksam, als der Standardinhibitor XR9577. Da ausschließlich jene Verbindungen mit größeren aromatischen Resten in Position C<sup>3</sup> eine Wirksamkeit aufweisen, scheint dies ein für die Hemmung von ABCG2 essentielles Strukturmerkmal innerhalb dieser Klasse von Verbindungen darzustellen. So besitzen beispielsweise die Derivate **S11**, **30**, **31** und **32**, welche in dieser Position lediglich den kleineren Benzoylrest aufweisen, keinerlei Wirksamkeit gegenüber dem Transporter.

Der Schwerpunkt dieser Versuchsreihe lag jedoch auf der Charakterisierung der Interaktion mit ABCB1. Die Ergebnisse des entsprechenden Screenings sind in Abbildung E.2 A dargestellt. Auch hier stellt **33** mit einer ähnlichen Aktivität wie der Standardinhibitor der ersten Generation Verapamil den potentesten Hemmstoff dar. Eine signifikante Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz kann ebenfalls in Anwesenheit von **34** und **35** detektiert werden. Da jedoch auch in der sensitiven Zelllinie A2780 (nicht dargestellt) ein analoger Effekt in der gleichen Größenordnung erkennbar ist, kann die Wirkung dieser Substanzen auf ABCB1 nicht abschließend beurteilt werden.

Neben den genannten Verbindungen sind auch einige andere Diterpene mit aromatischen Substituenten an C<sup>3</sup> in der Lage den ABCB1 vermittelten Transport von Calcein-AM zu inhibieren. Dies trifft insbesondere auf die Benzoyl substituierten Verbindungen **S6**, **S11**, **31** und **32** zu, wobei deren Wirkung insgesamt jedoch eher schwächer ausgeprägt ist. Die ABCB1 inhibitorische Aktivität der Diterpene scheint somit durch lipophile, aromatische Substituenten in dieser Position erhöht zu werden. So besitzen beispielsweise unter den in Position C<sup>15</sup>



**Abbildung E.1:** Screening der Jatrophan-Diterpene (10  $\mu\text{mol/l}$ ) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegenüber ABCC1 und ABCG2. A: Ergebnisse des Calcein-AM-Assays für ABCC1 unter Verwendung der Zelllinie 2008MRP1. Als Standard wurde Cyclosporin eingesetzt. B: Hoechst 33342-Akkumulationsassay für ABCG2 mit MCF7/MX Zellen. Als Positivkontrolle diente XR9577. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Hemmung des Transporters aus einer Serie zweier unabhängiger Experimente.



**Abbildung E.2:** Screening der Jatrophan-Diterpene (10 µmol/l) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegenüber ABCB1. A: Ergebnisse des Calcein-AM-Assays unter Verwendung der Zelllinie A2780 Adr. Als Standardinhibitor wurde XR9577 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der prozentualen Inhibition von ABCB1 (n=2). B: Korrelation der prozentualen Inhibition in Anwesenheit von 10 µmol/l der Jatrophan-Diterpene mit dem berechneten log P ( $r^2 = 0,71$ ).

identisch substituierten Derivaten **S11**, **S12** und **30** jene mit den am stärksten hydrophoben Resten an C<sup>3</sup> die größte Wirksamkeit gegenüber dem Transporter.

Da verschiedene Autoren für unterschiedliche Substanzklassen, unter anderem auch Jatrophan-derivate, einen direkten Zusammenhang von Lipophilie und der Aktivität gegenüber ABCB1 postulierten [179, 247, 248, 279], wurden die Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P) der Substanzen berechnet (ACD 5.09, Advanced Chemistry Development Inc. Toronto, Kanada). Wie Abbildung E.2 B zu entnehmen ist, korrelieren diese gut mit der ABCB1 inhibitorischen Aktivität der Diterpene. Unter Ausschluss der Verbindung **33** ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,71$ . Lediglich diese eine Verbindung weist eine erhöhte ABCB1 inhibierende Wirkung auf, die nicht alleine durch ihre Lipophilie erklärt werden kann. Möglicherweise trägt hier die Wasserstoffbrückenakzeptorfunktion des Chinolinsubstituenten zu einer hohen spezifischen Interaktion mit dem Protein bei.

Zusätzlich wurden die 5,6-Epoxidanaloga einiger Verbindungen untersucht. Diese weisen jedoch in der Regel eine geringere Wirksamkeit auf, als die Ausgangsverbindungen, was auf ihre geringere Lipophilie zurückzuführen sein könnte. Dies trifft beispielsweise auf das Substanzpaar **S6** und **1b** zu. Die noch hydrophileren Verbindungen **2**, **29** und **37**, welche in den Positionen C<sup>3</sup> und C<sup>15</sup> unsubstituierte Hydroxyl- oder Carbonylfunktionen aufweisen, sind hingegen vollständig inaktiv.

Die untersuchte Substanzreihe umfasste des Weiteren auch Verbindungen, die sich in ihrer absoluten Konfiguration des C<sup>3</sup> unterscheiden. Hinsichtlich des Einflusses dieses Strukturmerkmals können jedoch aufgrund der Tatsache, dass mit den Verbindungen **31** und **32** nur ein Substanzpaar charakterisiert wurde, welches sich ausschließlich hinsichtlich der Stereochemie unterscheidet, keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen gezogen werden. Im Falle der genannten Verbindungen besitzt jedoch das *R*-Enantiomer **32** eine etwas höhere Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier untersuchten Jatrophan-Diterpene sich durch eine eher schwache Wirksamkeit gegenüber den MDR-assoziierten ABC-Transportern ABCB1, ABCC1 und ABCG2 auszeichnen. Die Verbindung **33**, welche sowohl inhibitorische Wirksamkeit gegenüber ABCB1 als auch gegenüber ABCG2 besitzt, stellt dabei den potentesten Hemmstoff dar. Die Verbindungen können dennoch interessante Ausgangspunkte für die Strukturoptimierung neuer MDR-Modulatoren darstellen. So könnte die Wirksamkeit beispielsweise durch Einfügen von Substituenten in Position C<sup>9</sup> zusätzlich erhöht werden, da verschiedene Studien zu dem Ergebnis kamen, dass voluminöse Reste in dieser Position die Wirksamkeit gegenüber ABCB1 erhöhen sollen [279, 280].

# Publikationen

## Wissenschaftliche Originalarbeiten

Häcker, H.-G.; de la Haye, A.; Sterz, K.; Schnakenburg, G.; Wiese M.; Gütschow, M. Analogs of 4-Aminothieno[2,3-*d*]pyrimidine lead (QB13) as modulators of P-glycoprotein substrate specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6102–6105.

Sterz, K.; Möllmann, L.; Jacobs, A.; Baumert, D.; Wiese, M. Activators of P-glycoprotein: structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1879–1911.

Schnabel, C.; Sterz, K.; Müller, H.; Rehbein, J.; Wiese, M.; Hiersemann, M. Total Synthesis of Natural and Non-Natural  $\Delta^{5,6}\Delta^{12,13}$ -Jatrophone Diterpenes and Their Evaluation as MDR Modulators. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 512-522.

## Kongressbeiträge

Sterz, K.; Möllmann, L.; Wiese, M. Evaluation of novel compounds able to activate substrate transport by P-glycoprotein. *Jahrestagung der DPhG*, Erlangen, **2007**. (Poster)

Häcker, H.-G.; Sterz, K.; de la Haye, A.; Wiese, M.; Gütschow, M. Synthesis of Thieno[2,3-*d*]pyrimidines as modulators of P-glycoprotein. *Jahrestagung der DPhG*, Erlangen, **2007**. (Poster)

Krieger, M. L.; Konold, A.; Sterz, K.; Müller, H.; Jaehde, U.; Wiese, M.; Bendas, G. Cytostatics containing liposomes to investigate and overcome chemoresistance of tumor cells. *Jahrestagung der DPhG*, Erlangen, **2007**. (Poster)

Sterz, K.; Möllmann, L.; Wiese, M. Novel imidazobenzimidazoles and -thiazoles activate substrate transport at the R-site of P-glycoprotein. *2<sup>nd</sup> FEBS Special Meeting ABC Proteins*, Innsbruck, **2008**. (Poster)

Möllmann, L.; Sterz, K.; Wiese, M. Quantitative Structure Activity Relationships of activators of MDR associated P-glycoprotein. *Jahrestagung der DPhG*, Bonn, **2008**. (Poster)

Christlieb, M.; Sterz, K.; Wiese, M. Analogs of Elacridar as potent and specific inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *3<sup>rd</sup> FEBS Special Meeting ABC Proteins*, Innsbruck, **2010**. (Poster)





# Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet.

Bonn,

Katja Sterz